

oekotoxzentrum
centre ecotox



Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée
Eawag-EPFL

Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität

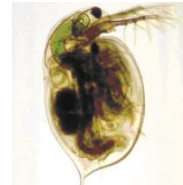
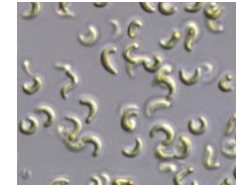
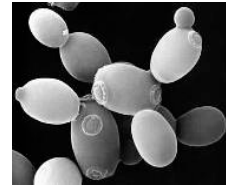
Cornelia Kienle

Eawag Infotag, 03.09.2015



Überblick

- Einführung zu Biotests
- Anwendung von Biotests zur Beurteilung der Elimination von Mikroverunreinigungen in ARA
- Anwendung von Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Oberflächengewässern





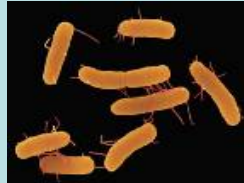
Warum sind Biotests wichtig?

- Aussage über **toxische Wirkungen auf Umweltorganismen**
- **Ergänzung von chemischer Analytik**, da damit nur begrenzte Aussage über ökotoxikologische Auswirkungen möglich
- Zur **Untersuchung von Schadstoffmischungen** wie sie z.B. in Abwasser- und Oberflächengewässern vorliegen
- Zur **ökotoxikologischen Erfolgskontrolle**



Arten von Biotests

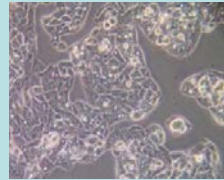
In vitro-Biotests



<http://cache.eb.com>

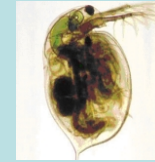
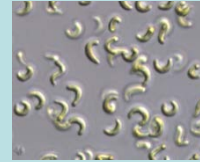


www.toxikologie.uni-wuerzburg.de



- Sensitive Erfassung spezifischer Effekte von Substanzklassen mit ähnlichem Wirkmechanismus
- Extrapolation auf mögliche Konsequenzen für Organismen schwieriger

In vivo-Biotests

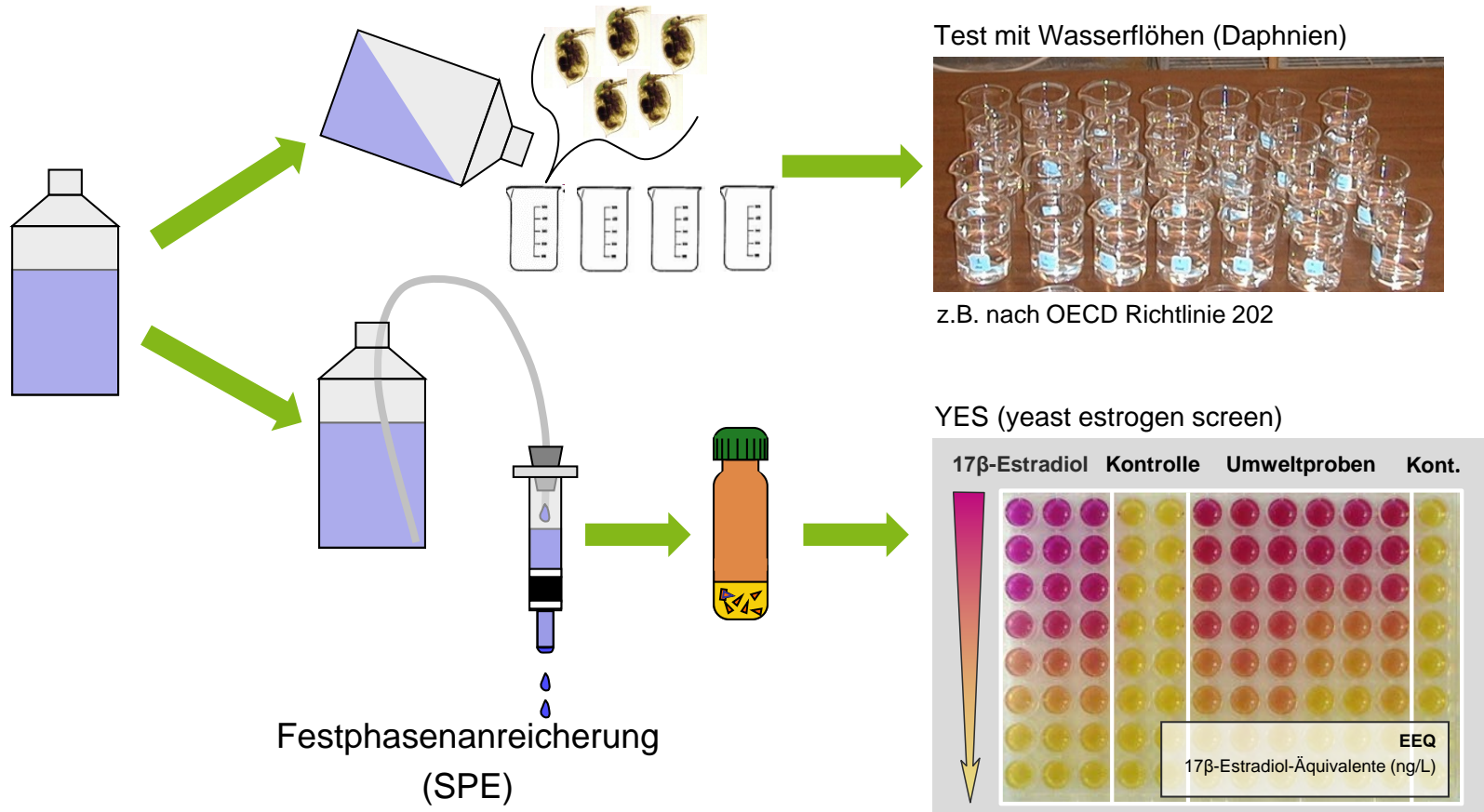


- Integrieren Wirkung aller Substanzen in Wasserprobe
- Schlussfolgerungen über biologische/ökologische Effekte
- Begrenzte Auskunft über verantwortliche Substanzklassen



Was ist ein Biotest und wie führt man ihn durch?

Biotest = „Standardisierter“ Ablauf eines biologischen Experiments mit definierter Durchführung und Auswertung.





Welche Biotests eignen sich
zur Beurteilung der
Elimination von
Mikroverunreinigungen in
ARA?



Projekt «Strategie Micropoll» des BAFU: Teilprojekt Technische Grundlagen

- **Frage:** Wie können Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser entfernt werden?
- **Ziel:** Evaluation von Technologien zur Elimination von Mikroverunreinigungen
- **Pilotstudien:**

ARA Wüeri in Regensdorf



Abegglen et al. 2009, Eawag

ARA Vidy in Lausanne



Margot et al. 2011, Ville de Lausanne



Fragestellungen in Bezug auf Biotests

- 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?



Wie wurden die Biotests ausgewählt?

- Basierend auf folgenden **Kriterien**:
 - Genügend **empfindlich** und **robust** zur Erfassung des Effektes von Mikroverunreinigungen
 - **Erfassung mehrerer toxischer Wirkmechanismen** und **verschiedener Ernährungsstufen**
 - Untersuchung **aufkonzentrierter Proben** und von **Wasserproben ohne Aufkonzentrierung**

- Unterstützung durch ein **Expertengremium**

- **Auswahl von 16 *in vitro*- und 9 *in vivo*-Biotests**



Was wurde untersucht?

Primärproduzenten

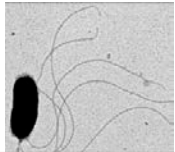


Algen



Wasserlinsen

Zersetzer



Bakterien

Primärkonsumenten



Wasserfloh



Detritusfresser



Glanzworm



Schnecke

Zerkleinerer



Bachflohkrebs

Sekundärkonsumenten



Regenbogenforelle



Spezifische Wirkmechanismen

- Genotoxizität und Mutagenität
- Östrogene und andere hormonelle Wirkungen
- Herbizide Wirkungen etc.



Was haben *in vitro*-Biotests auf der ARA Vidy in Lausanne ergeben?

Ergebnisse für Testsysteme basierend auf spez. zellulären Mechanismen

↓ abnehmende Effekte, ~ gleichbleibende Effekte, ↑ zunehmende Effekte, var. variable Effekte

Biotest	Stoffklasse / Wirkung	Biologische Reinigung	Ozonung	Ozonung + Sandfiltration (3.+4. MK)	Pulveraktivkohle - UF
Östrogene Wirkungen ER-CALUX®	Östrogen/Hormonelle Wirkung (17β-Estradiol-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	var.	↓
Andere hormonelle Wirkungen	Androgen/Hormonelle Wirkung (Dihydrotestosteron-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓
GR CALUX	Glucocorticoide/Hormonelle Wirkung (Dexamethason-Äquivalente)	~	↓	↓	↓
PR CALUX	Progesterone/Hormonelle Wirkung (Org 2058-Äquivalente)	↑	↓	↓	↓
PPARg1 CALUX	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Stoffe/ u.a. Wirkung auf den Fettstoffwechsel (Rosiglitazon-Äquivalente)	↓	↓	var.	↓
H295R	Estradiol-Produktion/Hormonelle Wirkung		↓	↓	↓
	Testosteron-Produktion/Hormonelle Wirkung		~	~	~
Herbizide Wirkungen	Herbizide/Photosynthese-Hemmung (Diflufen-Äquivalente)	var.	↓	↓	↓
	Alle Stoffe/Wachstumshemmende Wirkung (Basistoxizitäts-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓



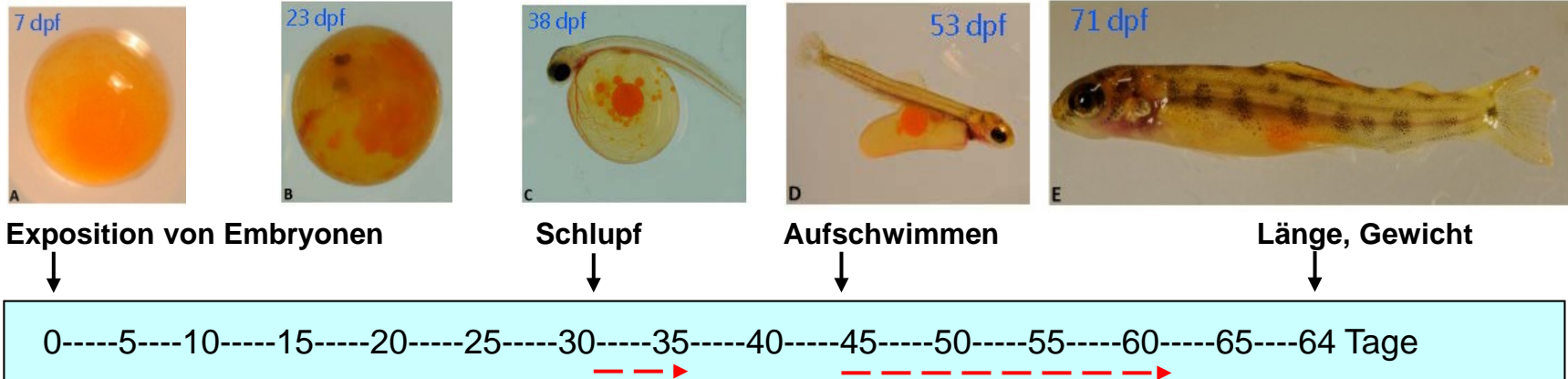
Was haben *in vivo*-Biotests mit Fischen gezeigt?

Fish Early Life Stage Toxicity Test (FELST, OECD 210)



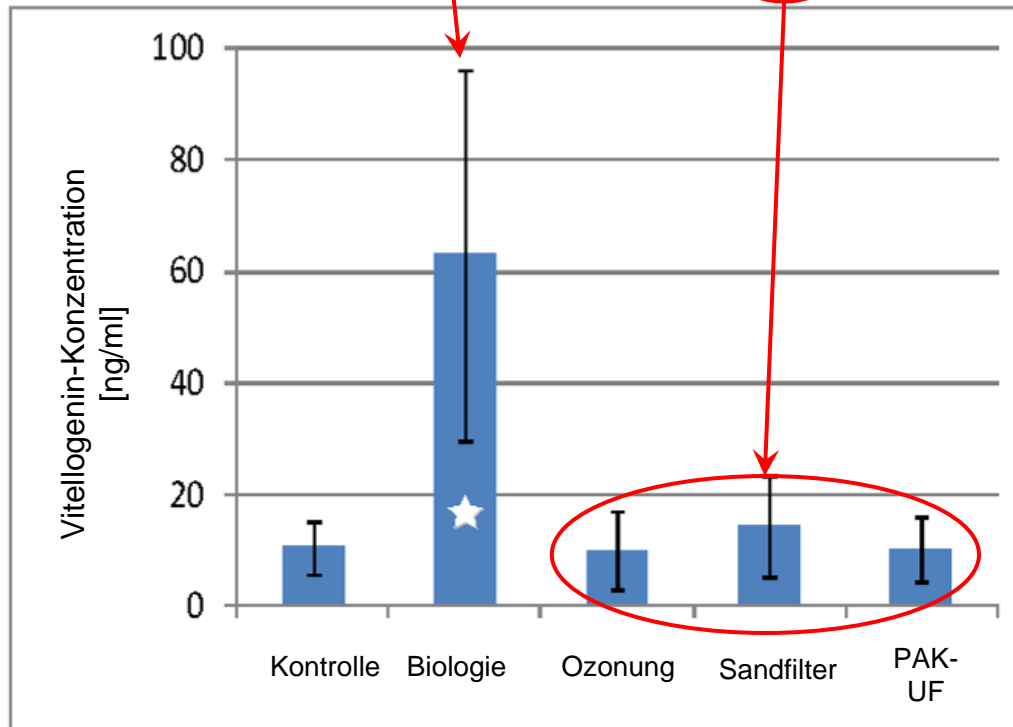
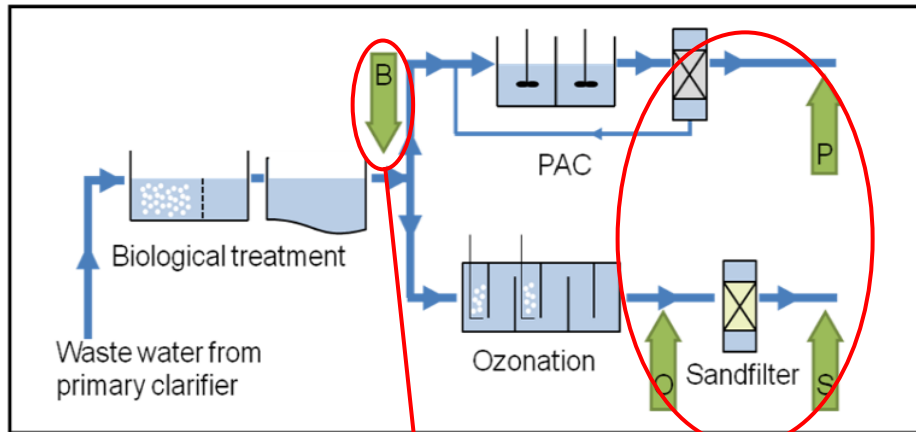
By US Fish and Wildlife Service

- **Testorganismus:** Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)
- **Prinzip:** Beobachtung der **Entwicklung von Fisch-Embryonen und Larven** über 64 Tage im Durchfluss
- **Endpunkte:**





Was haben *in vivo*-Biotests mit Fischen gezeigt?





Was haben *in vivo*-Biotests mit Fischen gezeigt?

↓ abnehmende Effekte, ~ gleichbleibende Effekte, ↑ zunehmende Effekte

Testname und Testorganismus	Untersuchte Parameter	Biologische Behandlung	Ozonung	Ozonung + Sandfiltration	Pulveraktivkohle - UF
Fish early life stage toxicity Test mit Regenbogenforellen (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Gesamtüberlebensrate		↓	↓	↓
	Überleben von Embryonen		~	~	↓
	Überleben von Larven und Jungfischen		↓	↓	↓
	Schlupfrate		~	~	↓
	Aufschwimmen der geschlüpften Larven		↓	↓	↓
	Frischgewicht am Testende		↓	↓	↓
	Länge der Larven am Testende		~	~	↓
	Vitellogenin-Konzentration		↓	↓	↓



Fazit aus bisherigen Studien zur Abwasserbeurteilung

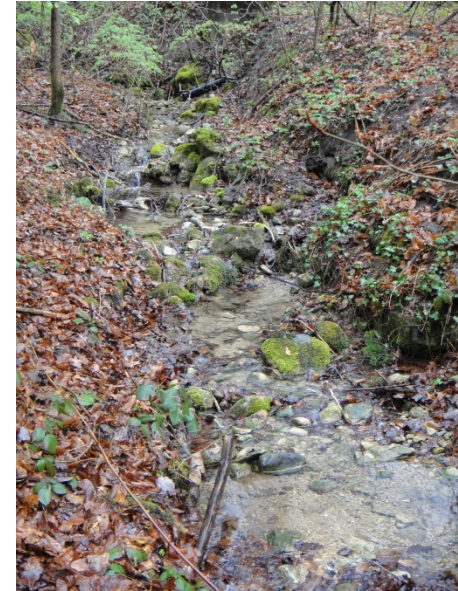
- Biotests sind sinnvolle Ergänzung zur Gesamtbeurteilung von weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren
- Einsatz für Leistungsbeurteilung möglich, hierfür:
 - Effektspezifische *in vitro*-Biotests geeigneter als Mehrzahl verfügbarer *in vivo*-Biotests
 - Weitere Standardisierung geeigneter *in vitro*-Biotests nötig
 - Einzelne *in vivo*-Biotests gut geeignet u.a. *fish early life stage toxicity* Test mit Regenbogenforellen
- Breites Spektrum von Mikroverunreinigungen zu mehr als 80% entfernt
- Nach Ozonung sollte immer Stufe mit biologischer Aktivität, z.B. Sandfilter, nachgeschaltet werden, um Risiko des Eintrags von toxischen und biologisch abbaubaren Umwandlungsprodukten in die Wasserkörper zu verringern.



Wie können Biotests zur
Beurteilung von
abwasserbelasteten
Oberflächengewässern
eingesetzt werden?



Wie beurteilt man die Qualität von Oberflächengewässern?



schlecht

mässig

sehr gut



Das Modul-Stufen-Konzept

Ziel: Standardisierte Methoden zur Beurteilung der Gewässerqualität als Entscheidungshilfe für Kantone

Module: Ökomorphologie

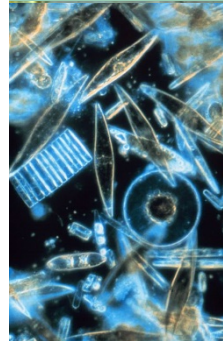


Biologie

Kieselalgen

Wirbellose

Fische



Chemie /
Ökotoxikologie



Partner:

eawag
aquatic research



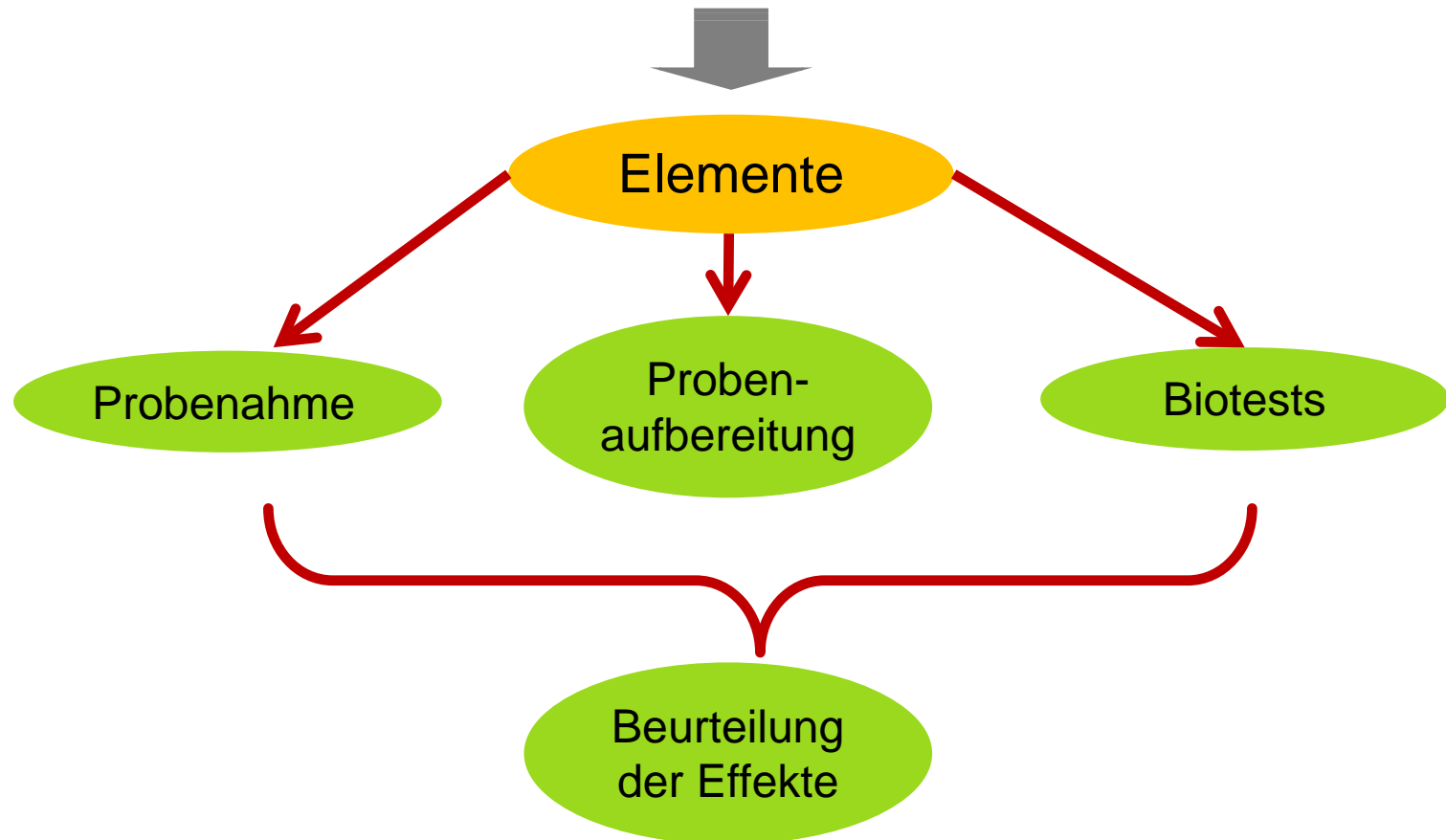
Bundesamt für Umwelt
BAFU

Kantonale Umweltämter



Zielsetzung

Entwicklung eines **belastbaren Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests.**





Welche Biotests eignen sich für eine erste Beurteilung?

Kriterien für Biotests:

- geeignet für Umweltproben (Abwasser- und Oberflächengewässerproben)
- empfindlich
- robust
- möglichst weitgehend validiert und standardisiert
- kostengünstig und einfach routinemässig anwendbar
- anwendbar in kantonalen Gewässerschutz- und Privaten-Laboren

Für die Grobbeurteilung wurden ausgewählt:

- **Hefezellöstrogentest** (Yeast Estrogen Screen, YES) zur Messung östrogen-aktiver Substanzen
- **Kombinierter Algentest** zur Messung von Photosystem II- (und Wachstums-) hemmenden Stoffen (z.B. bestimmte Pestizide)



Wie können östrogen-aktive Stoffe im Biotest nachgewiesen werden?

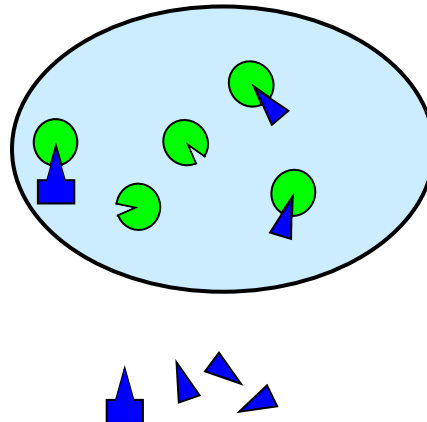
Hefezell-Östrogentest (Yeast Estrogen Screen (YES)) (nach Routledge und Sumpter 1996, ETC)



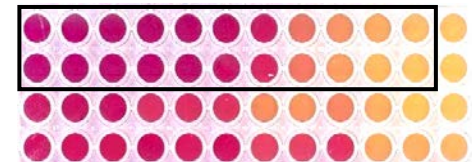
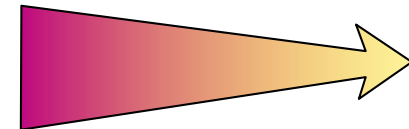
- **Testorganismus:** Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)
- **Prinzip:**



Genmodifizierte Hefe in gelbem Medium



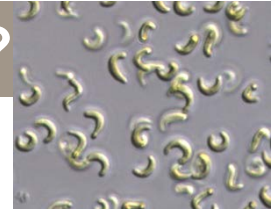
17 β -Östradiol



EEQ:
17 β -Östradiol Äquivalente

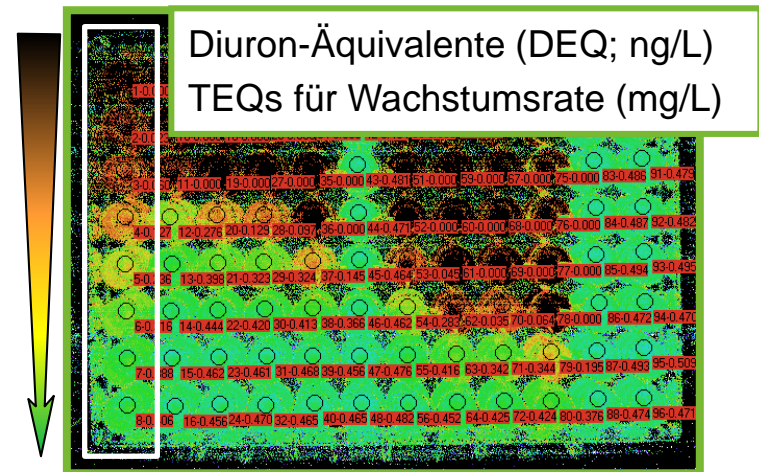
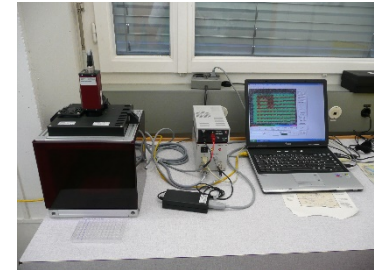


Wie lassen sich herbizide Wirkungen nachweisen?



Kombinierter Algentest (Quayle et al, 2008, Eawag)

- **Testorganismus:** einzellige Süßwasser-Grünalge (z.B. *Pseudokirchneriella subcapitata*)
- **Prinzip:**
Bestimmung von Auswirkungen auf
 - 1) **Photosyntheseaktivität** und/oder
 - 2) **Wachstum** von Algen
- **Dauer:** 24 h
- **Endpunkte:** Photosynthese-, Wachstumshemmung (%)
- **Toxizitätsparameter:** EC_x, Diuron-Äquivalenz-Konzentration (DEQ), Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentration (TEQ)





Wie ist das Vorgehen für die Gewässerbeurteilung?

Grobbeurteilung von abwasserbelasteten Fließgewässern

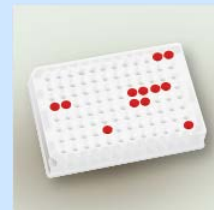
Wie hoch ist der Abwasseranteil
im Gewässer?

größer 10% Prozent



Wie hoch ist die Belastung des
Abwasser?

Beurteilung durch Biotest



Wie hoch ist die Belastung im
Gewässer?

Verdünnung



**Ökotoxikologische Bewertung
der Belastung**





Wie ist das Vorgehen für die Gewässerbeurteilung?

Grobbeurteilung von abwasserbelasteten Fließgewässern

Vorteile der Methode:

- Messung im Abwasser aufgrund höherer Konzentrationen zuverlässiger
- Entnahme von Sammelproben über mehrere Tage einfach organisierbar

Nachteile:

- Vorbelastung und diffuse Einträge werden nicht erfasst

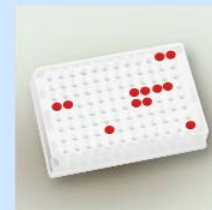
Wie hoch ist der Abwasseranteil
im Gewässer?

größer 10% Prozent



Wie hoch ist die Belastung des
Abwasser?

Beurteilung durch Biotest



Wie hoch ist die Belastung im
Gewässer?

Verdünnung



**Ökotoxikologische Bewertung
der Belastung**





Beurteilung der Wasserqualität anhand der ausgewählten Biotests

Risikobeurteilung

$$\text{Risikoquotient (RQ)} = \frac{\text{TEQ}}{\text{EQS}} =$$

<1 Qualitätskriterium
eingehalten
>1 Qualitätskriterium
überschritten

mit:

TEQ = Toxizitätsäquivalenz-Konzentration

EQS = Umweltqualitätskriterium

Verwendete chronische Umweltqualitätskriterien für Beurteilung:

- Östrogene Wirkung: EQS für 17 β -Estradiol = 0.4 ng/L
- PSII-hemmende Wirkung: EQS für Diuron = 20 ng/L



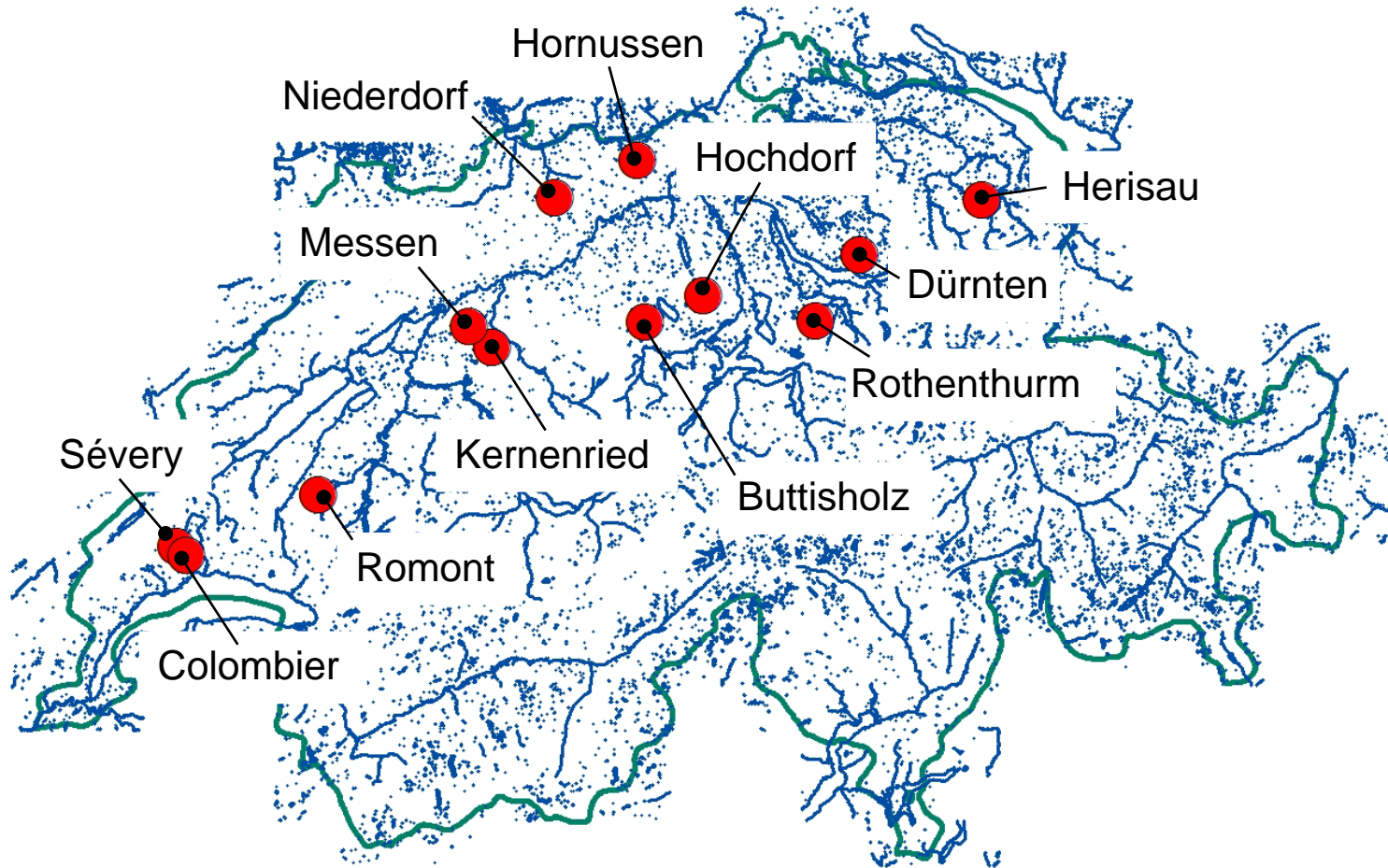
Einteilung in Gewässergüteklassen analog MSK

Vorschlag für eine Einteilung in 5 Klassen

Beurteilung		Bedingung/Beschreibung		Einhaltung Zielvorgabe
	sehr gut	TEQ mehr als 10 Mal kleiner als chronisches Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	$RQ < 0.1$	Eingehalten
	gut	TEQ 1 bis 10 Mal kleiner als chronisches Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	$0.1 \leq RQ < 1$	
	mässig	TEQ kleiner als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	$1 \leq RQ < 2.5$	Überschritten
	unbefriedigend	TEQ gleich oder grösser als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	$2.5 \leq RQ < 10$	
	schlecht	TEQ gleich oder grösser als das 10-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	$RQ \geq 10$	

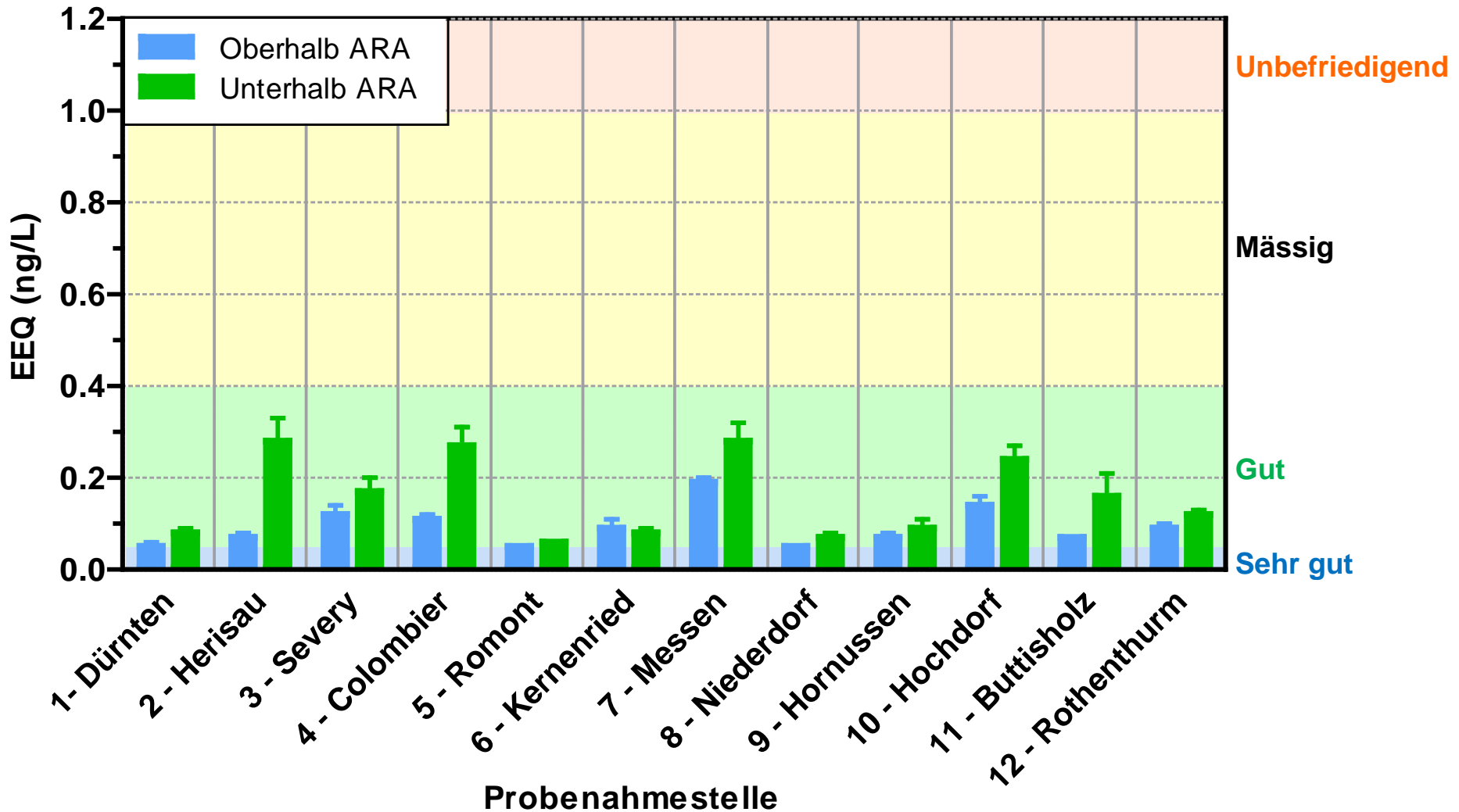


Fallstudie: Östrogene Aktivität und Photosystem II-hemmende Wirkung in Schweizer Kläranlagenabläufen und Fließgewässern (Projekt EcoImpact)





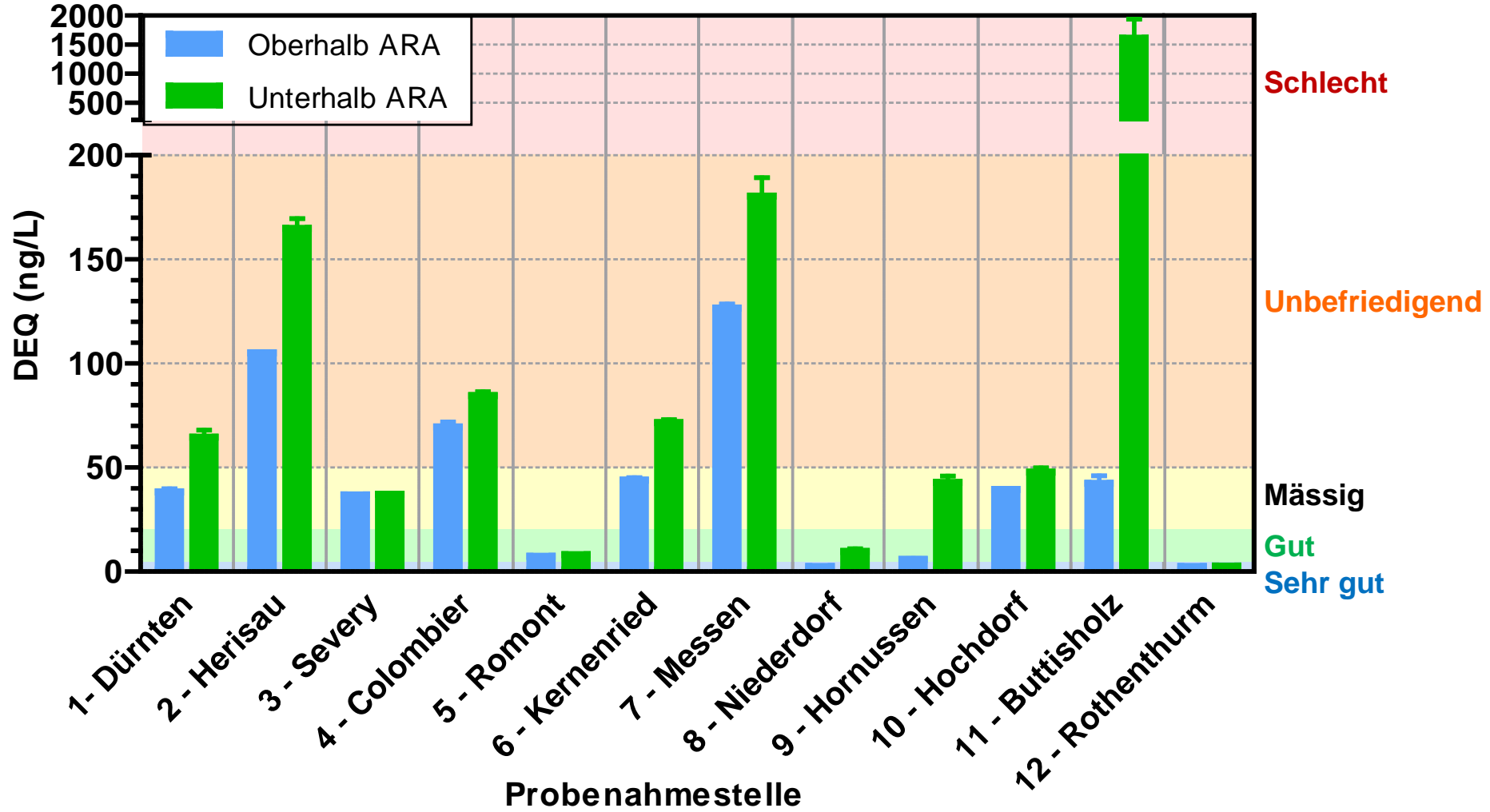
YES – Beurteilung im vorläufigen 5-Klassen-System



EEQ = Östradiol-Äquivalenz-Konzentration



Algentest – Beurteilung im vorläufigen 5-Klassen-System



DEQ = Diuron-Äquivalenz-Konzentration



TAKE HOME MESSAGES

- Mikroverunreinigungen haben negative Auswirkungen auf Wasserlebewesen.
- Biotests sind geeignet um diese Auswirkungen und deren Verringerung zu messen.
- Wirkungen auf Wasserlebewesen lassen sich mit weitergehenden technischen Verfahren eliminieren.

→ **Verbesserter Schutz der
Gewässerökosysteme**



Weitere Informationen zu Biotests

18 | FACHARTIKEL

AQUA & GAS N° 7/8 | 2015

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 Routineeinsatz 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

Kienle C, Kase R, Schärer M, Werner I, 2015. Ökotoxikologische Biotests - Anwendung von Biotests zur Evaluation der Wirkung und Elimination von Mikroverunreinigungen. Aqua & Gas 7/8:18-26.

Kienle C, Vermeirssen E, Kunz PY, Werner I, 2015. Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Eawag-EPFL, Dübendorf.

oekotoxzentrum
centre ecotox

Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée
Eawag-EPFL

Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests

Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

2015



Danksagung

Vielen Dank an:

- das BAFU, die EU (FP7 Projekt Demeau) und das Oekotoxzentrum für die finanzielle Unterstützung,
- die Begleitgruppe aus Vertretern des BAFU, der kantonalen Fachstellen, privaten Labors und allen anderen Experten für die fachliche Begleitung,
- meine Kollegen vom Oekotoxzentrum, von der RWTH Aachen, der EPFL und der Eawag, ebenso wie die Betreiber der ARAs für die experimentelle und fachliche Unterstützung.

Kontakt: cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch