

Abschlussbericht

Kombinierte chemische und ökotoxikologische Überwachung von Schadstoffen in Gewässern

von:

Sabine Schäfer, Julia Bachtin, Corinna Becker, Sebastian Buchinger, Christian Kochleus, Christel Möhlenkamp, Georg Reifferscheid, Denise Spira, Benjamin Becker Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz

Herausgeber: Umweltbundesamt



TEXTE 113/2021

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3716 22 2060 FB000527

Abschlussbericht

Kombinierte chemische und ökotoxikologische Überwachung von Schadstoffen in Gewässern

von

Sabine Schäfer, Julia Bachtin, Corinna Becker, Sebastian Buchinger, Christian Kochleus, Christel Möhlenkamp, Georg Reifferscheid, Denise Spira, Benjamin Becker

Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau Tel: +49 340-2103-0 Fax: +49 340-2103-2285 <u>buergerservice@uba.de</u> Internet: <u>www.umweltbundesamt.de</u>

I/umweltbundesamt.de **Y**/umweltbundesamt

Durchführung der Studie:

Bundesanstalt für Gewässerkunde Am Mainzer Tor 1 56068 Koblenz

Abschlussdatum: Dezember 2019

Redaktion: Fachgebiet II 2.5 Labor für Wasseranalytik Anja Duffek

Publikationen als pdf: http://www.umweltbundesamt.de/publikationen

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Juli 2021

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Danksagung

Wir danken dem Umweltbundesamt und dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit für die Finanzierung dieses Projektes im Rahmen des REFOPLAN. Besonderer Dank gilt Anja Duffek für die gute Zusammenarbeit und der Projektbetreuung von Seiten des UBA. Wir danken Etienne Vermeirssen (Oekotoxzentrum, CH) für seine wissenschaftliche Expertise und praktische Unterstützung insbesondere bei der Anwendung der Chemcatcher[®].

Wir danken unseren Kolleginnen und Kollegen an der BfG für Ihre Unterstützung und Mitarbeit im Rahmen des Projektes: Evelyn Claus danken wir für ihre konzeptionelle Arbeit und Unterstützung bei der Beantragung des Projektes. Marina Ohlig, Ramona Pfänder, Stefanie Wunsch, Angela Koppers und Anna Maria Bell danken wir für die technische Unterstützung bei den Biotesten. Carolin Riegraf gilt unser Dank für ihre wissenschaftliche Expertise und ihre technische Unterstützung insbesondere bei den planaren Biotesten. Julia Regnery, Robert S. Schulz und Pia Parrhysius danken wir für die Unterstützung bei der Probenahme in der Kläranlage. Vielen Dank auch an Julia Regnery für das Korrekturlesen englischsprachiger Kapitel und die Unterstützung bei der Erstellung des barrierefreien Dokumentes. Unser Dank gilt auch Volker Schwaninger und Klaus Güls für den Bau und Tipps zum Bau von Vorrichtungen zum Ausbringen von Passivsammlern und Kirstin Grabosch für die administrative Abwicklung des Projektes an der BfG.

Für die Informationen zum Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft danken wir Andreas Seul. Martin Hoffmann (SGD Nord) und Nadine Becker (MUEFF, RLP) danken wir für den Austausch zu Untersuchungen im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs und Dieter Hochdörfer und Dennis Schober für die Unterstützung der Probenahmen in der Kläranlage.

Kurzbeschreibung: Kombinierte chemische und ökotoxikologische Überwachung von Schadstoffen in Gewässern

Passivsammler reichern Schadstoffe in einer Sammelphase an, wenn sie in der Umwelt exponiert werden. Wenn Passivsammlerextrakte anschließend im Labor in Biotesten eingesetzt werden, kann das toxische Potential der Proben bestimmt werden, welches die Belastungssituation während der Expositionszeit der Sammler widerspiegelt. In dieser Studie wurde die Kombination der passiven Probenahme mit effekt-basierten Methoden für die Untersuchung der Oberflächengewässerqualität getestet. Silikonstreifen und Chemcatcher® wurden mehrere Wochen in Fließgewässern oder in einer kommunalen Kläranlage exponiert. Im Labor wurden Passivsammlerextrakte in verschiedenen Biotesten für phytotoxische, endokrine und dioxin-ähnliche Wirkungen untersucht und zusätzlich wurden Schadstoffkonzentrationen mittels LC-MS/MS oder GC-MS/MS quantifiziert. Zwei Bioteste, der Photosystem II-Inhibitionstest und der Yeast Estrogen Screen, wurden konventionell in Mikrotiterplatten und - für eine wirkungsorientierte Analyse - nach chromatographischer Fraktionierung der Proben auf einer Dünnschichtplatte als planare Bioteste durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnten nicht nur räumliche und zeitliche Unterschiede in der Belastung eines Flusseinzugsgebietes mit phytotoxischen und endokrinen Substanzen detektiert, sondern auch Wirkprofile bewertet werden. In der Kläranlage zeigten die Wirkprofile die Elimination aber auch die Bildung phytotoxisch und endokrin wirkender Substanzen während der Abwasserbehandlung. Insgesamt hat die Kombination der passiven Probenahme mit effektbasierten Methoden ein enormes Potential für das Monitoring von Oberflächengewässern beispielsweise für die Bewertung der Effizienz von Kläranlagen und der Kontrolle von Maßnahmen an Gewässern (z.B. Baumaßnahmen). In künftigen Studien könnten für eine wirkungsorientierte Analyse weitere planare in vitro Bioteste mit der passiven Probenahme kombiniert werden. Für die Anwendung im Routinemonitoring sind die Optimierung und Standardisierung der Methoden notwendig.

Abstract: Combined chemical and ecotoxicological monitoring of contaminants in surface waters

Passive samplers accumulate contaminants in a sampling phase while being exposed in the environment. If the passive sampler extracts are subsequently subjected to bioassays integrative signals of toxic effects can be obtained that reflect the toxicological situation in the environment over the exposure time of the passive samplers. We tested this combination of passive sampling and effect-based methods for its applicability in surface waters. Silicone rubber sheets and Chemcatcher® were exposed for several weeks either in rivers or in a municipal waste water treatment plant. In the laboratory, passive sampler extracts were analysed in bioassays for phytotoxic, endocrine and dioxin-like activity and, additionally, contaminants were quantified by LC-MS/MS or GC-MS/MS. Two bioassays, the Photosystem II-inhibition assays and the Yeast Estrogen Screen, were applied conventionally in microplates and for effect directed analysis after chromatographic fractionation of the samples on a thin-layer plate as planar bioassays. With this approach, we could not only show differences in phytotoxic and endocrine potential in space and time in a river catchment but also assess activity profiles. In the WWTP, activity profiles indicate both elimination and formation of phytotoxic and endocrine active contaminants during the wastewater treatment train. Overall, the combination of passive sampling with effect-based methods has a high potential for surface water monitoring in particular for assessing the efficiency of waste water treatment and the effectiveness of measures in water bodies (e.g. construction work). For effect directed analysis, further planar in vitro bioassays could be combined with passive sampling to investigate other endocrine effects and dioxin-like activity in future studies. For application in routine monitoring campaigns, the methods need to be optimized and standardized.

Inhaltsverzeichnis

A	bbildun	gsverzeichnis	9
Τa	abellenv	/erzeichnis	9
A	bkürzun	ngsverzeichnis	11
Zι	usamme	enfassung	13
Sι	ummary	/	18
1	Ziele	e des Forschungsvorhabens	23
2	Unte	ersuchte Wasserkörper	25
3	Unte	ersuchung phytotoxischer Wirkungen	27
	3.1	Einleitung	27
	3.2	Ergebnisse und Diskussion	28
	3.2.1	Feldstudie zur Überwachung von Oberflächengewässer	28
	3.2.1.1	Limnischer Grünalgentest mit Desmodesmus subspicatus	28
	3.2.1.2	Hemmung der Photosynthese (Photosystem II)	30
	3.2.2	Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage	36
4	Unte	ersuchung östrogener Wirkungen	40
	4.1	Einleitung	40
	4.2	Ergebnisse und Diskussion	41
	4.2.1	Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage	41
	4.2.1.1	YES	41
	4.2.1.2	p-YES	43
	4.2.2	Feldstudie zur Überwachung von Oberflächengewässern	45
5	Unte	ersuchung dioxin-ähnlicher Wirkungen	48
	5.1	Einleitung	48
	5.2	Ergebnisse und Diskussion	49
6	Schl	ussfolgerung	53
7	Aust	olick	56
8	Mate	erial und Methoden	59
	8.1	Passive Probenahme	59
	8.2	Extraktion der Passivsammler	61
	8.3	Festphasenextraktion von Wasserproben	63
	8.4	Monitoring	63
	8.4.1	Flusseinzugsgebiet der Nette	63
	8.4.2	Kläranlage	65

8	3.4.3	Altlasten in Oberflächengewässern	67
8	3.5	Bioteste	68
8	3.5.1	Limnischer Grünalgentest	70
8	3.5.2	Grünalgentest im Mikrotiterplattenformat	70
8	3.5.3	Reportergentests im Mikrotiterplattenformat (YES und YDS)	70
8	3.5.3.1	Testdurchführung	71
8	3.5.3.2	Testauswertung	72
8	3.5.4	Bioteste auf Dünnschichtplatte (p-YES, p-PSII-Inhibition)	72
8	3.5.4.1	Durchführung der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	73
8	3.5.4.2	Hefezellbasierter Biotest (p-YES)	73
8	3.5.4.3	Algenbasierter Biotest (p-PSII-Test)	74
8	3.6	Chemische Analyse der Passivsammlerextrakte	75
8	3.6.1	Photosynthese II- Inhibitoren und Östrogene	75
8	3.6.2	Referenzverbindungen für die Bestimmung von Sammelraten	75
8	3.6.3	PCDD/F und dl-PCB	76
9	Quell	lenverzeichnis	77
10	Anlag	gen	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Probenahmestandorte und -kampagnen im Flusseinzugsgebiet
	der Nette25
Abbildung 2:	Toxizität von Passivsammlerextrakten im limnischen
	Grünalgentest
Abbildung 3:	PSII-Inhibition im Oberflächengewässer nach
	Dünnschichtchromatographie32
Abbildung 4:	PSII-Inhibition in Kläranlagenproben nach
	Dünnschichtchromatographie37
Abbildung 5:	Östrogene Wirkung von Proben aus einer Kläranlage42
Abbildung 6:	Kläranlage: Östrogene Wirkung nach
	Dünnschichtchromatographie44
Abbildung 7:	Oberflächengewässer: Östrogene Wirkungen nach
	Dünnschichtchromatographie47
Abbildung 8:	Dioxinähnliche Wirkung im YDS50
Abbildung 9:	Dioxinähnliche Wirkung im YDS nach Standardaddition51
Abbildung 10:	Ausbringvorrichtungen für Silikonstreifen61
Abbildung 11:	Ausbringvorrichtungen für Chemcatcher [®] 61
Abbildung 12:	Extraktion der Passivsammler und Vorbereitung der Extrakte
	für die Bioteste und die chemische Analytik62
Abbildung 13:	Probenahmestandorte im Flusseinzugsgebiet der Nette64
Abbildung 14:	Probenahmstandorte im Flusseinzugsgebiet der Nette64
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der untersuchten kommunalen
	Kläranlage66
Abbildung 16:	Probenahmestellen in der kommunalen Kläranlage66
Abbildung 17:	Probenahmestandorte in Oberflächengewässern67
Abbildung 18:	Probenahmestellen im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die untersuchten Wirkmechanismen mit den
	Anwendungsbeispielen, den verwendeten Passivsammlern und
	Biotesten23
Tabelle 2	Hemmung des Photosystems II im Flusseinzugsgebiet der Nette
Tabelle 3:	Hemmung des Photosystems II im Flusseinzugsgebiet der Nette
	nach chromatographischer Auftrennung34
Tabelle 4:	Hemmung des Photosystems II über fünf Kampagnen am
	Standort 5 nach chromatographischer Auftrennung
Tabelle 5:	Hemmung des Photosystems II in einer Kläranlage nach
	chromatographischer Auftrennung38
Tabelle 6:	Konzentrationen von Hormonen in Passivsammlerextrakten .42

Tabelle 7:	Ablauf der passiven Probenahme für Silikonstreifen und	
	Chemcatcher [®]	.59
Tabelle 8:	Probenahmekampagnen im Flusseinzugsgebiet der Nette	.65
Tabelle 9:	Übersicht über angewandte Bioteste	.69
Tabelle 10:	Verwendete Reportergentests im Mikrotiterplattenformat	.71
Tabelle 11:	Verwendete Bioteste auf Dünnschichtplatte	.72

Abkürzungsverzeichnis

2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
4-MU	4-Methylumbelliferon
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AU	Arbiträre Einheit, engl. arbitrary unit
В	Regressionsparameter
BfG	Bundesanstalt für Gewässerkunde
BG	Bestimmungsgrenze
CALUX	Transgene Säugerzelllinie für die Untersuchung dioxin-ähnlicher Wirkungen
CPRG	Chlorophenol Rot-β-D-Galactopyranosid
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dl-PCB	Dioxin-ähnliche polychlorierte Biphenyle
DR CALUX	Dioxin Responsive-Chemically Activated LUciferase gene eXpression, Biotest mit H4IIE-luc Zellen
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EC50	Mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird
EE2	17α-Ethinylestradiol
EEQ	17 eta -Estradiol-Äquivalent (engl. 17 eta -Estradiol-Equivalent)
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
F'm	Maximal emittierte Fluoreszenz
FT	Fluoreszenzausbeute
GC-MS/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
H4IIE-luc	Transgene Rattenzelllinie, mit der Arylhydrocarbon-Rezeptor vermittelte Wirkungen untersucht werden können
НСВ	Hexachlorbenzol
HCBD	Hexachlorbutadien
h-ERα	Humaner Östrogenrezeptor
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie, engl. high-performance thin- layer chromatography
IPAM	Imaging-Pulse-Amplitude-Modulation
k.A.	Keine Angabe
Kow	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
lac-Z	Gen des Lactose-Operons von <i>Escherichia coli,</i> das das Enzym β -Galactosidase kodiert
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl. limit of quantification
Μ	Molekülmasse in g mol ⁻¹
MELN	Transgene humane Zelllinie
MHQ	Mittlerer Hochwasserabfluss

2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
MQ	Mittlerer Abfluss
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid
MVLN	Transgene humane Zelllinie
βΝϜ	ß-Naphthoflavon
n.b.	Nicht bestimmt
n.d.	Nicht detektiert
NEFQ	ß-Naphthoflavon-Äquivalente
n.v.	Nicht valide
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
РАК	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBDE	Polybromierte Diphenylether
РСВ	Polychlorierte Biphenyle
PCDD/F	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane
POCIS	Polar organic integrative sampler
p-PSII	Planarer Photosystem II Inhibitionstest
PRC	Referenzverbindungen, engl. performance reference compounds
PSII	Photosystem II
p-YES	Planarer Yeast Estrogen Screen
RF	Retentionsfaktor
RLP	Rheinland-Pfalz
Rs bzw. Rs(300)	Sammelrate bzw. Sammelrate für eine Substanz mit einer Molekülmasse von 300 g mol ⁻¹
SDB-RPS	Poly(styrenedivinylbenzen)-Copolymer, modifiziert mit Sulfonsäuregruppen, engl. styrenedivinylbenzene reverse phase sulfonated
SP	Gesättigter Lichtimpuls, engl. saturation pulse
SPE	Festphasenextraktion, engl. solid phase extraction
SPMD	Passivsammler mit semipermeabler Membran, engl. semipermeable membrane device
TEQ	Toxizität-Äquivalente, engl. toxicity equivalent
U.S. EPA	Umweltbehörde der USA, engl. Environmental Protection Agency
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organisation
YII	Quantenausbeute des Photosystems II
YDS	Yeast Dioxin Screen
YES	Yeast Estrogen Screen

Zusammenfassung

Passivsammler reichern Chemikalien in einer sorbierenden Phase, z.B. einem Polymer an, wenn sie in der Umwelt exponiert werden. Anschließend gewonnene Extrakte von Passivsammlern können nicht nur chemisch analysiert werden, sondern auch in Biotesten eingesetzt werden, um toxische Wirkungen zu untersuchen. Da Passivsammler über die Expositionszeit Umweltschadstoffe sammeln, kann auf diese Weise ein integratives Signal toxischer Effekte erhalten werden. Die Kombination von Passivsammlern für die Probenahme komplexer Mischungen von Umweltchemikalien in Gewässern und der Transfer dieser Chemikalienmischungen in Bioteste sind bislang wenig erforscht. Sie bietet jedoch ein enormes Potential für die Verbesserung der Umweltrisikobewertung von Gewässerbelastungen.

In dieser Studie wurden Passivsammlerextrakte in Biotesten eingesetzt, um zu prüfen, ob dieses Verfahren als Warnsystem bei der Minderung der Qualität von Oberflächengewässern geeignet ist. Dazu wurden Passivsammler mehrere Wochen in Oberflächengewässern und in einer Kläranlage exponiert und deren Extrakte auf phytotoxische, endokrine und/oder dioxinähnliche Wirkungen untersucht. Als Passivsammler wurden entweder Silikonstreifen eingesetzt, in denen sich vor allem hydrophobe organische Chemikalien anreichern, sowie Chemcatcher®-Disks mit einem Poly(styrenedivinylbenzen)-Copolymer, modifiziert mit Sulfongruppen (SDB-RPS-Disks), als Sammlerpolymer, die häufig für die Untersuchung von weniger hydrophoben organischen Schadstoffen genutzt werden. Die Passivsammler wurden im Feld exponiert und deren Lösemittelextrakte anschließend im Labor in verschiedenen biologischen Testsystemen untersucht.

Untersuchung phytotoxischer Wirkungen

Für die Untersuchung phytotoxischer Effekte wurden verschiedene Bioteste mit der limnischen Grünalge *Desmodesmus subspicatus* durchgeführt. Als ein Maß für unspezifische Phytotoxizität wurde zunächst die Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz von *D. subspicatus* (DIN 1991, LAWA 1998) bei Exposition mit Passivsammlerextrakten bestimmt. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Test wenig sensitiv ist und eine große Menge an Passivsammlerextrakt benötigt wird, so dass er für die Routineanwendung kaum geeignet ist.

Als spezifischer Endpunkt wurde die Hemmung des Photosystems II (PSII) mittels maxi Imaging-Pulse-Amplitude-Modulation (IPAM) bestimmt. PSII-Inhibitoren, zu denen auch die weltweit am meisten genutzten Herbizid-Wirkstoffe Atrazin und Diuron gehören, konkurrieren mit Plastochinon um die Bindung an das D1-Protein des PSII in der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Durch diese Blockade wird der photosynthetische Elektronentransport unterbrochen, so dass die Quantenausbeute des PSII reduziert wird (Muller et al. 2008, Riegraf et al. 2019a). Dieser Test wurde zunächst im Mikrotiterplattenformat an Extrakten von Chemcatchern[®] durchgeführt, die im April/Mai 2018 an verschiedenen Standorten im Flusseinzugsgebiet der Nette (RLP) exponiert worden waren. Die Nette, ein Fließgewässer mittlerer Größe (Einzugsgebiet: 370.000 km², mittlerer Abfluss: 2,31 m³/s), die in der Nähe von Koblenz in den Rhein mündet, wurde unter anderem aufgrund der landwirtschaftlichen Nutzung des Einzugsgebietes ausgewählt (Theisen 2018, Statistisches Landesamt RLP 2016). An den sechs verschiedenen Standorten im Untersuchungsgebiet wurde die stärkste Hemmung des PSII im der Ortsgemeinde Plaidt (6.000 Einwohner) gemessen. In quellnahen Bereichen der Nette und des Krufter Bachs, einem Zufluss der Nette, konnten keine bzw. eine um den Faktor 30 geringere Hemmung des PSII detektiert wurde.

Um die verschiedenen Standorte bezüglich der Hemmung des PSII genauer charakterisieren zu können, wurden Chemcatcher®-Extrakte in einem planaren algenbasierten Biotest, dem sog. planaren PSII-Inhibitionstest (p-PSII) untersucht, mit dem die Hemmung des PSII nach chromatographischer Auftrennung der Probe ermittelt wird. Dazu wurden Passivsammlerextrakte auf Dünnschichtplatten aufgetragen, das Lösemittel bis zur Trockene eingeengt und die Extrakte chromatographisch aufgetrennt, bevor die Algen auf die Dünnschichtplatte aufgebracht und der Biotest durchgeführt wurde. Durch die Fraktionierung der Proben auf der Dünnschichtplatte und den Vergleich der Mobilität der gemessenen Signale mit der bekannter PSII-Inhibitoren, können Aktivitätsprofile verschiedener Proben verglichen werden (Riegraf et al. 2019a). An den sechs Standorten aus dem Untersuchungsgebiet zeigte sich erneut in Plaidt flussaufwärts der Mündung des Krufter Baches die höchste und im quellnahen Bereich der Nette eine sehr geringe Inhibition des PSII. Fünf Signale auf der Dünnschichtplatte wurden quantitativ ausgewertet, wobei vier der Signale eine ähnliche Mobilität auf der Dünnschichtplatte aufwiesen wie die Referenzsubstanzen Diuron, Simazin, Atrazin und Terbutryn. An der Quelle des Krufter Baches konnten deutliche Wirksignale mit einer Hemmung des PSII von bis zu 21% nachgewiesen werden, die eine Belastung dieses Standortes mit PSII-Inhibitoren anzeigt. Im Vergleich zu den nahe gelegenen Standorten in der Nette wurde in der Mündung des Krufter Baches keine Hemmwirkung auf Höhe des Signals der Referenzsubstanz Atrazin detektiert. Um mögliche temporäre Einträge von PSII-Inhibitoren zu untersuchen, wurden Chemcatcher® in fünf aufeinanderfolgenden Probenahmekampagnen zwischen März und Juli 2018, jeweils zwei Wochen in der Nette in Plaidt flussabwärts der Mündung des Krufter Baches exponiert. Im p-PSII-Test nahm die Hemmwirkung des Signals auf der Höhe der Referenzsubstanz Terbutryn von den ersten Kampagnen bis zur 5. Kampagne rum den Faktor 8 zu. Auch die chemische Analyse der Chemcatcher®-Extrakte zeigte im gleichen Zeitraum eine Zunahme der Terbutryn-Konzentration von ca. 13 auf 54 ng Disk-1.

Chemcatcher[®] wurden auch vier Wochen in der Kläranlage (120.000 Einwohnergleichwerte) einer rheinland-pfälzischen Mittelstadt exponiert und deren Extrakte mittels p-PSII-Inhibitonstests untersucht. Sowohl im Zu- als auch im Ablauf der Kläranlage konnte die Inhibition des PSII nachgewiesen werden, wobei die Aktivitätsprofile darauf hindeuten, dass in der Kläranlage eine PSII-inhibierende Substanz abgebaut wird. Im Gegensatz dazu wurden in der Ablaufprobe zwei Signale nachgewiesen, die im Zulauf nicht detektiert wurden und die Bildung von Transformationsprodukten anzeigen könnten.

Untersuchung östrogener Wirkungen

Steroide Östrogene, wie die natürlichen Hormone Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2) sowie das synthetische Hormon 17 α -Ethinylestradiol (EE2) haben aufgrund ihrer stetigen Einträge in Oberflächengewässer und ihrer starken biologischen Potenz eine hohe Umweltrelevanz. Verglichen mit der chemischen Analytik sind effekt-basierte Methoden für die Untersuchung östrogener Wirkungen sehr sensitiv und wurden daher als ergänzendes Monitoringwerkzeug vorgeschlagen (Könnemann et al. 2018). In dieser Studie wurden der Yeast Estrogen Screen (YES) und der planare YES (p-YES) genutzt, um das östrogene Potential in Extrakten von Passivsammlern zu untersuchen, die in der oben genannten Kläranlage und im Flusseinzugsgebiet der Nette exponiert worden waren. Der YES ist ein Reportergenassay mit gentechnisch veränderten Zellen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), die den humanen Östrogenrezeptors (hER α) exprimieren und bei Exposition mit Östrogenen das Enzym β -Galaktosidase produzieren, dessen Aktivität photometrisch quantifiziert wird (Routledge and Sumpter 1996). Der p-YES wird, ähnlich wie der p-PSII-Test, auf einer Dünnschichtplatte nach chromatographischer Fraktionierung der Probenextrakte durchgeführt (u.a. Spira et al. 2013). Extrakte von Chemcatchern®, die im Zulauf der Kläranlage exponiert worden waren, zeigten sowohl im YES als auch im p-YES eine um mehr als den Faktor zwei höhere endokrine Wirkung als die Ablaufproben. Auch mittels chemischer Analytik konnten deutlich höhere Konzentrationen hormonaktiver Substanzen in einem Chemcatcher® aus dem Zulauf im Vergleich zu einem aus dem Ablauf nachgewiesen werden. Extrakte parallel ausgebrachter Silikonstreifen zeigten hingegen, möglicherweise durch eine geringere Anreicherung von Östrogenen, nur wenige Positivbefunde im YES. Im p-YES konnten deutliche Aktivitätsprofile in den Chemcatcher®-Proben nachgewiesen und mit mittels Festphasenextraktion (SPE) angereicherten Wassermischproben verglichen werden. In den Zulaufproben wurden die stärksten Fluoreszenzsignale auf der Dünnschichtplatte unter anderem auf der Höhe der Banden der applizierten Standards E1, E2 und E3 gemessen. In den Chemcatcher®-Proben aus dem Ablauf waren zwei Fluoreszenzsignale deutlich niedriger als im Zulauf, was darauf hindeutet, dass diese östrogen aktiven Substanzen in der Kläranlage abgebaut wurden. Insgesamt konnten im p-YES aufgrund der Auftragung der Extrakte auf der Dünnschichtplatte und dem Abdampfen des Lösemittels eine höhere Sensitivität erzielt werden als im YES.

In Chemcatcher[®]-Proben aus dem Flusseinzugsgebiet der Nette wurden ebenfalls östrogene Wirkungen untersucht. Dabei konnten im YES in mehreren Chemcatcher[®]-Proben allerdings nur ein Effekt knapp oberhalb der LOQ detektiert werden, während im p-YES in allen untersuchten Proben Fluoreszenzsignale gemessen wurden. An den sechs untersuchten Standorten konnten in den quellnahen Bereichen der beiden Fließgewässer keine bzw. eine sehr niedrige und in Plaidt oberhalb der Mündung des Krufter Baches die höchste östrogene Wirkung bestimmt werden. Die Probe von der Mündung des Krufter Baches zeigte ein anderes Aktivitätsprofil als die nahe gelegenen Standorte in der Nette. In den verschiedenen Probenahmekampagnen zwischen März und Juni 2018 variierte die gesamte östrogene Aktivität in den Proben eines Standortes max. um den Faktor 1,5. Die stärksten Fluoreszenzsignale wurden in allen Proben auf der Höhe der Fluoreszenzsignale der applizierten Standards E2 und E1 gemessen.

Untersuchung dioxin-ähnlicher Wirkungen

Um dioxin-ähnliche Wirkungen durch die Kopplung von Passivsammlern und Biotesten zu untersuchen, wurden Passivsammler im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs (Einzugsgebiet: 215 km², mittlerer Abfluss 2,36 m³/s) in Rheinland-Pfalz exponiert, der für seine Belastung mit Dioxinen bekannt ist (Engel 2012). Extrakte der Silikonstreifen wurden im Labor im Yeast Dioxin Screen (YDS), einem Reportergentest mit gentechnisch veränderten Zellen der Bäckerhefe (S. cerevisiae), die den humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) tragen, untersucht. Bei Anwesenheit von Agonisten des AhR, wird ähnlich wie im YES, das Enzym β -Galaktosidase produziert, das photometrisch quantifiziert wird (Miller 1999). In Extrakten der Silikonstreifen wurden im Vergleich zu Chemcatcher®- und über SPE-angereicherte Wasserschöpfproben die höchsten dioxin-ähnlichen Wirkungen gefunden. Diese waren in den Silikonstreifenextrakten an beiden untersuchten Standorten ähnlich und lagen etwa um den Faktor 5 über der LOQ. Die chemische Analyse zeigte ebenfalls eine höhere Konzentration an polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen und Dibenzofuranen (PCDD/F) und dioxin-ähnlichen PCB (dl-PCB) in den Silikonstreifen im Vergleich zu den SPE-Extrakten. In den Silikonstreifen ähnelten die Profile der Dioxine denen anderer Umweltproben aus dem Flusseinzugsgebiet (Engel 2012, Kalbhenn und Korte 2015).

Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Studie konnten mit verschiedenen Biotesten für phytotoxische, östrogene und dioxinähnliche Wirkungen ökotoxikologische Effekte von Passivsammlerextrakten nachgewiesen und die Belastung von Oberflächengewässern und einer Kläranlage beispielhaft charakterisiert werden. Dabei wurden unterschiedliche Belastungsmuster verschiedener Standorte und Probenahmekampagnen in den Oberflächengewässern bzw. im Zu- und Ablauf der Kläranlage nachgewiesen. Teilweise wurden unterschiedliche Effekte in Extrakten der beiden verwendeten Passivsammlertypen aufgezeigt, die zumindest zum Teil auf die unterschiedliche Anreicherung verschiedener Schadstoffe bzw. Schadstoffgruppen im Sammlerpolymer zurückgeführt werden können. Der Vergleich von mittels SPE-angereicherten Wasserproben mit Passivsammlern war aufgrund unterschiedlicher Probenahmezeiträume nur eingeschränkt möglich. Für einen adäquateren Vergleich könnten in künftigen Studien parallel zur passiven Probenahme Wassermischproben mit automatischen Probennehmern gesammelt und anschließend mittels biologischer Testverfahren untersucht werden. Neben der in dieser Studie angewandten Kopplungen von Passivsammlern und Biotesten wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Studien veröffentlicht, die die passive Probenahme in aquatischen Lebensräumen mit effektbasierten Methoden verknüpfen, wobei auch andere Typen an Passivsammlern und Biotesten eingesetzt wurden (Jahnke et al. 2016a). Obwohl die passive Probenahme im Vergleich zur Untersuchung von Wasserschöpfproben als eine zeit-integrative Technik gilt (Brack et al. 2017), deuten aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass diese integrierende Funktion bei zeitlich stark variierenden Schadstoffkonzentrationen beeinträchtigt werden kann, was vor allem für polare Substanzen relevant ist, deren Umweltkonzentrationen über die Zeit häufig stark variieren (Kochleus et al. Entwurf). In dem REFOPLAN-Projekt PASTraMi (FKZ: 3717 67 418 0) werden die Effekte von 1.) ereignisbezogenen Schadstoffeinträgen beispielsweise durch Pflanzenschutzmittelwirkstoffe in Oberflächengewässer und 2.) verschiedenen biotischen und abiotische Faktoren auf die Sammeleigenschaften von Passivsammler untersucht. Die Studie soll künftig die Bewertung von mit Passivsammlerdaten und Monitoringergebnissen - einschließlich der Kopplung der passiven Probenahme mit Biotesten - verbessern. Bei der Bewertung von Biotestergebnissen, die anhand von Passivsammlerextrakten gewonnen werden, muss berücksichtigt werden, dass die Mischung der Schadstoffe im Passivsammlerextrakt durch die substanz-spezifische Anreicherung im Sammlerpolymer nicht der in der Umwelt bzw. in der Wasserphase vorhandenen Schadstoffmischung entspricht. Jahnke et al. (2016b) diskutieren daher verschiedene Strategien zum Transfer von Mischungen organischer Schadstoffe aus der aquatischen Umwelt in Bioteste.

Die planaren Bioteste, der p-YES und der p-PSII-Test, wiesen im Vergleich zu ihren Pendants im Mikrotiterplattenformat nicht nur eine höhere Sensitivität auf, sondern sie ermöglichten durch die Fraktionierung der Proben auf der Dünnschichtplatte und den Vergleich von Aktivitätsprofilen mit denen von Standardmischungen auch eine Charakterisierung von Belastungsmustern. So wurden auch unbekannte Substanzen mit phytotoxischem oder östrogenem Potential nachgewiesen und in der Kläranlage gab es Hinweise auf die Elimination bzw. Bildung toxikologisch aktiver Substanzen. Um die toxikologisch aktiven Substanzen zu identifizieren, müssten diese bei den entsprechenden Signalen von den Dünnschichtplatten extrahiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden (Buchinger et al. 2013). Kürzlich konnten Riegraf et al. (2019b) weitere klassische *in vitro* Bioteste mit der Dünnschichtchromatographie koppeln, mit denen künftig neben östrogenen und phytotoxischen Wirkungen weitere endokrine Effekte und dioxin-ähnliche Wirkungen in Oberflächengewässern in Kombination mit der passiven Probenahme untersucht werden können. Für einen Einsatz im regulatorischen Monitoring müssen die Methoden insbesondere die planaren Bioteste und die Kopplung von passiver Probenahme mit Biotesten allerdings optimiert und standardisiert werden. Da es in den letzten Jahren mehrfach Probleme bezüglich der Verfügbarkeit bestimmter Passivsammlerpolymere gab, muss auch diese langfristig sichergestellt werden.

Die Kopplung der passiven Probenahme mit Biotesten bietet enormes Potenzial für das Oberflächengewässermonitoring. So kann beispielsweise die Effizienz von Kläranlagen und deren Einfluss auf angrenzende Oberflächengewässer bewertet werden. Aktuell werden im REFOPLAN-Projekt BiTe (Anwendung einer biologischen Testpalette auf konventionell und mit erweiterten Methoden behandeltes Abwasser, FKZ: 3718 26 321 0) entlang der Abwasserbehandlung auch Passivsammler mit verschiedenen Sammelphasen eingesetzt und mittels verschiedener biologischer Testverfahren untersucht. Im Vergleich zu Wassermischproben könnte der Einsatz von Passivsammlern aufgrund der integrativen Probenahme gerade für die Bewertung der Eliminationseffizienz von Kläranlagen sehr nützlich sein. Auch für die Maßnahmenkontrolle beispielsweise im Sedimentmanagement (z.B. Baggeraktivitäten) oder bei Baumaßnahmen am Gewässer bieten sich Passivsammler in Kombination mit Biotesten an, um die Bewertung des Erfolgs und/oder des Umweltrisikos solcher Maßnahmen zu verbessern.

Summary

Passive samplers accumulate chemicals over time in a sorbing phase, i.e. a polymer, during their environmental exposure. Besides chemical analyses, passive sampler extracts can be applied in bioassays to study potential toxic effects of accumulated environmental contaminants. As a result, an integrative signal of toxic effects over the entire exposure time can be obtained. So far, the application of passive sampling devices for sampling of complex chemical mixtures of environmental contaminants in combination with bioassays is poorly studied. However, this approach has a high potential to improve environmental risk assessment with regard to surface water contamination.

In the present study, passive sampler extracts were subjected to various bioassays to test if this approach is appropriate as a timely warning system for the deterioration of surface water quality. For this purpose, multiple passive samplers were exposed in different natural surface waters as well as the influent and effluent of a wastewater treatment plant (WWTP) for several weeks. Subsequently, their solvent extracts were tested for phytotoxic, endocrine, and/or dioxin-like potential in the laboratory. Two types of passive sampling devices were used in the field campaigns: 1.) silicone rubber sheets that preferably accumulate hydrophobic organic contaminants, and 2.) Chemcatcher® styrenedivinylbenzene reverse phase sulfonated disks (SDB-RPS disks) which are often applied to investigate less hydrophobic organic contaminants dissolved in the water phase.

Investigation of phytotoxic effects

To study phytotoxic effects, different bioassays with the limnic green alga *Desmodesmus subspicatus* were performed. The inhibition of chlorophyll fluorescence of *D. subspicatus* after exposure with passive sampler extracts was measured as an unspecific endpoint (DIN 1991, LAWA 1998). However, this bioassay proved to be not suitable for routine monitoring campaigns. It required a large volume of passive sampler extract and was not very sensitive.

Furthermore, the inhibition of photosystem II (PSII) based on changes in fluorescence yield, viewed by maxi Imaging-Pulse-Amplitude Modulation (IPAM), was measured as a specific endpoint. PSII-inhibitors such as the globally most used herbicides atrazine and diuron compete with plastoquinone for the D1 protein binding site of the PSII-complex in chloroplast thylakoid membranes. This blockade interrupts the photosynthetic electron transport resulting in reduced quantum yield of PSII (Muller et al. 2008, Riegraf et al. 2019a). The bioassay was initially performed in microplates with extracts obtained from Chemcatcher® passive samplers that had been exposed at six different sampling sites in the river basin of Nette (Rhineland-Palatinate, Germany) in April/May 2018. Nette is a middle-sized tributary (river basin: 370,000 km², mean discharge: 2.31 m³/s) of the river Rhine downstream of the city of Koblenz (Rhineland-Palatinate), which was selected due to the agricultural use in its catchment area (Theisen 2018, Statistisches Landesamt RLP 2016). The highest inhibition of PSII was measured at the sampling site near the municipality of Plaidt (6,000 inhabitants), whereas no or a 30 times lower PSII inhibition was determined close to the sources of Nette and Krufter Creek, a small tributary of Nette.

For a more detailed characterization of PSII inhibition at different sampling sites, Chemcatcher® extracts were subjected to a planar algae-based bioassay. The planar PSII inhibition assay (p-

PSII) determines the inhibition of PSII after chromatographic fractionation of the sample. For this purpose, passive sampler extracts were applied to thin-layer plates (TLC). The solvent was completely evaporated and the extracts were fractionated on the TLC plates before the bioassay was performed. By fractionation of the samples on the TLC plates and comparison of the mobility of the measured signals with these of known PSII inhibitors, activity profiles of different samples can be compared (Riegraf et al. 2019a). In good agreement, the Nette sampling site at Plaidt, downstream of the confluence of the Krufter Creek, exhibited the highest PSII inhibition and the sites close to the sources of both rivers the lowest PSII inhibition, respectively. Five signals on the TLC plates were quantitatively analyzed. Interestingly, four of these signals showed similar mobility on the TLC plates as the reference substances diuron, simazine, atrazine, and terbutryn. At the sampling site near the source of the Krufter Creek, PSII was inhibited by up to 21% indicating contamination of this sites with PSII-inhibitors. Compared to nearby sites in the river Nette, no PSII inhibition was detected at the level of the atrazine signal in the mouth of the Krufter Creek. To investigate potential temporal discharge of PSII inhibitors into surface waters, Chemcatcher® were exposed for a duration of two weeks each in five consecutive sampling campaigns between March and June 2018 in Plaidt downstream of the confluence of the Krufter Creek. In the p-PSII assay, the inhibition at the level of the reference substance terbutryn increased by factor eight between the first and the fifth sampling campaign. Concurrently, chemical analysis of the extracts indicated an increase in terbutryn concentration of approximately 13 to 54 ng per disk.

Chemcatcher[®] were also exposed for four weeks in the influent and effluent of a municipal WWTP (120,000 population equivalents) of a medium-sized town in Rhineland-Palatinate and their extracts were analyzed by p-PSII inhibition assay. Inhibition of PSII was detected in the influent and the effluent of the WWTP. However, the activity profiles indicated the attenuation of at least one PSII-inhibitor in the WWTP. In contrast, two additional signals were measured in the effluent sample that were not detected in the influent. This points towards the formation of transformation products with PSII inhibitory potential during conventional wastewater treatment processes.

Investigation of estrogenic effects

Steroidal estrogens such as the natural hormones estrone (E1), 17β -estradiol (E2) and the synthetic hormone 17α -ethinylestradiol (EE2) are of high environmental concern due to their steady discharge into surface waters and their high biological potency. Compared to chemical analysis, effect-based methods for studying estrogenic effects are very sensitive and are, therefore, suggested as complementary monitoring tool (Könnemann et al. 2018). In this study, the Yeast Estrogen Screen (YES) and the planar YES (p-YES) were applied to investigate the estrogenic potential of passive sampler extracts. The passive samplers had been exposed in the above mentioned WWTP and in the catchment area of the river Nette. YES is a reporter gene assay with genetically modified yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). When exposed with estrogens, the cells express the human estrogen receptor (hER α) and produce the enzyme β -galactosidase whose activity is quantified photometrically (Routledge and Sumpter 1996). Similar to the p-PSII assay, the p-YES is performed on a TLC plate after chromatographic fractionation of the samples (e.g. Spira et al. 2013).

In both assays, extracts of Chemcatcher® exposed in WWTP influent showed an at least twofold higher endocrine potential compared to effluent samples. In good agreement, chemical analysis revealed higher concentrations of hormones in Chemcatcher® extracts from the influent compared to those from the effluent. Possibly due to lower accumulation of estrogens in silicone rubber, extracts from silicone rubber sheets that had been exposed in parallel to the Chemcatcher® exhibited a lower number of positive signals in the YES. In the p-YES, activity profiles of Chemcatcher® sample extracts were established and compared with composite wastewater sample extracts enriched by solid phase extraction (SPE). In WWTP influent samples, the most intense fluorescence signals were, amongst others, detected on the level of the applied reference standards E1, E2 and E3. In effluent Chemcatcher® samples two fluorescence signals were markedly lower than in the influent, indicating attenuation of estrogen active compounds during conventional wastewater treatment. Due to the application of the extracts on the TLC plates and evaporation of the solvent, sensitivity was overall higher in the p-YES compared to the YES.

Furthermore, estrogenic activity was measured in Chemcatcher® samples from the catchment area of the river Nette. While few samples showed a quantifiable effect in the YES, fluorescence signals were measured in all investigated samples in the p-YES. The lowest estrogenic activity was determined in samples obtained close to the sources of both rivers, the highest in Nette at Plaidt, upstream of the confluence of Krufter Creek. At the mouth of Krufter Creek the activity profile was different to the nearby sites in the river Nette. In general, estrogenic activity varied by a factor of 1.5 across all sampling campaigns between March and June 2018. Notably, the most intense fluorescence signals were detected at the level of the applied reference compounds E2 and E1 in all samples.

Investigation of dioxin-like activity

To study dioxin-like activity by combining passive sampling with bioassays, passive samplers were exposed in the river catchment of the Gelbach (river basin: 215 km², mean discharge: 2,36 m³/s) in Rhineland-Palatinate known for its contamination with dioxins (Engel 2012). In the laboratory, passive sampler extracts were investigated with the Yeast Dioxin Screen (YDS), a reporter gene assay with genetically modified yeast cells (*S. cerevisiae*) that carry the human arylhydrocarbon receptor (AhR). If AhR agonists are present, the enzyme β -galactosidase is produced and photometrically quantified (Miller 1999). The highest dioxin-like activities were detected in extracts of silicone rubber sheets compared to grab water samples enriched by SPE and Chemcatcher® extracts, respectively. Dioxin-like activities in silicone rubber sheets gave similar results at both studied sites and exceeded the limit of quantification by approximately factor five. Concurrent chemical analysis also indicated higher concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) as well as dioxin-like PCBs (dl-PCB) in silicone rubber sheets were similar to those previously detected in other environmental samples from the river catchment area (Engel 2012, Kalbhenn und Korte 2015).

Conclusions and outlook

In this study, ecotoxicological effects of passive sampling extracts were measured using different bioassays for phytotoxic, estrogenic, and dioxin-like activity. Overall, toxic potential was characterized by this approach and results demonstrated different activity profiles of surface water sampling sites and sampling campaigns as well as WWTP influents and effluents. Partially, effects differed in extracts of the two applied passive sampling devices, which may, in part, result from different accumulation of contaminants or contaminant classes in the respective sorbent phases. Due to the deviation of sampling periods, grab water samples enriched by SPE cannot be directly compared to passive samplers. For future studies it is recommended to collect composite water samples using automatic samplers in parallel to passive sampling and subsequently investigate both sample types with bioassays. Recently, a variety of studies were published that combine passive sampling in aquatic ecosystems with effect-based methods. Thereby, other types of passive samplers and bioassays were also applied (Jahnke et al. 2016a). Compared to the investigation of surface water grab samples, passive sampling is considered as a time-integrative technique (Brack et al. 2017). However, recent findings indicate that the timeintegrative function may be impaired when contaminant concentration are highly variable over time. This is particularly relevant for polar substances whose aqueous concentrations in the environment often highly fluctuate (Becker et al. Entwurf). In the PASTraMi project (REFOPLAN, FKZ: 377 67 418 9), the effects of 1.) event-driven discharge of contaminants, e.g. active ingredients from plant protection products, into surface waters and 2.) different biotic and abiotic factors on the sampling performance of passive samplers are studied. The study aims at improving the assessment of passive sampler data and monitoring results including the combination of passive sampling and bioassays. When assessing effect-based results generated with passive sampling extracts, it has to be considered that the contaminant mixture in the extract is not the same as in the environment or rather in the water phase due to analyte-specific accumulation in the sampling polymer. Jahnke et al. (2016b) discuss different strategies to adequately transfer mixtures of organic contaminants from the aquatic environment into bioassays.

In contrast to the bioassays in microplates, the planar bioassays (p-YES and p-PSII) provided higher sensitivity. They also enabled the characterization of activity profiles by fractionation of the samples on the TLC plate and comparison of activity profiles with those of reference compounds. As a consequence, unidentified compounds with phytotoxic or estrogenic potential were detected. The results indicated formation or attenuation of toxicological active compounds during conventional wastewater treatment. To identify these compounds the respective signals can be eluted from the stationary phase of the TLC plates for a subsequent analysis by mass spectrometry (Buchinger et a. 2013). Recently, Riegraf et al. (2019b) combined further classical *in vitro* bioassays with high-performance thin-layer chromatography. In the future, these planar bioassays could be used in combination with passive sampling to study other endocrine or dioxin-like effects in surface waters. However, the methods need to be optimized and standardized for application in regulatory monitoring, in particular the planar bioassays and the combination of passive sampling with bioassays. Furthermore, the availability of specific (i.e., well-characterized) passive sampling polymers should be ensured in the long-term.

The combination of passive sampling with bioassays has an enormous potential for surface water monitoring. It can, for example, be used to assess the treatment efficiency of WWTPs and their effects on adjacent water bodies. In the BiTe project (REFOPLAN, FKZ: 3718 26 321 0)

different passive samplers are deployed in the wastewater treatment train and their extracts investigated with different bioassays. In comparison to composite water samples the application of passive samplers could be useful for assessing the elimination efficiency of WWTPs due to their integrative sampling properties. In combination with effect-based methods passive samplers could be further be used for controlling measures and for assessing the effectiveness and/or the environmental risks of such measures – for example in sediment management (e.g. dredging activities) or construction measures at water bodies.

1 Ziele des Forschungsvorhabens

Ziel dieser Studie war, die passive Probenahme mit Biotesten zu kombinieren, um komplexe Mischungen von Umweltchemikalien in Oberflächengewässern ökotoxikologisch und chemisch zu bewerten. Es sollte geprüft werden, ob dieses Verfahren als Warnsystem bei Minderung der Wasserqualität geeignet ist. In dieser Studie wurden Extrakte von zwei verschiedenen Typen an Passivsammlern in Biotesten auf phytotoxische, hormonähnliche und dioxin-ähnliche Wirkungen untersucht (siehe Tabelle 1). Dabei wurden Passivsammler entweder in einer Kläranlage oder in Oberflächengewässern exponiert. Ein Teil der Passivsammlerextrakte wurde auch mittels Flüssig- oder Gaschromatographie jeweils gekoppelt mit Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS bzw. GC-MS/MS) analysiert, um Zielanalyten zu quantifizieren. Auf die untersuchten Wirkmechanismen bzw. die spezifischen Stoffgruppen wird in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen.

Wirkmechanismus	Anwendungsbeispiel	Passivsammler	Bioteste	
Phytotoxische Wirkungen	Flusseinzugsgebiet Nette	Silikonstreifen Chemcatcher®	Algentest PS(II)-Inhibition p-PS(II)-Inhibition	
	Kläranlagenmonitoring	Chemcatcher®	p-PS(II)-Inhibition	
Hormonähnliche Wirkungen	Kläranlagenmonitoring	Chemcatcher® (Silikonstreifen)	YES p-YES	
	Flusseinzugsgebiet Nette	Chemcatcher®	p-YES	
Dioxin-ähnliche Wirkung	Altlasten in Oberflächengewässern	Silikonstreifen	YDS	

Tabelle 1:Übersicht über die untersuchten Wirkmechanismen mit den
Anwendungsbeispielen, den verwendeten Passivsammlern und Biotesten

Anhand von Literaturrecherche und fachlichem Austausch mit Experten wurden zunächst geeignete Kombinationsmöglichkeiten von Passivsammlern und Biotesten ermittelt, die sich für die Überwachung stofflicher Gewässerbelastungen eignen. Von besonderem Interesse waren dabei Verfahren, mit denen ökotoxikologisch relevante Wirkungen von Stoffen erfasst werden, die mit Hilfe konventioneller Schadstoffuntersuchungen (z.B. target-Analytik) nicht gut quantifiziert werden können, da beispielsweise die entsprechenden Bestimmungsgrenzen bei der chemischen Analyse von Wasserproben nur schwer erreicht werden (Analytik von Östrogenen). Darüber hinaus sollten möglichst auch Einträge ermittelt werden, die beispielsweise durch Regenereignisse gesteuert werden (z.B. Einträge von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Oberflächengewässer) und die im konventionellen Gewässermonitoring aufgrund der Untersuchung von Schöpfproben nur unzureichend erfasst werden können. Als Passivsammler wurden zu einem Silikonstreifen ausgewählt, die sich vor allem für die Untersuchung organischer Schadstoffe mit einem log K_{0W} > 3 eignen (Smedes et al. 2002). Zusätzlich wurden Chemcatcher® mit einer SDB-RPS Sammelphase genutzt, die für die Untersuchung größenteils hydrophileren organischen Analyten mit log Kow von -1,5 bis 5,8 eingesetzt werden können (Charriau et al. 2016). Diese wurden in Fließgewässern exponiert und die in den Sammlern angereicherten Schadstoffe teils identifiziert. Neben dem Zu- und Ablauf einer Kläranlage wurden zwei Flusseinzugsgebiete für Feldstudien ausgewählt. Für

letztere wurden Untersuchungskonzepte entwickelt und entsprechende Untersuchungen der verschiedenen Wirkmechanismen durchgeführt.

2 Untersuchte Wasserkörper

Für die Untersuchung phytotoxischer und östrogener Wirkungen wurden Passivsammler (Chemcatcher® und Silikonstreifen) im Flusseinzugsgebiet der Nette exponiert (siehe Kapitel 3 und 4). Die Nette, ein Fluss in der östlichen Vulkaneifel, fließt durch die Landkreise Ahrweiler und Mayen-Koblenz in Rheinland-Pfalz (RLP) und mündet in Weißenthurm in den Rhein. Mit einem Einzugsgebiet von ca. 370.000 km² und einen mittleren Abfluss (MQ) von 2,31 m³/s ist sie ein mittelgroßes Fließgewässer. Die Nette wurde aufgrund der landwirtschaftlichen Nutzung im Einzugsgebiet ausgewählt. Die größte Fläche der Osteifel wird von nicht bewässertem Ackerland bedeckt (Theisen 2018). In den Landkreisen Ahrweiler und Mayen-Koblenz wurden in 2016 ca. 40.000 ha als Ackerland und 25.000 ha für den Getreideanbau genutzt, während auf weiteren ca. 10.000 ha andere Fruchtarten (v.a. Winterraps, Zuckerrüben) und Pflanzen zur Grünernte (z.B. Silomais) angebaut wurden (Statistisches Landesamt RLP 2016). In der Ortsgemeinde Plaidt mit ca. 6.000 Einwohnern mündet der Krufter Bach in die Nette. Im Mündungsbereich des Krufter Bachs befinden sich Kleingärten, die durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Hobbygärtnerei potentiell zum Eintrag von Herbiziden in die angrenzenden Oberflächengewässer beitragen können (Theisen 2018). Durch die räumliche Nähe zum Untersuchungslabor in Koblenz konnte zudem der logistische Aufwand für die Durchführung mehrerer Probenahmekampagnen geringgehalten werden.

Um bewerten zu können, inwiefern die Kopplung von passiver Probenahme mit Biotesten geeignet ist, um das ökotoxikologische Potential von phytotoxischen und endokrinen Effekten zu bewerten, wurden Passivsammler untersucht, die im Frühjahr/Sommer 2018 mehrere Wochen an verschiedenen Standorten im Flusseinzugsgebiet der Nette (RLP), exponiert worden waren (siehe Kapitel 8.4.1).



Kampagne	Expositionszeitraum
K1	26.03 09.04.
K2	09.04 23.04.
К3	23.04 07.05.
К4	07.05 22.05.
К5	22.05 05.06.
К6	05.0604.07.

Abbildung 1: Probenahmestandorte und -kampagnen im Flusseinzugsgebiet der Nette

Details zu den Probenahmen sind in Kapitel 8.4.1 dargestellt. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Für die Untersuchung dioxin-ähnlicher Wirkungen (siehe Kapitel 5) wurde das Einzugsgebiet des Gelbachs (RLP), einem Zufluss der Lahn, ausgewählt, da dieses für die Belastung mit Dioxinen bekannt ist. Diese werden wahrscheinlich durch den Abbau von Tonen, in den Tongruben im Südwesten des Westerwaldes, die geogen bedingt mit Dioxinen belastet sind, in die Gewässer eingetragen (Engel 2012). Der Gelbach hat ein Einzugsgebiet von 215 km² und kurz oberhalb der Mündung in die Lahn einen mittleren Abfluss von 2,36 m³/s (Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz 2021).

Neben dem Einsatz im Oberflächengewässern wurden Passivsammler auch vier Wochen im Zuund Ablauf einer kommunalen Kläranlage (120.000 Einwohnergleichwerte) einer rheinlandpfälzischen Mittelstadt exponiert und anschließend auf endokrine und phytotoxische Wirkungen untersucht.

3 Untersuchung phytotoxischer Wirkungen

3.1 Einleitung

Die Anwendung von Herbiziden hat weltweit zu beträchtlichen Umweltproblemen mit negativen Effekten auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt geführt. Durch die Verschmutzung mit Herbiziden und ihren Metaboliten können Nichtzielorganismen sowie die Lebensräume angrenzender Wasserkörper gefährdet und die Nahrungskette und das aquatische Ökosystem beeinträchtigt werden (Riegraf et al. 2019a). In Oberflächengewässern sind eine Vielzahl verschiedener Pflanzenschutzmittelwirkstoffe wie Herbizide und z.T. auch deren Metabolite nachweisbar. Besonders in Kleingewässern in landwirtschaftlich genutzten Regionen, in denen chemische Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden, können große Mengen dieser Wirkstoffe eingetragen werden (Brinke et al. 2017). Herbizide werden im urbanen Raum auch als Biozide beispielsweise zur Kontrolle des Algenwachstums auf Gebäudefassaden genutzt. Obwohl Biozide in deutlich geringeren Mengen angewandt werden, können die Einträge in Oberflächengewässer vergleichbar mit den am häufigsten in der Landwirtschaft eingesetzten Pestiziden sein (Wittmer et al. 2011).

Da die Einträge der meisten Pestizide und Biozide in Oberflächengewässer durch Regenereignisse beeinflusst werden (Wittmer et al. 2011), bietet sich die Probenahme mit Passivsammlern an, die im Gewässer ausgebracht werden und dort während des Expositionszeitraumes chemische Spurenstoffe sammeln können. Extrakte von Passivsammlern wurden bereits häufig in Biotesten mit Algen untersucht, um phytotoxische Wirkungen zu bestimmen, nachdem die Passivsammler entweder in Abwässern oder in Oberflächengewässern exponiert worden waren. Dabei wurden vorwiegend polare Sammler wie polar organic integrative sampler (POCIS) oder Chemcatcher® eingesetzt (Jahnke et al. 2016a). Vermeirssen et al. (2010) konnten beispielsweise zeigen, dass die Hemmung der Photosynthese mit chemischen Äquivalenzkonzentrationen in den Extrakten von POCIS korrelierte, die in Abwässern exponiert worden waren.

Für die Bestimmung phytotoxischer Wirkungen in marinen oder limnischen Proben wird häufig der klassische Algenwachstumshemmtest angewandt, bei dem die Chlorophyll-Fluoreszenz als ein Maß für die Biomasseproduktion genutzt wird. Zusätzlich zu diesem unspezifischen Biotest, können Herbizide, die das Photosystem II (PSII) inhibieren, zu denen auch die weltweit am meisten genutzten Wirkstoffe Atrazin und Diuron gehören, spezifisch mittels maxi Imaging-Pulse-Amplitude-Modulation (IPAM) detektiert werden. PSII-Inhibitoren konkurrieren mit Plastochinon um die Bindung an das D1-Protein des PSII in der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Durch die Blockade dieser Bindungsstelle wird die Reduktion von oxidiertem Plastochinon verhindert und der photosynthetische Elektronentransport unterbrochen. Da die chemische Energie dann nicht mehr für photochemische Prozesse genutzt werden kann, wird die Energie in Form einer Fluoreszenz emittiert. Über die Messung der Chlorophyllfluoreszenz in Abhängigkeit aktinischer Lichtblitze¹ kann die Quantenausbeute des PSII bestimmt werden. Mit zunehmender Hemmung der PSII – Zentren durch Stoffe wie Atrazin nimmt die Quantenausbeute ab (Muller et al. 2008; Riegraf et al. 2019a).

Für die Bestimmung der Phytotoxizität wurden in dieser Studie verschiedene Bioteste mit der limnischen Grünalge *Desmodesmus subspicatus* durchgeführt. Als ein Maß für die chronische Phytotoxizität wurde zunächst die Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz von *D. subspicatus* in Anlehnung an die DIN 38412-33 (DIN 1991) und LAWA (1998) bei Exposition mit

¹ Licht, das photochemische Reaktionen auslösen kann

Passivsammlerextrakten bestimmt. Der Test wird routinemäßig in den Laboratorien der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) für die ökotoxikologische Untersuchung limnischer Sedimente und Baggergut durchgeführt (Liebenstein et al. 2009). Anschließend wurde als spezifischer Endpunkt die Hemmung des PSII von *D. supspicatus* im Mikrotiterplattenformat durch Passivsammlerextrakte bestimmt. Riegraf et al. (2019a) haben diesen Test durch die Fraktionierung von Umweltproben auf einer Dünnschichtplatte weiterentwickelt. Dabei werden die Proben zunächst auf der Dünnschichtplatte aufgetragen, mittels

Dünnschichtchromatographie fraktioniert und die Algenzellen auf die Platte aufgebracht, bevor die PSII-Inhibition gemessen wird.

In dieser Studie haben wir die Eignung der Kopplung der passiven Probenahme mit dem Biotest zur Hemmung des PSII von *D. subspicatus* sowohl im Mikrotiterplattenformat als auch auf der Dünnschichtplatte untersucht. Dazu wurden Passivsammler im Flusseinzugsgebiet der Nette exponiert (siehe Kapitel 3.2.1). Zusätzlich wurden Passivsammler auch im Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage einer rheinland-pfälzischen Mittelstadt exponiert und auf ihre phytotoxische Wirkung untersucht (siehe Kapitel 3.2.2). Als Passivsammler wurden vor allem Disks mit einem Poly(styrenedivinylbenzen)-Copolymer, modifiziert mit Sulfonsäuregruppen, (SDB-RPS-Disks), sog. Chemcatcher®, genutzt.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der verschiedenen Bioteste dargestellt und bewertet, mit denen phytotoxische Wirkungen von Passivsammlerextrakten untersucht wurden.

3.2.1 Feldstudie zur Überwachung von Oberflächengewässer

3.2.1.1 Limnischer Grünalgentest mit Desmodesmus subspicatus

Silikonstreifen wurden in Oberflächengewässern im Flusseinzugsgebiet der Nette (siehe Kapitel 8.4.1) exponiert, anschließend mit n-Heptan extrahiert und in bidestilliertem Wasser umgelöst (siehe Kapitel 8.2 und 8.5.1). Die Untersuchung dieser Extrakte im limnischen Grünalgentest zeigten stark schwankende und hohe Blindwerte² (Daten nicht dargestellt). Für die Untersuchungen im Algentest wurden die Silikonstreifen daher mit Methanol extrahiert (siehe Kapitel 8.5.1). In der Abbildung 1 ist die Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz verschiedener Methanolextrakte von Silikonstreifen, die im Flusseinzugsgebiet der Nette exponiert worden waren, dargestellt. In Kampagne 6 zeigten sich ähnliche Hemmwirkungen mit EC50-Werten von 6,5 mg Polymer mL⁻¹ bzw. 11,2 mg Polymer mL⁻¹ für zwei Replikate vom Standort 5 und 12,9 mg Polymer mL⁻¹ für ein Silikonstreifenextrakt vom Standort 6. In Kampagne 3 wurden EC50-Werte von 1,5 bzw. 1,6 mg Polymer mL⁻¹ für Standort 4 bzw. 5 ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven der zwei Passivsammlerreplikate, die in Kampagne 6 am Standort 5 exponiert worden waren, zeigten eine signifikante Korrelation (siehe Abbildung 1a; lineare Regression, y = 0.83x + 21.5, $R^2 = 0.923$, p = 0.002). Auch verschiedene Verdünnungsreihen von je zwei Passivsammlerreplikaten, die in Kampagne 3 an den Standorten 4 und 5 exponiert worden waren, zeigten jeweils eine gute Übereinstimmung der Hemmwirkung im limnischen Grünalgentest (Abbildung 2b, Anlage 1).

² Extrakte von Silikonstreifen, die wie die eigentlichen Proben behandelt, aber nicht im Gewässer exponiert worden waren (sog. Feldkontrollen). Die Effekte zeigten keinen Zusammenhang mit der Verdünnung der Probenextrakte.



Abbildung 2: Toxizität von Passivsammlerextrakten im limnischen Grünalgentest

Dosis-Wirkungskurven methanolischer Silikonstreifenextrakte im limnischen Grünalgentest mit *Desmodesmus subspicatus*. Dargestellt ist die Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz (%) in Abhängigkeit von der Masse an Sammlerpolymer im Testansatz. a – Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz durch Silikonstreifen, die in der Kampagne 6 an den Standorten 5 und 6 exponiert worden waren. Probe a und b sind verschiedene Passivsammlerreplikate. b – Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz durch Silikonstreifen, die in der Kampagne 3 am Standort 4 exponiert worden waren. Es wurden zwei Passivsammlerreplikate desselben Standortes und derselben Probenahmekampagne entweder in einer 1:2 (gefüllte Symbole) bzw. einer 1:4 Verdünnungsreihe (offene Symbole) getestet. In beiden Abbildungen sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der technischen Replikate (n = 3) dargestellt. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Chemcatcher[®] wurden mit Aceton, Methanol und nochmals mit Aceton extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt unter einem Stickstoffstrom vollständig eingeengt und erneut in bidestilliertem Wasser gelöst. Um vollständige Dosis-Wirkungskurven mit bis zu 100 % Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz zu erzielen, mussten jedoch drei bis vier Replikate zu einer Probe vereinigt werden. Die verschiedenen Standorte zeigten auch hier ähnliche Hemmwirkungen im limnischen Grünalgentest mit EC50-Werten zwischen 2,4 und 4,9 mg Polymer mL⁻¹. Lediglich die Quellen der beiden Fließgewässer (Standorte 1 und 2) zeigten keine Hemmwirkungen. Die Feldkontrollen der Chemcatcher^{®3} zeigten ebenfalls keine Hemmwirkungen (Daten nicht dargestellt).

Die durchgeführten Basisuntersuchungen zeigen, dass Passivsammlerextrakte grundsätzlich im limnischen Grünalgentest untersucht werden können. Die Wahl des Lösemittels, welches für die Extraktion der Passivsammler genutzt wird, kann in diesem Biotest ggf. zu Blindwerten führen. Die Ursachen sind unklar, zumal das Extraktionsmittel bis zur Trockene eingeengt wurde und keine Lösemittelrückstände in den im Test eingesetzten Proben zurückbleiben sollten. Bei der Extraktion der Silikonstreifen konnte dieses Problem durch die Wahl von Methanol statt n-Heptan als Extraktionsmittel gelöst werden. Abgesehen von diesen Schwierigkeiten scheint die Kopplung der passiven Probenahme mit dem limnischen Grünalgentest für ein Routinemonitoring wenig vielversprechend. Insgesamt ist der Test wenig sensitiv, da eine große Menge an Probenextrakt benötigt wird, um eine Hemmwirkung zu erzielen. So wurde von den Silikonstreifen je 80% des Extraktes einer Probe und von den Chemcatchern® sogar das Extrakt mehrerer Proben für die Durchführung eines Algentestes benötigt. Folglich können die Proben

³ Chemcatcher[®], die wie die eigentlichen Proben für die Exposition im Feld vorbereitet und in bidestilliertem Wasser zur Probenahmestelle transportiert wurden. Während des Ausbringens und Einholens der Proben wurden sie jedoch an der Luft exponiert und während der Exposition der Proben wurden sie in bidestilliertem Wasser im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Die Feldkontrollen wurden wie die eigentlichen Proben aufgearbeitet und analysiert.

in keinen oder nur sehr wenigen Biotesten parallel untersucht werden. Für die Anwendung im Routinemonitoring wäre die Kopplung der passiven Probenahme mit dem limnischen Grünalgentest daher sehr kosten- und arbeitsintensiv. Da im Rahmen dieser Untersuchungen mit dem limnischen Grünalgentest kaum Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden konnten, ist zudem unklar, inwiefern standortspezifische Unterschiede identifiziert werden können. Allerdings ist es auch möglich, Bioteste zur Bestimmung der Biomasseproduktion von Grünalgen im Mikrotiterplattenformat durchzuführen, bei dem ein deutlich geringeres Extraktionsvolumen benötigt wird, so dass die Anwendung in größerem Stil möglich ist. Der kombinierte Algentest ist ein Hochdurchsatz-Screening Verfahren im 96-well Mikrotiterplattenformat, mit dem gleichzeitig die Inhibition der Wachstumsrate und der Photosynthese bei der limnischen Grünalge *Raphidocelis subcapitata* (syn. *Pseudokirchneriella subcapitata*) bestimmt werden (Escher et al. 2008). Vermeirssen et al. (2009, 2010) haben beispielsweise Extrakte verschiedener polarer Passivsammler u.a. auch verschiedener Konfigurationen des Chemcatchers® mit dem kombinierten Algentest untersucht.

3.2.1.2 Hemmung der Photosynthese (Photosystem II)

Als weiterer Biotest mit einem spezifischen Endpunkt wurde die Hemmung des Photosystems II gemessen, wobei der Test zunächst im Mikrotiterplattenformat durchgeführt wurde. Da die chemische Analyse der Passivsammlerextrakte zeigte, dass in den Chemcatchern® höhere Konzentrationen an PSII-Inhibitoren insbesondere an Simazin, Isoproturon und Diuron (Summe der PSII-Inhibitoren: Faktor 2 höher) sowie mehr Positivbefunde gefunden wurden als in den Silikonstreifen (siehe Anlage 2), wurden für diese Untersuchungen ausschließlich Extrakte der Chemcatcher® verwendet.

In der Kampagne 3 konnte in den Quellen der beiden Fließgewässer (Standorte 1 und 2) keine Hemmung des Photosystems II detektiert werden (siehe Tabelle 2). Die höchste Hemmung mit 12,4 %, die einem Diuron-Äquivalent (DEQ) von ca. 10 μ g L⁻¹ entspricht ⁴, wurde am Standort 3 ermittelt. Flussabwärts dieser Probenahmestelle nahm die Hemmung, möglicherweise durch den Zufluss des Krufter Baches in die Nette, auf 7,8 % am Standort 6 ab. Für eine detailliertere Bewertung der Biotestergebnisse müssten für die Chemcatcher[®] zusätzlich Sammelraten z.B. durch experimentelle Studien oder parallele Untersuchung von Wassermischproben bestimmt werden. Neben der Masse und der Oberfläche der Sammelphase, die in der Regel konstant gehalten werden, ist die Sammelrate vor allem von der Fließgeschwindigkeit abhängig, wobei sich eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit mit ca. v^{0,5} auf die Sammelrate auswirkt (Booij 2019). Da die Fließgeschwindigkeit flussabwärts von Plaidt (Standorte 5 und 6) tendenziell zunimmt (siehe Anlage 3), nimmt die Sammelrate im Verlauf der Nette wahrscheinlich ebenfalls zu. Dies bedeutet, dass die Hemmung der Photosynthese im Flussverlauf der Nette abnimmt. Die Effekte waren im Krufter Bach mit einer Hemmung von 4,9 % um ca. den Faktor 2 niedriger als in der Nette.

 $^{^4}$ 43,7 μg L $^{-1}$ Diuron, das parallel zu den Passivsammlerproben als Positivkontrolle getestet wurde, erzielte eine Hemmung von 42,8 %.

Probe/ Standort	Blind- probe	1	2	3	4	5	6
Bezeichnung des Standorts		Krufter Bach Quelle	Nette Quelle	Nette Plaidt fluss- aufwärts	Krufter Bach Mündung	Nette Plaidt fluss- abwärts	Nette Weißen- thurm
Hemmung (%)	1,1 (± 0,5)	0,4 (± 0,2)	-0,7 (± 0,3)	12,4 (± 0,6)	4,9 (± 0,3)	8,3 (± 0,6)	7,8 (± 0,4)

Tabelle 2 Hemmung des Photosystems II im Flusseinzugsgebiet der N	Nette
---	-------

Die prozentuale Hemmung der Quantenausbeute des PSII (YII) wurde im 96-well-Format mit *D. subspicatus* in Extrakten von Chemcatchern[®] bestimmt, die zwei Wochen in Kampagne 3 im Flusseinzugsgebiet der Nette exponiert worden waren. Von den Standorten 3 bis 6 wurden jeweils zwei (n = 2) und von den anderen Standorten jeweils ein Chemcatcher[®]-Replikat (n = 1) untersucht. Zusätzlich wurden jeweils sechs technische Replikate (n = 6) von jedem Probenreplikat eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte der technischen Replikate und deren Standardabweichung.

Um die verschiedenen Standorte bezüglich der Hemmung des Photosystems II genauer charakterisieren zu können, wurden Chemcatcher®-Extrakte in einem planaren algenbasierten Biotest (siehe Kapitel 8.5.4) untersucht, mit dem die Hemmung des Photosystems II von D. subspicatus nach chromatographischer Auftrennung der Probe ermittelt wird. Da die Probenextrakte direkt auf der Dünnschichtplatte aufgetragen und vor der Durchführung des Biotests bis zur Trockene eingeengt werden, ist dieser Test grundsätzlich sensitiver als das Pendant im 96-well Mikrotiterplattenformat. Durch die Auftrennung der Proben auf der Dünnschichtplatte und den Vergleich der Mobilität mit der von Referenzsubstanzen, können Aktivitätsprofile der verschiedenen Proben verglichen werden. Dazu werden parallel zu den Proben Standards bekannter PSII-Inhibitoren aufgetragen, so dass nach der chromatographischen Trennung und dem anschließenden Biotest das Laufverhalten detektierter Signale mit denen der Standardsubstanzen, in diesem Fall Diuron, Simazin, Atrazin und Terbutryn, verglichen werden kann. Wird beispielsweise ein Signal auf der Höhe des Diuronstandards detektiert, so handelt es sich entweder um Diuron oder um eine Substanz, die bei der durchgeführten chromatographischen Auftrennung das gleiche Laufverhalten auf der Dünnschichtplatte aufweist wie Diuron. Die chromatographische Auftrennung erleichtert unter Umständen die Detektion von Einleitern oder jahreszeitlich bedingten Einträgen, da im Gegensatz zum Test im Mikrotiterplattenformat die Effekte von sehr potenten PSII-Inhibitoren wie z.B. Diuron nicht mehr die der weniger potenteren PSII-Inhibitoren wie Terbutryn überlagern.

Für diesen Test wurden zunächst Chemcatcher®-Extrakte, die in Kampagne 3 an den verschiedenen Standorten exponiert worden waren (siehe Kapitel 8.4.1) sowie ein Blindwert (siehe Abbildung 3) untersucht. Die prozentuale Hemmung der Quantenausbeute des Photosystems II (YII) wurde für fünf Signale quantitativ ausgewertet (siehe Kapitel 8.5.4.3) und in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Blindprobe zeigte keine PSII-Hemmung. An den quellnahen Standorten (2-Nette Quelle, 1-Krufter Bach Quelle) wurde keine bzw. eine geringe Inhibition von < 21 % bzw. 1,8 % auf Höhe der Banden des Diurons bzw. des Simazins gemessen. Diese Werte sind deutlich niedriger als in den übrigen Proben und zeigen eine vergleichsweise niedrige Belastung der Quellen mit PSII-Inhibitoren. Die PSII-Inhibition war am Standort 3 mit 93,6 %, 52,8 %, 33,3 % und 18,8 % auf Höhe der Banden der Standards Diuron, Simazin, Atrazin und Terbutryn am höchsten. Im Vergleich dazu zeigen die Standorte 5 und 6 eine niedrigere PSII-Inhibition. In diesen Proben wurde eine PSII-Inhibition von ca. 85 %, 31 % und 13 % auf Höhe der Banden des Diurons, des Simazins bzw. des Atrazins gemessen. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse des planaren Biotestes die des Testes im Mikrotiterplattenformat. Bei beiden

Testsystemen zeigten die Quellen eine niedrige Belastung mit PSII-Inhibitoren. In der Nette wurde eine höhere PSII-Inhibition nachgewiesen als im Krufter Bach und in der Nette war die Hemmwirkung am Standort 3 am höchsten während sie flussabwärts (Standort 5 und 6) abnahm.



Abbildung 3: PSII-Inhibition im Oberflächengewässer nach Dünnschichtchromatographie



Zwei Dünnschichtplatten nach chromatographischer Entwicklung und anschließendem p-PSII Inhibitions-Test mit Signalen der effektiven Quantenausbeute Y(II). Getestet wurden Chemcatcher®-Extrakte aus dem Oberflächengewässermonitoring im Flusseinzugsgebiet der Nette. Oben: Vergleich verschiedener Standorte. Spur 1: Mischung bekannter PSII-Inhibitoren mit 1,5 ng Diuron, 5 ng Simazin, 10 ng Atrazin und 10 ng Terbutryn, 2: Blindprobe eines Chemcatchers® (Blank) Spur 3-8: verschiedene Standorte. Unten: Vergleich verschiedener Kampagnen (Kampagne 1 bis 5). Spur 1-5: je eine Chemcatcher®-Probe aus den Kampagnen 1 bis 5 vom Standort 5, Spur 6-8: verschiedene Mengen einer Mischung bekannter PSII-Inhibitoren. Auf den beiden Platten wurden jeweils 100 µl der jeweiligen Probe bzw. 5 µl der Mischung bekannter PSII-Inhibitoren aufgetragen. Die Blindprobe war ein Chemcatcher®, der wie die eigentlichen Proben für die Probenahme vorbereitet und extrahiert, jedoch nicht im Feld exponiert wurde. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Der planare Biotest ermöglicht zusätzlich einen Vergleich der Wirkprofile verschiedener Proben: Obwohl die Hemmwirkungen verschiedener Signale an den Standorten 5 und 6, vermutlich aufgrund der räumlichen Nähe, vergleichbar waren, wurde am Standort 5 auf der Höhe der Terbutrynbande mit 11,6 % eine um den Faktor 2,4 höhere PSII-Inhibition gemessen als am Standort 6. Auch die mittels LC-MS/MS bestimmten Konzentration an Terburtyn (38 ± 2 ng/Disk) und eines Terbutryn-Transformationsproduktes (400 ± 26 ng/Disk) in den Chemcatchern[®] waren am Standort 5 um den Faktor 2,5 bzw. 1,4 höher als am Standort 6. Die Ursachen dafür sind unklar und müssten durch weitere Probenahmen genauer untersucht werden. Die Probe vom Standort 4 (Krufter Bach Mündung) zeigt, im Vergleich zu den nahe gelegenen Standorten in der Nette (3, 5 und 6), ein anderes Wirkprofil, da keine Hemmwirkung auf Höhe der Atrazinbande detektiert wurde, während die PSII-Inhibition im Bereich der Terbutrynbande mit 16,7 % in der gleichen Größenordnung lag wie die Proben der Standorte 3 und 5. Die Banden auf Höhe des Diurons und Simazins zeigen mit 59,2 % bzw. 12,9 % etwas geringere Hemmwirkungen als die Proben der Standorte 3, 5 und 6 in der Nette. Aufgrund der niedrigeren Fließgeschwindigkeit an Standort 3 im Vergleich zu den Standorten 4-6 und ähnlicher anderer abiotischer Faktoren (siehe Anlage 4) lässt sich hier auch eine geringere Sammelrate vermuten. Da die PSII-Hemmung im Verlauf der Nette vom Standort 3 bis 6 abnimmt, ist hier eine Verdünnung durch den Zufluss des Krufter Bachs naheliegend. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Versuchen im Mikrotiterplattentest.

	Standort-	Standort Name	Signal: Substanz					
	NI.		1: Unbe- kannt 1	2: Diuron	3: Simazin	4: Atrazin	5: Terbu- tryn	
	1	Krufter Bach Quelle	15,0	21,0	1,8	0,0	0,0	
	2	Nette Quelle	<bg< td=""><td>0,1</td><td><bg< td=""><td><bg< td=""><td><bg< td=""></bg<></td></bg<></td></bg<></td></bg<>	0,1	<bg< td=""><td><bg< td=""><td><bg< td=""></bg<></td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td><bg< td=""></bg<></td></bg<>	<bg< td=""></bg<>	
	3	Plaidt flussaufwärts	73,7	93,6	52,8	33,3	18,8	
	4	Krufter Bach Mündung	30,3	59,2	12,9	<bg< td=""><td>16,7</td></bg<>	16,7	
	5	Plaidt flussabwärts	69,8	88,1	31,2	12,9	11,6	
	6	Weißenthurm	75,4	84,3	30,7	12,5	4,8	

 Tabelle 3:
 Hemmung des Photosystems II im Flusseinzugsgebiet der Nette nach chromatographischer Auftrennung

Die Tabelle zeigt die berechnete prozentuale Inhibition der Quantenausbeute des Photosystems II (YII) im Flusseinzugsgebiet der Nette. Angegeben sind je Standort fünf ausgewertete Signale. Bei den Signalen 2-5 handelt es sich um Substanzen, die nach der Auftrennung auf der Höhe der aufgetragenen Standards Diuron, Simazin, Atrazin bzw. Terbutryn lagen. Signal 1 (Unbekannt 1) weist ein Laufverhalten auf, das keinem der aufgetragenen Standards entspricht. Hierbei handelt es sich um Hemmwirkungen, die von der entsprechenden Substanz bzw. von Substanzen mit gleichem Laufverhalten verursacht wurden. Die Ermittlung der prozentualen Inhibition der YII wird in Kapitel 8.5.4.3 beschrieben.

In dieser Studie können die Hemmwirkungen nicht in Äquivalenzkonzentrationen umgerechnet werden, da keine Kalibrierreihen mitgemessen wurden. Allerdings erzielte die Hemmwirkung der Probe vom Standort 6 auf der Höhe der Bande des Diurons mit 84,3 % die gleiche Hemmwirkung wie der aufgetragene Diuron-Standard, so dass das gemessene Signal einem Diuron-Äquivalent von 1,5 ng entspricht (siehe Tabelle 3).

Der Vergleich der Wirkprofile von verschiedenen Probenahmekampagnen ermöglicht die Untersuchung potentieller Einträge von PSII-Inhibitoren während des Monitorings (siehe Abbildung 3 unten). In fünf aufeinanderfolgenden Probenahmekampagnen am Standort 5 nahm die Hemmwirkung auf der Höhe der Bande des Terbutryns von 5-7 % um den Faktor 8 auf 57 % in Kampagne 5 zu (siehe Tabelle 4). Auch die chemische Analyse der Chemcatcher® zeigt eine Zunahme der Terbutryn-Konzentration von ca. 13 auf 54 ng Disk-1 (nicht dargestellt). Durch die Elution der Bande von der Dünnschichtplatte und eine anschließende massenspektrometrische Analyse könnte verifiziert werden, ob es sich tatsächlich um Terbutryn handelt. In den Kampangnen konnten die Sammelraten der Chemcatcher® nicht bestimmt werden. Auch die Fließgeschwindigkeiten konnten nur während des Ausbringens und Einholens der Passivsammler gemessen werden. Im Untersuchungszeitraum gab es in der Nette kein Starkregenereignis und der Abfluss an der nahe gelegenen Meßstelle Nettegut variierte gering zwischen 1,1 und 3,2 m³/s (Tagesmittelwerte, siehe Anlage 5)⁵. Die Fließgeschwindigkeiten und damit auch die Sammelraten sollten daher im Untersuchungszeitraum relativ konstant gewesen sein, so dass im Verlauf des Monitorings der Eintrag an Terbutryn am Standort 5 tatsächlich zugenommen hat. Terbutryn ist seit 2003 in der EU nicht mehr als Pflanzenschutzmittel zugelassen, wird allerdings als Biozid in Schutzmitteln beispielsweise für Dach- und Fassadenfarben, für Mauerwerk, Fasern und Textilien sowie als Antischimmelmittel eingesetzt. Terbutryn kann direkt über Oberflächenabfluss in Oberflächengewässer gelangen. Der Großteil gelangt allerdings über das Mischwasserkanalnetz in kommunale Kläranlagen. Da es dort nicht vollständig eliminiert wird, werden Terbutryn und sein Transformationsprodukt über Kläranlagenabläufe in Oberflächengewässer eingetragen (Luft et al. 2014).

Bei der Untersuchung der verschiedenen Kampagnen waren die Signale auf Höhe der Bande des Diurons mit 90 bis 100 % überlagert und müssten mit niedrigen Probenvolumen erneut gemessen werden. Die Inhibition auf Höhe der Banden des Simazins und des Atrazins variierten leicht um den Faktor 1,6 bzw. 1,8. Diese geringen Änderungen der Hemmwirkungen deuten auf einen konstanten Eintrag bzw. einer Hintergrundbelastung mit den entsprechenden Substanzen hin. Interessanterweise korreliert die Hemmung des YII auf Höhe der Atrazinbande mit der Konzentration an Atrazin in den Chemcatchern[®] (R² = 0,9755, nicht dargestellt), was darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Signal tatsächlich ausschließlich um Atrazin und nicht zusätzlich auch um einen weiteren PSII-Inhibitor handeln könnte. Die Hemmwirkungen der verschiedenen Signale korrelierten nicht mit dem mittleren Abfluss in den verschiedenen Messkampagnen (nicht dargestellt), so dass der Eintrag der detektierten PSII-Inhibitoren an diesem Standort wahrscheinlich nicht durch Regenereignisse gesteuert war.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass der planare Biotest geeignet ist, um die Belastung unterschiedlicher Standorte mit phytotoxischen Substanzen zu charakterisieren und mögliche Einträge zu identifizieren. Durch die Kombination mit der passiven Probenahme können größere Probenahmezeiträume überwacht werden als durch die Untersuchung von Wasser-Schöpfproben. Für die Quantifizierung von Einträgen beispielsweise während definierter Probenahmezeiträume werden zusätzlich Sammelraten und Verteilungskoeffizienten für die entsprechenden Sammler und PSII-Inhibitoren benötigt. Für die Ermittlung von Äquivalenzkonzentrationen im Biotest sollten künftig zudem Standardkalibrierungen mit mehreren Konzentrationsstufen durchgeführt werden, da die Effekte im Biotest häufig nicht linear mit der Testkonzentration korrelieren. In dieser Studie dienen die Standards, die lediglich in einer Konzentration aufgetragen wurden, einer groben Einschätzung der Belastung mit

⁵ Der mittlere Hochwasserabfluss (MHQ) für den Zeitraum 1954-2018 betrug 18,8 m³/s (Landesamt für Umwelt, RLP, 2019).

phytotoxischen Substanzen und der Charakterisierung des Probenextraktes nach der Fraktionierung auf der Dünnschichtplatte.

Tabelle 4:	Hemmung des Photosystems II über fünf Kampagnen am Standort 5 nach				
	chromatographischer Auftrennung				

Kampagne	Signal: Substanz					
	1: Unbekannt 1	2: Diuron	3: Simazin	4: Atrazin	5: Terbutryn	
1	72,0	100,0	51,3	14,8	7,0	
2	76,3	91,4	33,4	14,0	5,4	
3	77,4	94,2	37,3	24,9	17,5	
4	77,4	93,0	47,5	26,0	29,2	
5	78,2	90,3	51,0	25,7	56,8	

Die Tabelle zeigt die berechnete prozentuale Inhibition der Quantenausbeute des Photosystems II (YII) am Standort 5 in fünf aufeinanderfolgenden Probenahmekampagnen. Angegeben sind je Kampagne vier ausgewertete Signale, die nach der Auftrennung auf der Höhe der aufgetragenen Standards Diuron, Simazin, Atrazin bzw. Terbutryn lagen. Hierbei handelt es sich um Hemmwirkungen, die von der entsprechenden Substanz bzw. von Substanzen mit gleichem Laufverhalten verursacht wurden.

3.2.2 Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage

Für die Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage mittels der Kopplung von Passivsammlern mit dem p-PSII-Inhibitionstest wurden jeweils 25 µl einer Zulauf- und 50 µl einer Ablaufprobe aufgetragen. Dabei wurde die Anreicherung mit Passivsammlern (Chemcatcher®), die vier Wochen exponiert worden waren, mit 24h-Wassermischproben verglichen, die beim Ausbringen der Passivsammler entnommen und im Labor mittels Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE) angereichert wurden. Die entwickelte Dünnschichtplatte ist in Abbildung 4 dargestellt. Die ermittelten Inhibitionen der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II (YII) für die verschiedenen Signale sind in Tabelle 5 aufgelistet.




Eine Dünnschichtplatte nach chromatographischer Entwicklung und anschließendem p-PSII Inhibitions-Test mit Signalen der effektiven Quantenausbeute des Photosystems Y(II). Getestet wurden Extrakte von Chemcatchern[®], die vier Wochen im Zuund Ablauf einer Kläranlage exponiert wurden. Verglichen wurden diese Proben mit Wasserproben aus dem Zu- und Ablauf, die im Labor mittels SPE aufkonzentriert wurden. Bei den Wasserproben handelt es sich um 24h-Mischproben, die von den Betreibern der Kläranlage beim Ausbringen der Passivsammler zur Verfügung gestellt wurden. Als Standard wurde eine Mischung bekannter PSII-Inhibitoren mit 0,5 ng Diuron, 1 ng Simazin, 5 ng Atrazin und 5 ng Terbutryn aufgetragen. Von den Zulaufproben wurden je 25 µl und von den Ablaufproben je 50 µl aufgetragen. Von der Mischung der PSII-Inhibitoren wurde 5 µl aufgetragen. Die Blindprobe war ein Chemcatcher[®], der wie die eigentlichen Proben für die Probenahme vorbereitet und extrahiert, jedoch nicht im Feld exponiert wurde. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Zu- bzw. Ablauf	Proben- art	Signal: Substanz						
		1: Unbe- kannt 1	2: Unbe- kannt 2	3: Diuron	4: Sima- zin	5: Unbe- kannt 3	6: Atrazin	7: Ter- butryn
Zulauf	Chem- catcher®	42,3	72,5	47,0	n.d.	25,2	n.d.	n.d.
Ablauf		60,2	60,7	79,6	31,4	42,7	n.d.	35,2
Zulauf	SPE	39,4	68,8	22,4	n.d.	8,7	n.d.	n.d.
Ablauf		46,0	49,8	72,1	12,4	27,1	n.d.	18,6

Tabelle 5: Hemmung des Photosystems II in einer Kläranlage nach chromatographischer Auftrennung

Die Tabelle zeigt die berechnete prozentuale Inhibition der Quantenausbeute des Photosystems II (YII) von Proben aus einer Kläranlage. Angegeben sind je Probe vier ausgewertete Signale, die nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf der Höhe der aufgetragenen Standards Diuron, Simazin, Atrazin bzw. Terbutryn lagen. Hierbei handelt es sich um Hemmwirkungen, die von der entsprechenden Substanz bzw. von Substanzen mit gleichem Laufverhalten verursacht wurden. Zusätzlich wurden drei unbekannte Signale ausgewertet. Als Standard wurde eine Mischung aus je 5 ng Terbutryn und Atrazin, 1 ng Simazin und 0,5 ng Diuron aufgetragen. n.d. – nicht detektiert. Die Ermittlung der prozentualen Inhibition der YII wird in Kapitel 8.5.4.3 beschrieben.

Sowohl in Zulauf- als auch in Ablaufproben konnten Inhibitoren des PSII nachgewiesen werden. Ein direkter quantitativer Vergleich ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Zum einen wurden von den Ablaufproben die doppelten Extraktvolumina aufgetragen und zum anderen wurden Sammelraten für die Chemcatcher® im Zu- und Ablauf nicht bestimmt. Allerdings waren die Sammelraten für Silikonstreifen, die parallel zu den Chemcatchern® exponiert worden waren, im Zu- und Ablauf ähnlich (Rs(300) ca. 23 L Tag⁻¹), so dass anzunehmen ist, dass auch die Sammelraten der Chemcatcher® im Zu- und Ablauf vergleichbar sind. In den beiden Ablaufproben werden auf der Höhe der Standards Terbutryn und Simazin Hemmwirkungen nachgewiesen, die im Zulauf nicht detektiert wurden. Da gerade bei der Chemcatcher®-Probe im Ablauf hier eine Inhibition von über 30 % nachgewiesen wird, liegt eine Bildung von PSIIinhibierend Substanzen im Verlauf der Kläranlage nahe. Bei der Substanz auf Höhe der Terbutrynbande könnte es sich um ein Transformationsprodukt von Terbutryn handeln, das in Kläranlagen gebildet wird (Luft et al. 2014). Im Gegensatz dazu ist bei dem Signal "Unbekannt 2" trotz der Auftragung des doppelten Volumens auf der Dünnschichtplatte im Ablauf eine Abnahme der Hemmwirkung nachweisbar, die auf die Eliminierung der entsprechenden PSIIinhibierenden Substanzen in der Kläranlage deutet. Generell zeigen die Chemcatcher®-Proben und SPE-Proben ein vergleichbares Muster der Hemmwirkungen. Die Effekte in den Passivsammlerextrakten sind höher als in den Mischproben. Allerdings wurde mit den Chemcatcher® auch ein längerer Zeitraum (4 Wochen) beprobt als mit den Wassermischproben (24 Stunden).

Die Kopplung der passiven Probenahme mit dem planaren PSII-Inhibitionstest eignet sich sehr gut für die Überwachung von Kläranlagen, da die Bildung und Elimination von PSIIinhibierenden Substanzen geprüft werden können. Die Probenahme phytotoxischer Substanzen während der Exposition der Sammler ermöglicht dabei trotz stark schwankender Tages- und Wochengänge einer Kläranlage die Bewertung zeitintegrierter Signale. Durch die Anreicherung in der Sammelphase ist die passive Probenahme sehr sensitiv, so dass auch die Bewertung von Positiv- und Negativbefunden möglich ist. Dabei muss künftig jedoch die Verweilzeit der jeweiligen Kläranlage berücksichtig und je nach Ausbringdauer Zu- und Ablauf zeitversetzt beprobt werden.

Für eine Routineanwendung des planaren PSII-Inhibitionstests sollte die Methode künftig optimiert und standardisiert werden. Die Auswertung einzelner Signale ist beispielsweise noch sehr zeitaufwändig, da sie manuell erfolgt. Zudem ist für die zuverlässige Ermittlung der Hemmwirkungen entsprechende Erfahrung in Software und Testsystem erforderlich.

4 Untersuchung östrogener Wirkungen

4.1 Einleitung

Steroide Östrogene, wie die natürlichen Hormone Estron (E1), 17β-Estradiol (E2), sowie das synthetische Hormon 17α-Ethinylestradiol (EE2) haben aufgrund ihrer stetigen Einträge über Abwässer in Oberflächengewässer und ihrer starken biologischen Potenz eine hohe Umweltrelevanz. E2- und EE2-Konzentration im Nanogramm pro Liter – Bereich wirken reproduktionstoxisch mit negativen Folgen auf der Populationsebene (Könnemann et al. 2018). E1, E2, und EE2 waren daher bis zu ihrer Aktualisierung im August 2020 vier Jahre in der Beobachtungsliste ("watch list") der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie aufgeführt (EU 2015, 2020). Das chemische Monitoring von Östrogenen für die Beobachtungsliste war herausfordernd, da die Europäische Kommission die vorläufigen Umweltqualitätsnormen auf 3,6 ng/L für das E1, 400 pg/L für das E2 und 35 pg/L für das EE2 festgelegt hat, während die meisten Routinemethoden die daraus resultierenden Anforderungen an die Bestimmungsgrenzen, insbesondere für das EE2, nicht erfüllen können. Im Gegensatz dazu können effekt-basierte Methoden östrogene Substanzen im pg/l-Bereich detektieren, so dass sie zumindest als ergänzendes Monitoringwerkzeug vorgeschlagen wurden (Könemann et al. 2018).

Um das östrogene Potential von Oberflächengewässern oder Kläranlagenab- und zuläufen zu untersuchen, wurden bislang am häufigsten polar integrative chemical samplers (POCIS) in Kombination mit in vitro Biotesten genutzt (Jahnke et al. 2016a, Harman et al. 2012). Dabei konnten Vermeirssen et al. (2008a) zeigen, dass die Menge an östrogener Aktivität in POCIS-Extrakten mit der Menge an östrogener Aktivität in der Galle von Fischen (Bachforellen) korrelierte, die an denselben Standorten in der Nähe von Kläranlagen in Käfigen in den Fließgewässern exponiert worden waren. Extrakte aus Passivsammlern wurden bereits mittels verschiedener Bioteste wie dem Yeast Estrogen Screen (YES) sowie den Zelllinien MVLN und MELN untersucht, um östrogene Effekte im Wasser zu detektieren (Jahnke et al. 2016a). Die Zelllinien MVLN und MELN sind mit einem Luciferase-Gen transfiziert, das durch die Aktivierung des Östrogenrezeptors kontrolliert wird (Balaguer et al. 1999, Demirpence et al. 1993). Der YES ist ein Reportergentest mit gentechnisch veränderten Zellen der Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae), die den humanen Östrogenrezeptor (hERa) unter der Kontrolle eines Kupferabhängigen Promoters exprimieren. Das Reportergen lac-Z steht unter der Kontrolle eines Promoters, der eine Östrogen-responsive Sequenz (estrogen-responsive element, ERE) enthält. *lac-*Z kodiert das Enzym β -Galaktosidase. Bei Anwesenheit von Östrogenen wird daher β -Galaktosidase produziert. Nach der Exposition werden die Hefezellen lysiert, so dass die synthetisierte β -Galaktosidase freigesetzt wird. Die Menge des exprimierten Reportergens wird anschließend durch einen Enzymassay bestimmt. Dabei wird zugesetztes Chlorophenol Rot-β-D-Galactopyranosid (CPRG) durch die β-Galaktosidase gespalten. Das freigesetzte Chlorophenolrot führt zu einem Farbumschlag von gelb nach rot, der photometrisch quantifiziert werden kann (Routledge and Sumpter 1996).

In der Regel wird der YES im Mikrotiterplattenformat (z.B. 96-Well) durchgeführt. Allerdings gibt es auch die Möglichkeit den YES im Anschluss an eine chromatographische Auftrennung der Probe auf einer Dünnschichtplatte, auf die Hefezellen aufgetragen werden, durchzuführen. Dieser sog. planare YES (p-YES) ist im Vergleich zum YES im Mikrotiterplattenformat sensitiver und ermöglicht zudem die wirkungsorientierte Analyse Östrogen-aktiver Substanzen in (Umwelt)Mischungen (Spira et al. 2013, Buchinger et al. 2013, Schönborn et al. 2017). Ein weiterer Vorteil des p-YES ist, dass durch die direkte Auftragung des Extraktes auf eine Dünnschichtplatte, die Probe nicht in ein bio-kompatibles Lösemittel umgelöst werden muss, wodurch mögliche Substanzverluste vermieden werden.

Um die Kombination von Passivsammlern mit Biotesten für die Untersuchung östrogener Wirkungen zu testen, wurden Passivsammler, insbesondere Chemcatcher®, im Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage (siehe Kapitel 4.2.1) sowie in Oberflächengewässern im Flusseinzugsgebiet der Nette (siehe Kapitel 4.2.2) exponiert. Extrakte dieses Sammlertyps waren bereits in einer experimentellen Studie im YES eingesetzt worden, in der die Rolle von Fließbedingungen und verschiedener wässriger Medien (Flusswasser, Abwasser) auf die Probenahme polarer Verbindungen untersucht wurde (Vermeirssen et al. 2008b). In dieser Studie wurden Extrakte von Chemcatchern® nicht nur im YES sondern auch im p-YES untersucht.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage

Silikonstreifen und Chemcatcher® wurden vier Wochen im Zu- und Ablauf der Kläranlage exponiert (siehe Kapitel 8.4.2). Die Extrakte dieser Passivsammler sowie mittels SPEangereicherte Wasserschöpfproben wurden im YES und p-YES auf ihr östrogenes Potential untersucht.

4.2.1.1 YES

Die Abbildung 5 zeigt die östrogene Wirkung von Chemcatcher®-Extrakten aus der Kläranlage im YES. In diesem Test zeigten Chemcatcher®, die im Zulauf der Kläranlage exponiert worden waren, mit einem Estradiol-Äquivalent (EEQ) von etwa 4 ng mL⁻¹ Extrakt die höchste östrogene Wirkung (siehe Anlage 6). Im Vergleich dazu waren die Effekte in Extrakten von Chemcatchern®, die im Ablauf exponiert worden waren, um mehr als die Hälfte niedriger. Auch die chemische Analyse (siehe Kapitel 8.6.1) von Chemcatcher®-Proben zeigt, dass die Konzentrationen hormonaktiver Substanzen im Ablauf deutlich niedriger waren als im Zulauf (siehe Tabelle 6). So konnten im Zulauf von den östrogen aktiven Substanzen E1, E2, E3 und Bisphenol A quantifiziert werden. Dabei wurde Bisphenol A mit 66 ng mL⁻¹ Extrakt in der höchsten Konzentration gefunden, während die Konzentrationen aller anderen untersuchten Hormone im einstelligen ng mL⁻¹ Bereich lagen. Im Ablauf konnten von den östrogen aktiven Substanzen nur Bisphenol A und E1 quantifiziert werden, während die anderen östrogen aktiven Substanzen unter der Bestimmungsgrenze von 0,5 bzw. 0,25 ng mL⁻¹ Extrakt lagen.



Abbildung 5: Östrogene Wirkung von Proben aus einer Kläranlage

Östrogene Wirkung (EEQ) in ng mL⁻¹ in Extrakten von Chemcatchern[®] sowie in SPE-Extrakten von Wasserschöpfproben, die im Zu- (Zu) bzw. Ablauf (Ab) einer Kläranlage exponiert bzw. entnommen wurden. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens drei unabhängig durchgeführten Biotesten. Der LOQ entspricht ca. ≤ 0,5 ng mL⁻¹ EEQ⁶. Links: Es wurden drei Chemcatcher[®]-Proben (1-3) aus dem Zulauf (Zu) bzw. 2 Chemcatcher[®]-Proben aus dem Ablauf (Ab; 1 und 2) untersucht. Die 3. Chemcatcher[®]-Probe aus dem Zulauf wurde vor der Untersuchung im Biotest 2-fach konzentriert. Rechts: Es wurde jeweils eine Wasserschöpfprobe aus dem Zu- bzw. Ablauf nach Festphasenextraktion analysiert. Die Zu- und Ablaufprobe waren 200- (Zulauf) bzw. 500-fach (Ablauf) aufkonzentriert worden. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Hormon	BG	Zulauf	Ablauf
Estron (E1)	0,05	4,6	0,2
17 β -Estradiol (E2)	0,5	2,3	<0,5
Estriol (E3)	0,25	5,9	<0,25
17 α -Ethinylestradiol (EE2)	0,5	<0,5	< 0,5
Bisphenol A	1	66	18

 Tabelle 6:
 Konzentrationen von Hormonen in Passivsammlerextrakten

Konzentrationen in ng mL⁻¹ Extrakt von Chemcatchern[®] (je 1 Replikat, n =1), die im Zu- bzw. Ablauf einer Kläranlage exponiert worden waren. < = LOQ.

Im YES ergaben die Untersuchung parallel ausgebrachter Chemcatcher® (Zu 1 und 2 bzw. Ab 1 und 2) die gleichen Effekte (t-test, jeweils p >0,05). Darüber hinaus lag die Wiederfindung einer um den Faktor 2 aufkonzentrierten Chemcatcher®-Probe aus dem Kläranlagenzulauf (Zu 3 2fach) bei 203%. Auch in SPE-Extrakten waren die Effekte im Zulauf deutlich höher als im Ablauf. Die Daten dieser beiden Probenahmetechniken sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da sie ein unterschiedliches Probenahmefenster (4 Wochen vs. Schöpfprobe) widerspiegeln und die hydraulische Verweilzeit in der Kläranlage von ca. 24 Stunden berücksichtigt werden muss. In dieser Studie wurden die Sammelraten für die Chemcatcher® nicht bestimmt - allerdings für Silikonstreifen, die parallel zu den Chemcatchern® ausgebracht

⁶ Bezogen auf den Extrakt. Mittelwert für die verschiedenen, unabhängig durchgeführten Bioteste

wurden. Für diese waren die Sammelraten im Zu- und Ablauf vergleichbar (Rs(300) ca. 23 L Tag⁻), so dass anzunehmen ist, dass auch die Sammelraten der Chemcatcher® im Zu- und Ablauf vergleichbar waren. Mit Ausnahme einer Chemcatcher®-Probe aus dem Ablauf (Ab 1, RSD = 44%) war die relative Standardabweichung der Chemcatcher®-Proben mit < 18% vergleichbar mit der der SPE-Extrakte (< 17%).

Die Lösemittelextrakte von Silikonstreifen, die zeitgleich mit den Chemcatchern® im Zulauf der kommunalen Kläranlage exponiert worden waren, zeigten nur in einem von vier durchgeführten YES einen Effekt knapp oberhalb des LOQ (siehe Anlage 6; Silikonstreifen Zu_5). Grundsätzlich eignen sich Silikonstreifen für die Untersuchung hydrophoberer Analyten mit log K_{ow} > 3 (Smedes et al. 2002), wobei Östrogene log K_{ow}-Werte zwischen 2,8 und 4,17 aufweisen. Neben den untersuchten Östrogenen könnten allerdings auch andere Verbindungen, wie Alkylphenole, Phthalatester und bestimmte Pestizide, die ebenfalls dafür bekannt sind, die Regulation des Östrogenrezeptors zu stören, zu den östrogenen Effekten im YES beigetragen haben (Rastall et al. 2006). Allerdings kann auch die Aufreinigung der Passivsammlerextrakte die Biotestergebnisse beeinflussen: Diese Silikonstreifen wurden mit n-Heptan extrahiert, über eine Aluminiumoxid-Säule aufgereinigt und mittels n-Heptan eluiert. Wurde eine andere Aufreinigung durchgeführt[®] (siehe Anlage 6; EA_Zu_4), so wurden in drei von vier Biotesten Positivbefunde nachgewiesen. Daher sollte nach Möglichkeit auf eine Aufreinigung der Passivsammlerextrakte verzichtet werden, da diese die Chemikalienmischung im Extrakt modifizieren kann (Jahnke et al. 2016b).

4.2.1.2 p-YES

Chemcatcher[®]- und SPE-Proben, die bei der Probenahme in der Kläranlage gewonnen wurden, wurden zusätzlich in einem planaren YES (p-YES) auf ihr östrogenes Potential untersucht. Dabei wurden die Proben zunächst chromatographisch auf einer Dünnschichtplatte aufgetrennt, bevor die Platten mit einer Hefezellsuspension besprüht und der Biotest direkt auf der Dünnschichtplatte durchgeführt wurde (siehe Kapitel 8.5.4.2). Durch den Vergleich mit Standardmischungen der östrogen-aktiven Substanzen, E1, E2, E3 und EE2, können die Aktivitätsprofile der Proben charakterisiert werden. Weder in einer Blankprobe (Spur 5) noch in einer Lösemittelkontrolle (Spur 6) konnten östrogene Wirkungen im p-YES detektiert werden (siehe Abbildung 6).

Die Abbildung 6 zeigt, dass sowohl in den Chemcatcher®- als auch in den SPE-Proben aus der Kläranlage deutliche östrogene Wirkungen mit dem p-YES nachgewiesen werden können, wobei sich die Profile der verschiedenen Proben mit Ausnahme der SPE-Probe aus dem Ablauf ähneln. Grundsätzlich können die Daten quantitativ ausgewertet werden, indem die EEQ-Werte für jedes einzelne Signal berechnet werden. Dies war in diesem Fall nicht für alle Signale möglich, da das Fluoreszenzsignal der maximalen dotierten Menge an Estradiol in der Mischung der östrogenen Referenzverbindungen niedriger war als die einiger Signale, so dass die Ergebnisse nur semiquantitativ bewertet werden können. Falls dies möglich ist, werden nachfolgend EEQ-Werte angegeben (siehe Anlage 7).

⁷ Log Kow = KOWWIN v1.68 estimate (EPI Suite; U.S. EPA); E3 = 2,81, E1 = 3,43, E2 = 3,94, EE2 = 4,12

⁸ Elution der Aluminiumoxid (AlOx)-Säule mit n-Heptan, Nachextraktion mit Ethylacetat



Abbildung 6: Kläranlage: Östrogene Wirkung nach Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtplatte nach chromatographischer Entwicklung und anschließendem p-YES mit sichtbaren Fluoreszenzsignalen von 4-Methylumbelliferon (4-MU) bei 366 nm. Getestet wurden folgende Proben: Spur 1-4: je zwei Chemcatcher®-Extrakte aus dem Zu- und Ablauf der Kläranlage (Zu 1 und 2; Ab 1 und 2); Spur 5: ein Chemcatcher® (Blindprobe), der nicht exponiert worden war; Spur 6: Lösemittelkontrolle (Methanol, MeOH); Spur 7 und 8: jeweils ein SPE-Extrakt von einer Zu- und einer Ablaufprobe (SPE Zu, SPE Ab) sowie in Spur 9 bis 11 verschiedene Mengen einer Mischung von östrogenen Referenzverbindungen. Angegeben sind jeweils das aufgebrachte Probevolumen in µl (Passivsammler-, SPE-Proben, Blindproben) bzw. die aufgebrachte Menge der Referenzsubstanzen in pg. In der Mischung der östrogenen Referenzverbindungen entspricht die angegebene Masse der Menge an E2 und EE2, während die Menge an E1 und E3 10 bzw. 100fach höher waren als angegeben. Die Proben wurden jeweils auf Höhe der unteren gestrichelten Linie auf die Platte aufgetragen. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Wie bereits im konventionellen YES so haben die Chemcatcher®-Proben aus dem Zulauf auch im p-YES eine mindestens um den Faktor 2 höhere östrogene Wirkung als die Proben aus dem Ablauf (> 2,0 ng EEQ mL⁻¹ Extrakt). Darüber hinaus liegen die Effekte im p-YES in der gleichen Größenordnung wie im YES (unterer ng EEQ mL⁻¹ Bereich bezogen auf den Extrakt). In den Zulaufproben wurden die stärksten Fluoreszenzsignale bei folgenden Retentionsfaktoren (R_F) detektiert, wobei die Fluoreszenzsignale in der Reihenfolge R_F = 0,42 > 0,67 > 0,30 > 0,17 abnahm. Auch in der SPE-Probe aus dem Zulauf war das östrogen Profil ähnlich und die Fluoreszenzintensitäten nahmen in derselben Reihenfolge ab. Ein Vergleich mit den applizierten Standardmischungen (Spur 9 bis 11) zeigt, dass E2 (R_F = 0,42), E1 (R_F = 0,67) bzw. E3 (R_F = 0,17) ähnliche Mobilität auf der Dünnschichtplatte haben. Um die östrogen aktiven Substanzen eindeutig zu identifizieren, ist jedoch eine Extraktion der Substanzen von der Dünnschichtplatte bei den entsprechenden Fluoreszenzsignalen und die anschließende massenspektrometrische Analyse erforderlich (Buchinger et al. 2013).

In den Chemcatcher[®]-Proben aus dem Ablauf waren die Fluoreszenzsignale bei R_F = 0,42 mit 0,2 ng EEQ mL⁻¹ Extrakt um den Faktor 5 und bei R_F = 0,67 mit 0,4 ng EEQ mL⁻¹ um den Faktor 2,6 niedriger als im Zulauf, was darauf hindeutet, dass diese östrogen aktiven Substanzen in der Kläranlage abgebaut werden. In den Chemcatcher[®]-Proben sowie in der SPE-Probe aus dem Zulauf macht die östrogene Aktivität der unbekannten Substanz mit einem R_F = 0,30 ca. 20% der gesamten östrogenen Aktivität der Probe aus. In der SPE-Probe aus dem Kläranlagenablauf, die mit 0,9 ng EEQ mL⁻¹ Extrakt die niedrigste gesamte östrogene Aktivität aufweist, macht die Substanz bei R_F = 0,30 sogar ca. 70% der gesamten Fluoreszenzintensität dieser Probe aus.

Berücksichtigt man den Anreicherungsfaktor für die SPE liegen in der wässrigen Ablaufprobe EEQ von ca. 1,8 ng L⁻¹ EEQ vor, welcher im typischen EEQ-Bereich in behandelten Abwässern liegt (0,05 – 8 ng L⁻¹ EEQ; Kunz et al. 2017).

Im p-YES können aufgrund der Auftragung der Proben auf der Dünnschichtplatte und dem Abdampfen des Lösemittels eine höhere Sensitivität erzielt werden als im YES. Buchinger et al. (2013) haben für das E2 und das EE2 LOQ-Werte ermittelt, die ca. das 3fache niedriger waren im Vergleich zum klassischen YES in einer 96 well Platte, bei dem in der Regel LOQ-Werte von ca. 10 ng L⁻¹ in der Wasserprobe erzielt werden. Letzteres stimmt auch mit den Ergebnissen dieser Studie überein: bei einen LOQ von ca. 0,5 ng EEQ mL⁻¹ Extrakt und einer Anreicherung von ca. 200x mittels SPE, lag der LOQ im YES bei 10 ng EEQ L⁻¹ in der Wasserphase.

Darüber hinaus können Profile östrogener Aktivität im Zu- und Ablauf einer Kläranlage verglichen und beispielsweise die Bildung von Transformationsprodukten dokumentiert werden. Bei der Kopplung mit der passiven Probenahme können Aktivitätsprofile jedoch nicht quantitativ miteinander verglichen werden, da die Sammelraten der im Biotest aktiven Substanzen nicht bekannt sind und sich durch die Probenahme und Extraktion der Sammelphase die Chemikalienmischung ändert.

4.2.2 Feldstudie zur Überwachung von Oberflächengewässern

Im Flusseinzugsgebiet der Nette (RLP) wurden Chemcatcher® mehrere Wochen exponiert. Dabei wurden sechs verschiedene Probenahmekampagnen an bis zu sechs verschiedenen Standorten durchgeführt (siehe Kapitel 8.4.1). Von diesen Proben wurden für die Untersuchung östrogener Wirkungen mehrere Proben⁹ ausgewählt. Im Labor wurden die Chemcatcher®, analog zu den Proben aus dem Kläranlagenmonitoring (siehe Kapitel 4.2.1), mit Lösemittel extrahiert und die Extrakte im YES und p-YES eingesetzt. Von den insgesamt 14 analysierten Proben konnte im YES nur in einem Probenextrakt eine östrogene Wirkung knapp oberhalb der LOQ von ca. 1 ng mL⁻¹ EEQ bezogen auf den Extrakt detektiert werden. Um niedrigere Bestimmungsgrenzen zu erreichen, könnten mehrere Poolproben von Passivsammlerreplikaten hergestellt oder die Proben stärker angereichert und im YES getestet werden. Da dies im Routinemonitoring aufgrund des hohen Ressourcenverbrauchs und der Kosten wenig praktikabel ist, wurden die Proben im p-YES untersucht.

Im Gegensatz zum YES wurden im p-YES deutliche Fluoreszenzsignale in allen untersuchten Chemcatcher®-Proben detektiert (siehe Abbildung 7). Ähnlich wie beim Kläranlagenmonitoring (siehe Kapitel 4.2.1) können die Ergebnisse nur semiquantitativ bewertet werden, da es nicht für alle Fluoreszenzsignale möglich war, EEQ-Werte zu berechnen, da das Fluoreszenzsignal der maximalen dotierten Menge an Estradiol in der Mischung der östrogenen Referenzverbindungen schwächer war als einige Fluoreszenzsignale in den Proben.

In der Kampagne 3 (siehe Anlage 8) wurden in den Quellbereichen der beiden Fließgewässer (Standorte 1 und 2) keine bzw. sehr niedrige östrogene Wirkungen (insgesamt ca. 74 pg EEQ mL⁻¹ Extrakt) detektiert, während die höchste östrogene Aktivität mit insgesamt 0,07 AU¹⁰ am Standort 3 bestimmt wurde. Diese nahm nach der Mündung des Krufter Baches um den Faktor 2 am Standort 6 ab. Die östrogenen Profile an den Standorten 3 bis 6 waren sehr ähnlich, wobei die stärksten Fluoreszenzsignale bei R_F-Werten von 0,42 und 0,69 gemessen wurden. E2 und E1

⁹ jeweils eine Probe aus Kampagne 1 bis 5, da diese jeweils zwei Wochen exponiert worden waren und so ein zeitlicher Vergleich möglich war bzw. jeweils eine Probe aus Kampagne 3 an den 6 Standorten für einen räumlichen Vergleich

¹⁰ Eine Umrechnung in EEQ in pg mL⁻¹ Extrakt ist hier nicht möglich, da einige Signale über der Kalibrierung lagen.

zeigten auf der Dünnschichtplatte eine ähnliche Mobilität wie die Fluoreszenzsignale mit diesen R_F -Werten. Deutlich schwächere Fluoreszenzsignale wurden bei R_F -Werten von 0,21, 0,29 und 0,58 gemessen. Am Standort 4 (Krufter Bach Mündung) war die östrogene Aktivität bei einem R_F -Wert von 0,29 mind. um dem Faktor 2 höher als an den nahegelegenen Standorten in der Nette (Standorte 3, 5 und 6).

In den verschiedenen Probenahmekampagnen zwischen März und Juni 2018 (siehe Anlage 9) variierte die gesamte östrogene Aktivität in den Proben maximal um den Faktor 1,5 (Kampagne 4: 0,1 AU, Kampagne 2: 0,07 AU ~ 800 pg EEQ mL⁻¹ Extrakt). Insgesamt lag sie im Bereich des LOQ für den YES (ca. 1 ng mL⁻¹ Extrakt, siehe oben) und zeigt, dass die Sensitivität des YES im Mikrotiterplattenformat für die Untersuchung dieser Proben nicht ausreichend war. Ähnlich den östrogenen Profilen an den Standorten 3 bis 6 wurden in den verschiedenen Kampagnen ebenfalls die stärksten Fluoreszenzsignale bei R_F-Werten von 0,43 und 0,68 gemessen. Diese Fluoreszenzsignale machten in den Proben zusammen jeweils ca. 80% der gesamten Fluoreszenzsignale bei R_F-Werten von 0,20, 0,29 und 0,58 gemessen.



Abbildung 7: Oberflächengewässer: Östrogene Wirkungen nach Dünnschichtchromatographie



Zwei Dünnschichtplatten nach chromatographischer Entwicklung und anschließendem p-YES mit sichtbaren Fluoreszenzsignalen von 4-Methylumbelliferon (4-MU) bei 366 nm. Getestet wurden Chemcatcher®-Extrakte aus dem Oberflächengewässermonitoring im Flusseinzugsgebiet der Nette. Oben: Vergleich verschiedener Standorte (1 bis 6) in der Kampagne 3 (April/Mai 2018). Spur 1—6: verschiedene Standorte mit 1): Krufter Bach/Quelle, 2) Nette/Quelle, 3) Nette/Plaidt flussaufwärts, 4) Krufter Bach/Mündung, 5) Nette/Plaidt flussabwärts, 6) Nette, Weißenthurm. Spur 7: Chemcatcher®-Blindprobe sowie in Spur 8 – 13: verschiedene Mengen einer Mischung östrogener Referenzverbindungen. Unten: Vergleich verschiedener Probenahmekampagnen in 2018 (Kampagne 1 bis 5) vom Standort 5 (Nette/Plaidt flussabwärts). Spur 1-5: je eine Chemcatcher®-Probe aus der Kampagne 1 bis 5. Spur 6: Chemcatcher®-Blindprobe, Spur 7-10 verschiedene Mengen einer Mischung östrogener Referenzverbindungen. Auf beide Platten wurden jeweils 25 µl des Probevolumens bzw. 5 µl der Mischung östrogener Referenzverbindungen aufgetragen. Die Blindproben waren jeweils Chemcatcher®, die, wie die eigentlichen Proben für die Probenahme vorbereitet und extrahiert wurden, die jedoch nicht im Feld exponiert wurden. In der Mischung östrogener Referenzverbindungen entspricht die angegebene Masse der Menge an E2 und EE2, während die Menge an E1 und E3 10 bzw. 100fach höher waren als angegeben. Die Proben wurden jeweils auf Höhe der unteren gestrichelten Linie auf die Platte aufgetragen. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

5 Untersuchung dioxin-ähnlicher Wirkungen

5.1 Einleitung

Zennegg et al. (2016) konnten bereits zeigen, dass sich silikonbasierte Passivsammler¹¹ für die chemisch-analytische Untersuchung von dioxinähnlichen polychlorierte Biphenylen (dl-PCB) (und Indikator-PCB) in Oberflächengewässern eignen. So konnte der Eintrag von PCB durch eine Deponie an der Saane genauer charakterisiert, eine PCB-Punktquelle an der Birs identifiziert und die Effektivität von Maßnahmen zur Reduktion von PCB-Einträgen überprüft werden (Zennegg et al. 2016). Für die Untersuchung von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen und Dibenzofuranen (PCDD/F) wurden Polyethylen-Sammler in einem Hafen bzw. in Mündungsgewässern bei New York/New Jersey (USA) eingesetzt, die für ihre hohe Belastung mit PCDD/F, einschließlich des 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-p-dioxins (2,3,7,8-TCDD, Seveso-Gift), bekannt sind (Friedman et al. 2012, Friedman und Lohmann 2014).

Im Gegensatz zu Fischen, die häufig auch als passive Biomonitore¹² für Dioxine genutzt werden, sind Passivsammler während der Exposition fest stationiert, so dass die erhobenen Daten die Gewässerbelastung für einen definierten Standort und Zeitraum widerspiegeln. Dies ist auch ein Vorteil gegenüber Resultaten, die aus Sedimentproben gewonnen werden, da Sedimente durch Sedimentations- und Resuspensionsprozesse im Gewässer mobil sind. Darüber hinaus können Passivsammler auch für das Monitoring von Abwässern genutzt werden, deren Untersuchung mit herkömmlichen Methoden nur schwierig möglich ist. So konnte mit silikonbasierten Passivsammlern die PCB-Belastung von Grubenwässern in Nordrhein-Westfalen untersucht werden, nachdem sich die Analyse schwebstoffbürtiger PCB in den Grubenwässern durch die sehr geringen Schwebstoffmengen und die Ausfällung von Eisenocker als problematisch erwiesen hatten (Rahm et al. 2018, 2019).

Verschiedene Autoren haben bereits Passivsammlerproben in Biotesten eingesetzt, um dioxinähnliche Wirkungen nachzuweisen. In den meisten Studien wurden dabei POCIS¹³ oder semipermeable membrane devices (SPMD)¹⁴ genutzt und deren Lösemittelextrakte in Reportergentests mit Zellen oder Zelllinien von Vertebraten eingesetzt. So haben Harman et al. (2010) mit Extrakten von POCIS und SPMD, die nahe einer Offshore-Ölplattform in der Nordsee exponiert worden waren, die Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität in primären Hepatozyten von Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss) untersucht. In verschiedenen Studien wurde der EROD-Assay auch an der Zelllinie¹⁵ einer anderen limnischen Fischart mit POCIS und SPMD-Extrakten durchgeführt (Creusot et al. 2013, 2014, Tapie et al. 2011). Jarosova et al. (2012) haben Extrakte von zwei verschiedenen Varianten an POCIS, die in relativ unbelasteten Oberflächengewässern ober- und unterhalb von Kläranlagen exponiert worden waren, im H4IIE-luc Assay eingesetzt, mit dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelte Aktivität in einer Ratten-Hepatom-Zelllinie untersucht wird. Dieser Biotest wurde auch von Jalova et al. (2013) genutzt, um das dioxin-ähnliche Potenzial von SPMD- und POCIS-Extrakten zu untersuchen, die in Oberflächengewässern und Kläranlagenzu- und –abläufen exponiert worden waren. Extrakte des keramischen Toximeters, einem speziellen mit aktivierten Kohlenstoff gefüllten Passivsammler, der für das Monitoring von Dioxinen in Oberflächen- und Grundwasser entwickelt wurde (Addeck et al. 2012), wurde im Chemically

¹¹ PDMS-Folie, 0,040" Ultra-Thin Silicone Membrane SSPM823, 12"x 20 ft with white virgin Teflon liner, 1 mm Dicke, J-Flex- Rubber Products

¹² Probenahme von nativ im Gewässer vorkommenden Fischen.

¹³ POCIS = Polar Organic Chemical Integrative Sampler

¹⁴ SPMD = Semi Permeable Membrane Devices

¹⁵ PLHC-1; *Poecilipsis lucida*, Hepatomazellen,

Activated LUciferase gene eXpression (CALUX) Assay eingesetzt (Addeck et al. 2014). Der CALUX ist ein Reportergentest mit Säugerzellen, bei dem die Zellen genetisch so modifiziert wurden, dass sie auf dioxin-ähnliche Chemikalien durch die Induktion von Luciferase reagieren. Die Kopplung von passiver Probenahme mit Silikonstreifen mit einem Biotest für dioxin-ähnliche Wirkungen war von Emelogu et al. (2013) in Bächen und einem Ästuar in Schottland untersucht worden.

Ziel der vorliegenden Studie war es zu prüfen, ob die passive Probenahme mit Silikonstreifen mit dem Yeast Dioxin Screen (YDS) kombiniert werden kann, um dioxin-ähnliche Wirkungen in Oberflächengewässern zu untersuchen. Der YDS ist ein Reportergentest, mit genetisch veränderten Hefezellen, die den humanen AhR tragen. Zusätzlich hat der Hefestamm ein Expressionsplasmid für das Reportergen *lacZ*, das das Enzym ß-Galactosidase unter der Kontrolle des AhR-responsiven Elementes in einer Promotersequenz exprimiert (Miller 1999). Dieses System wird durch Agonisten des AhR induziert, die die Expression von *lacZ* und somit die Produktion der ß-Galactosidase auslöst. Die Menge der gebildeten ß-Galactosidase wird durch einen Enzymassay mittels CPRG analog zum YES photometrisch bestimmt. Als Untersuchungsgebiet wurde das Einzugsgebiet des Gelbachs (RLP), einem Zufluss der Lahn, ausgewählt, da dieses für die Belastung mit Dioxinen bekannt ist. Diese werden wahrscheinlich durch den Abbau von Tonen, in den Tongruben im Südwesten des Westerwaldes, die geogen bedingt mit Dioxinen belastet sind, in die Gewässer eingetragen (Engel et al. 2012). Neben Silikonstreifen sollte auch die Eignung von Chemcatchern® geprüft werden und die Ergebnisse der Passivsammler mit denen von Wasserschöpfproben verglichen werden.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Studie wurden zwei Standorte (Gelbach, Ahrbach) im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs untersucht. Silikonstreifen, die an diesen Standorten ausgebracht wurden, zeigen dioxinähnliche Wirkungen im YDS mit Werten von je etwa 7 μ g L⁻¹ ß-Naphthoflavon-Äquivalenten (NEFQ), wobei die Werte an beiden Standorten ähnlich waren (siehe Abbildung 8). Verglichen mit den anderen beiden Probenahmeverfahren, der passiven Probenahme mit Chemcatchern[®] und mit SPE-angereicherten Wasserschöpfproben, waren die Effekte in den Silikonstreifen am höchsten. Dies war zu erwarten, da Silikonstreifen hydrophobe organische Stoffe mit einem log K_{OW} > 3 anreichern. Dies zeigen auch die Ergebnisse der chemischen Analytik (siehe unten).

In den Chemcatchern[®] wurden maximal etwa 4,5 μg L⁻¹ NEFQ gemessen. Da die Chemcatcher[®]-Disk recht teuer sind, wurde von diesen allerdings jeweils nur eine extrahiert¹⁶, während drei Silikonstreifen zu einer Probe vereinigt wurden. Auch in anderen Studien wurden höhere dioxin-ähnliche Effekte in Passivsammlern für hydrophobe Stoffe, im Vergleich zu Proben aus Sammlern gefunden, die eher für hydrophile Stoffe geeignet sind (Creusot et al. 2013, Jalova et al. 2013). Dabei wurden SPMD bzw. POCIS-Sammler genutzt.

¹⁶ Eine Umrechnung der Messwerte auf die Masse der Sammelphase ist nur für absorptionsbasierte Sammler wie die Silikonstreifen sinnvoll. Da die Chemcatcher[®] adsorptionsbasierte Sammler sind, werden die Ergebnisse für diese Sammler daher nachfolgend auf das Extraktvolumen bzw. die Anzahl der Sammler bezogen.



Abbildung 8: Dioxinähnliche Wirkung im YDS

Dioxinähnliche Wirkung der Extrakte aus Silikonstreifen und Chemcatchern[®] sowie aus Oberflächenwasserproben im Yeast Dioxin Screen (YDS), die im Gelbach und Ahrbach exponiert bzw. genommen wurden. Die dioxinähnliche Wirkung wird als β-Naphthoflavonäquivalente (NFEQ) in µg L⁻¹ Extrakt (arithmetische Mittelwerte der technischen Replika ± Standardabweichungen) angegeben. Die Oberflächenwasserproben wurden mittels Festphase extrahiert (Festphasenextraktion = SPE). Die Proben wurden zweimal an unterschiedlichen Tagen im Biotest untersucht (1. bzw. 2. Ansatz), wobei jeweils dieselbe Passivsammler- (n = 1; 1 Probe = 3 Silikonstreifen bzw. 1 Chemcatcher[®]) bzw. Oberflächenwasserprobe (je 1 L) getestet wurde. Die Bestimmungsgrenze (BG) ist der Mittelwert aller 12 Testansätze und wird aus der Summe der zehnfachen Standardabweichung der Replikate, der Negativkontrollen sowie dem Mittelwert der Negativkontrollen ermittelt. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Im Gelbach war die dioxinähnliche Wirkung in den Passivsammlerextrakten sowie im 2. Ansatz der SPE minimal höher als im Ahrbach (max. Faktor 2,5). Berücksichtigt man die Sammelrate für die Silikonstreifen, die im Gelbach etwa um den Faktor 1,25 höher lag als im Ahrbach, so relativiert dies den Unterschied in der dioxinähnlichen Wirkung, der mit diesen Sammlern zwischen den beiden Standorten gefunden wurde. Die Sammelraten (nicht dargestellt) für die Silikonstreifen wurden wie in Becker et al. (2020) beschrieben, in situ mit Hilfe von Referenzverbindungen bestimmt. Bei einer Wiederholung des YDS mit denselben Proben (2. Ansatz, siehe Abbildung 8) zeigte sich eine signifikante Korrelation der Ergebnisse beider Testansätze (lineare Regression, y = 1,06x – 0,90; R² = 0,97, p = 0,0003).

Die Bestimmungsgrenzen in den Probenextrakten lagen bei 1,3 µg L⁻¹ NEFQ. Berücksichtigt man, dass die Silikon-zu-Wasser Verteilungskoeffizienten (log K_{SW}) dioxinähnlicher PCB im Bereich > 10⁶ (vergleiche Anlage 10 und Anlage 14) liegen, entspricht dies Bestimmungsgrenzen in der Wasserphase im einstelligen pg L⁻¹ NEFQ-Bereich oder darunter. Mit demselben Testsystem fanden Höher et al. (Entwurf) max. 37 µg L⁻¹ NEFQ in einer nativen Abwasserprobe aus der teerverarbeitenden Industrie. Allerdings war in Abwasserproben die Wiederfindung von β-Naphthoflavon (βNF) im YDS - möglicherweise durch die Bindung dioxinähnlich-wirkender Substanzen aufgrund ihres hohen log K_{OW} an Partikel - gering (Höher et al., in Vorbereitung). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 9, dass bei Zugabe von 50 µg L⁻¹ βNF zu den Passivsammlerextrakten (Standardaddition), die Wirkung im YDS in etwa der Wirkung der nativen Probe plus des Standards entspricht (Wiederfindung zwischen 96 und 123%).





Dioxinähnliche Wirkung der Extrakte aus Silikonstreifen und Chemcatchern[®] nach Standardaddition. Es wurden die gleichen Proben getestet wie in Abbildung 8, wobei vor der Testdurchführung zu den Passivsammlerextrakten jeweils 50 µg L⁻¹β-Naphthoflavon (β NF) zugefügt wurde. Die dioxinähnliche Wirkung wird als β -Naphthoflavonäquivalente (NFEQ) in µg L⁻¹ angegeben. Die Proben wurden zweimal an unterschiedlichen Tagen im Biotest untersucht (1. bzw. 2. Ansatz), wobei jeweils dieselbe Passivsammler- (n = 1; 1 Probe = 3 Silikonstreifen bzw. 1 Chemcatcher[®]) bzw. Oberflächenwasserprobe (je 1 L) getestet wurde. Die Bestimmungsgrenze (BG) ist der Mittelwert aller 12 Testansätze und wird aus der Summe der zehnfachen Standardabweichung der Replikate, der Negativkontrollen sowie dem Mittelwert der Negativkontrollen errechnet. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Wie andere AhR-basierte Bioteste ist der YDS nicht nur für Dioxine und dioxinähnliche PCB, sondern auch für einige polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK, u.a. polychlorierte Naphthalene), polybromierte Diphenylether (PBDE) und natürliche Stoffe (u.a. heterozyklische Amine) sensitiv (Eichbauch 2016). So erklärten die 16 U.S. EPA PAK zwischen 47 und 118% der Wirkung im H4IIE-luc Assay in Sedimentextrakten der Elbe. Und im DR CALUX Biotest war der Großteil der dioxinähnlichen Aktivität in Sedimenten aus Ost-Shetland anderen Verbindungen wie PAK zuzuschreiben (Otte et al. 2013). Um ausschließen zu können, dass in den Passivsammlerproben PAK dioxinähnliche Wirkungen im YDS hervorrufen, könnte die PAK-Mischung anhand der in den Extrakten quantifizierten Konzentrationen artifiziell hergestellt und im YDS getestet werden. Da die PAK-Standards häufig nur in Mischungen verfügbar sind, wurde in dieser Studie darauf verzichtet. Alternativ könnten die Extrakte auch fraktioniert und die verschiedenen Fraktionen im Biotest untersucht werden. In dieser Studie können wir nicht ausschließen, dass auch andere Stoffe beispielsweise PAK zur dioxinähnlichen Wirkung der untersuchten Proben beigetragen haben.

In Passivsammler- und SPE-Extrakten wurden auch chemisch-analytisch PCDD/F und dl-PCB quantifiziert (siehe Kapitel 8.6.3, Anlage 14). Wie aufgrund der starken Anreicherung hydrophober Stoffe zu erwarten (Smedes et al. 2002), wurden die höchsten Konzentrationen in den Extrakten der Silikonstreifen bestimmt, die im Gelbach und Ahrbach exponiert worden waren. So lagen die Werte der PCDD bei ca. 80 im Ahrbach bzw. 40 ng L-1 Extrakt im Gelbach und die der dl-PCB bei etwa 1000 ng L-1 Extrakt. Von den PCDF konnten ausschließlich das 2,3,7,8-TCDF und das 2,3,4,7,8-PeCDF in den Silikonstreifen quantifiziert werden. Die Standardabweichungen der drei Replikate lagen bei < 20 % für die dl-PCB. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen waren die Standardabweichungen der PCDD höher. Insgesamt ergibt sich jedoch eine gute Reproduzierbarkeit. In der Feldkontrolle und im "procedural Blank" (t₀)¹⁷ wurden keine PCDD/F und dl-PCB detektiert. Chemcatcher® sind eher für die Probenahme polarer Verbindungen mit log K_{0W}-Werten von ca. -1,5 bis 5,5 geeignet

¹⁷ Passivsammler, der wie die eigentlichen Proben vorbereitet, mit Referenzverbindungen dotiert, extrahiert und analysiert wurde, der aber nicht im Feld exponiert wurde.

(Charriau et al. 2016). Dementsprechend konnten weder PCDD/F noch dl-PCB¹⁸ in den Chemcatcher[®]-Extrakten nachgewiesen werden. Es ist daher unklar, welche Substanzen die dioxinähnlichen Wirkungen in den Chemcatcher[®]-Extrakten (siehe Abbildung 8) hervorgerufen haben. Möglicherweise sind weniger hydrophobe Verbindungen wie PAK oder unbekannte Stoffe für die dioxin-ähnlichen Effekte verantwortlich. Ähnlich argumentieren auch Jarosova et al. (2012), die bei der Untersuchung von POCIS-Extrakten im H4IIe-luc Assay dioxin-ähnliche Wirkungen in relativ unbelasteten Oberflächengewässern gefunden haben.

In den SPE-Extrakten wurden an beiden Standorten Dioxine mit max. 2 ng L⁻¹ Wasser (Summe der PCDD) gefunden. Die PCDF konnten in den SPE-Extrakten nicht nachgewiesen werden, während von den dl-PCB nur das PCB 77 mit je etwa 0,06 ng L⁻¹ an beiden Standorten gefunden wurde.

Die Kongenerenverteilung der PCDD/F in den Silikonstreifen ähnelte denen in anderen Umweltproben aus dem Gelbachsystem: Die Tongruben im Südwesten des Westerwaldes, die zu einem Großteil zur Feststofffracht im Gelbachsystem beitragen, weisen geogen bedingt erhöhte Dioxingehalte auf (Engel 2012). In den aktiven Tongruben sowie in Schwebstoffproben des im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs und im Saynbach waren die Konzentrationen des OCDD und des 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD ebenfalls am höchsten, während die Furane meist deutlich geringere Konzentrationen aufwiesen oder nicht nachgewiesen werden konnten (Engel 2012, Kalbhenn und Korte 2015). Die dl-PCB konnten in einigen aktiven Tongruben nicht nachgewiesen werden bzw. das PCB118 erreichte, ähnlich wie in den Silikonstreifen, die höchsten Werte, gefolgt von den PCB-Kongeneren 156, 105 und 167 (Kalbhenn und Korte 2015). Silikonstreifen können folglich genutzt werden, um die Kontamination von Oberflächengewässern mit Dioxinen zu untersuchen und auch die Profile von PCDD/F sowie dl-PCB verschiedener Standorte miteinander zu vergleichen.

Anhand der chemischen Analysenergebnisse wurden auch die WHO-TEQ (2005)¹⁹ ermittelt (siehe Anlage 15). In den Silikonstreifen wurden etwa 3 ng L⁻¹ Extrakt gemessen, wobei die Werte an beiden Standorten recht ähnlich waren und die dl-PCB etwa ein Drittel des WHO-TEQ (0,7 ng L⁻¹ bzw. ng kg⁻¹) ausmachten. In den Oberflächenwasserproben aus dem Gelbachsystem lagen die WHO-TEQ im einstelligen pg L⁻¹-Bereich). Die WHO-TEQ für die dl-PCB lagen in demselben Bereich den Zennegg et al. (2016) mit Passivsammlern in schweizerischen Fließgewässern ermittelt haben. Die Autoren fanden in der Aare und der Saane 0,075 bis zu 240 ng kg⁻¹ WHO-TEQ, wobei der Spitzenwert nahe einer Deponie gemessen wurde. In der Birs, in der ebenfalls eine Quelle für Dioxine identifiziert werden konnte, wurden Werte von 0,25 bis 1,3 ng kg⁻¹ WHO TEQ für die dl-PCB ermittelt (Zennegg et al. 2016).

¹⁹ Toxizitätsäquivalente, die anhand von Toxizitätsäquivalenzfaktoren ermittelt werden, die die Weltgesundheitsorganisation 2005 vorgeschlagen hat

 $^{^{18}\}log$ Kow der analysierten PCDF/D und dl-PCB > 6

6 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnten mit verschiedenen Biotesten ökotoxikologische Effekte von Passivsammlerextrakten nachgewiesen und die Belastung von Oberflächengewässern beispielhaft charakterisiert werden. Dazu wurden Bioteste genutzt, die phytotoxische, östrogene oder dioxin-ähnliche Wirkungen anzeigen. Im Flusseinzugsgebiet der Nette konnten räumliche und zeitliche Unterschiede in der Belastung mit Photosynthese II-Inhibitoren und östrogenaktiven Substanzen gezeigt werden. Auch in einer Kläranlage konnten durch die Kopplung von Passivsammlern mit dem planaren PSII-Inhibitionstest unterschiedliche Belastungsmuster im Zu- und Ablauf nachgewiesen werden. Mit dem YDS konnten in zwei kleinen Fließgewässern, dem Gelbach und Ahrbach, dioxin-ähnliche Wirkungen detektiert werden, wobei diese in dieser Studie in Silikonstreifenextrakten höher waren als in Extrakten von Chemcatchern® und mittels SPE-angereicherter Wasserschöpfproben.

Im Gegensatz zur klassischen, chemischen Analytik ermöglichen effektbasierte Methoden die Bewertung von Chemikalienmischungen und deren (öko)toxikologischer Relevanz in der aquatischen Umwelt. Mit spezifischen Biotesten wie der Inhibition der Photosynthese oder dem YES können Substanzen oder Substanzgruppen untersucht werden, die einen gemeinsamen Wirkmechanismus haben. Neben der Anwendung von Passivsammlern für bioakkumulierende Chemikalien und der Priorisierung von Schadstoffen empfehlen Brack et al. (2017) die Integration effektbasierter Methoden, wie Bioteste und Biomarker, als einen wesentlichen Baustein für den Fortschritt des Monitorings im Rahmen der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie. Effektbasierte Methoden sind bereits wichtige Bestandteile von Umweltmonitoringprogrammen, da sie ökologische Effekte mit einer Gewässerkontamination verknüpfen können. Dabei können biologische Effekte beobachtet werden, wobei die verursachenden Chemikalien häufig nicht bekannt sind oder sie mit Hilfe chemisch-analytischer Methoden nicht detektiert werden können. Darüber hinaus können biologische Effekte aus geringen Konzentrationen mehrerer Substanzen resultieren, die additiv oder synergistisch wirken (Vethaack et al. 2017).

Bei der Untersuchung von Passivsammlerextrakten in Biotesten muss berücksichtigt werden, dass verschiedene Passivsammler verschiedene Schadstoffe bzw. Schadstoffgruppen anreichern und sie sich in ihrem Anreicherungsverhalten beispielsweise bzgl. der Aufnahmekinetik und dem Einfluss abiotischer und biotischer Effekte auf die Anreicherung unterscheiden. So wurden in dieser Studie in Extrakten von Chemcatchern®, die in Oberflächengewässern exponiert worden waren, mittels LC-MS/MS eine größere Anzahl an PSII-Inhibitoren detektiert als in Silikonstreifen (siehe Kapitel 3.2.1). In der Feldstudie zur Überwachung einer Kläranlage konnten mit den Chemcatchern® deutliche östrogene Wirkungen im YES nachgewiesen werden, während die Silikonstreifenextrakte - möglicherweise durch eine geringere Akkumulation an Östrogenen - in diesem Biotest meist keine Wirkung erzielten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich die extrahierte Polymermasse unterscheiden kann wie bei den dioxinähnlichen Wirkungen bereits diskutiert wurde (siehe Kapitel 5.2). In dieser Studie wurden die Wirkungen von Passivsammlerextrakten teils denen von SPE-Extrakten gegenübergestellt. Da die Passivsammler ein integratives Signal über den mehrwöchigen Expositionszeitraum der Sammler widerspiegeln während für die SPE Wasserschöpfproben bzw. 24h-Mischproben genutzt wurden, war ein direkter Vergleich nicht möglich. In künftigen Studien könnten parallel zur Exposition der Passivsammler Wassermischproben beispielsweise mit automatischen Probennehmer gesammelt und in Biotesten untersucht werden.

Die passive Probenahme gilt in Kombination mit der Anwendung von Sammelphasen mit gut definierten und konstanten Eigenschaften als eine zeit-integrative Technik mit der im Vergleich zur konventionellen Untersuchung von Wasserschöpfproben gleich bleibendere Ergebnisse bezüglich der Exposition in der Umwelt erzielt werden (Brack et al. 2017). Insbesondere bei der Anwendung silikonbasierter Sammler in Kombination mit Referenzverbindungen für die *in situ* Kalibrierung von Sammelraten können über den Expositionszeitraum der Sammler gemittelte Konzentrationen hydrophober organischer Schadstoffe in der Wasserphase bestimmt werden. Aktuelle Studien deuten jedoch daraufhin, dass die integrierende Funktion der passiven Probenahme bei zeitlich stark variierenden Schadstoffkonzentrationen beeinträchtigt werden kann. So konnten Kochleus et al. (Entwurf) in einer experimentellen Studie mit Silikonstreifen und Chemcatchern® in großen Fließrinnensystemen zeigen, dass nach Peakereignissen Zielanalyten vom Sammlerpolymer desorbieren. Der Zeitpunkt des Peakereignisses hat daher einen entscheidenden Einfluss auf die über den Expositionszeitraum gemittelten Konzentrationen. Dies ist vor allem für polare Substanzen relevant, deren Umweltkonzentrationen über die Zeit häufig stark variieren.

Insgesamt zeigten die eingesetzten planaren Bioteste, der p-YES für östrogene Wirkungen und der p-PSII-Test, u.a. durch die vollständige Verdunstung des Lösemittels auf der Dünnschichtplatte, eine höhere Sensitivität als die entsprechenden Bioteste im Mikrotiterplattenformat. Durch die Auftrennung der Extrakte auf der Dünnschichtplatte und den Vergleich des Laufverhaltens der Signale in den Proben mit denen der aufgetragenen Standards konnten zudem die Belastungsmuster genauer charakterisiert werden. Auch können sie Hinweise über das Vorkommen bislang unbekannter Substanzen liefern, die biologische Effekte bewirken können. In der untersuchten Kläranlage und in Oberflächengewässer wurden unbekannte Substanzen gefunden, die phytotoxische (siehe Kapitel 3.2) oder östrogene Wirkungen (siehe Kapitel 4.2) hervorrufen. Um diese identifizieren, können die Substanzen bei den entsprechenden Fluoreszenzsignalen von den Dünnschichtplatten extrahiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden (Buchinger et al. 2013).

In dieser Studie konnten die Ergebnisse der planaren Bioteste allerdings teils nur semiquantitativ bewertet werden, da die Signale der Standards (p-YES: Mischung östrogener Referenzverbindungen, p-PSII: verschiedene PSII-Inhibitoren) niedriger waren als die einiger Signale in den Proben. Für eine quantitative Auswertung der Daten wären zusätzlich die Testung der entsprechenden Proben mit der Auftragung eines geringeren Extraktionsvolumen auf die Dünnschichtplatte und - vorausgesetzt die Wirksignale werden nicht überlagert - höhere Konzentrationen der Mischung an Standards erforderlich. Bei der Bewertung des p-YES würde dies die Ermittlung von Äquivalenzkonzentrationen in den Passivsammlerextrakten sowohl einzelner Signale als auch der Summe der detektierten Signale ermöglichen. Für den p-PSII-Inhibitionstest sollten künftig für eine exaktere Kalibrierung stets nicht nur einzelne Mengen der verschiedenen Referenzverbindungen sondern verschiedene Verdünnungsstufen deren Mischung getestet und ausgewertet werden (siehe Abbildung 3 unten).

In dieser Studie konnte nur die Eignung ausgewählter Bioteste und Passivsammler für das Gewässermonitoring untersucht werden. Eine Übersicht über Studien, die die passive Probenahme in aquatischen Lebensräumen mit Biotesten verknüpfen, geben Jahnke et al. (2016a), wobei die Autoren zwischen der passiven Probenahme in der Wasserphase, in Sedimenten und in Biota unterscheiden. Die Literaturstudie zeigt, dass bei der Bewertung ökotoxikologischer Effekte in der Wasserphase bislang vor allem POCIS als Passivsammler genutzt wurden, deren Extrakte häufig im YES eingesetzt wurden, um die Kontamination von Oberflächengewässern mit endokrinen Disruptoren oder die Effekte von Abwässern auf die Oberflächengewässerqualität zu bewerten. Neben den in diesem Bericht vorgestellten Biotesten, wurden Extrakte von Silikonstreifen mit dem AMES-Fluktuationstest untersucht, um eventuelle mutagene Effekte in Oberflächengewässern zu detektieren (Becker et al. 2016). Voruntersuchungen an Standorten in verschiedenen deutschen Oberflächengewässern hatten gezeigt, dass vor allem Rehlingen in der Saar ein hohes mutagenes Potential im AMES-Fluktuationstest aufwies, wobei verschiedene Teststämme von Salmonella typhimurium verwendet wurden, die für unterschiedliche Schadstoffgruppen sensitiv sind. Daraufhin waren im Mai/Juni 2015 Silikonstreifen entlang des deutschen Abschnitts der Saar und wichtiger Nebenflüsse sowie in der Mosel bei Trier exponiert worden (Becker et al. 2020). Die Mutagenität mit dem Teststamm YG1041, der sensitiv für aromatische Amine ist, war bei metabolischer Aktivierung mittels eines S9-Mix vor allem an der Mündung der Prims, einem Zufluss der Saar, um das 1,7-fache höher als an den anderen Standorten. Hierbei könnten PAK eine wesentliche Rolle spielen, da mit den Passivsammlern um ≥ Faktor 5 höhere Konzentrationen an 15 U.S. EPA PAK gefunden wurden als an den anderen Standorten. Laufende Arbeiten zeigen, dass Silikonstreifenextrakte auch im Leuchtbakterientest mit Aliivibrio fischeri (in Anlehnung an DIN EN ISO 11348-1 (DIN 2008)) untersucht werden können, der eine akute Toxizität anzeigt. Nach 3- bzw. 7tägiger Exposition der Passivsammler im Vorklärbecken einer Kläranlage zeigten die Extrakte signifikante Wirkungen im Leuchtbakterientest, während diese nach der letzten Reinigungsstufe nicht nachweisbar waren.

Bei der Anreicherung von Umweltschadstoffen durch Passivsammler wird die Schadstoffmischung verändert, so dass diese im Lösemittelextrakt nicht mehr der in der Umwelt bzw. in der Wasserphase vorhandenen Mischung entspricht (Jahnke et al. 2016b). Ausschließlich die passive Gleichgewichtsprobenahme mit anschließendem passivem Dosieren in den Biotest führt nicht zu einer Veränderung der Chemikalienmischung im Vergleich zur ursprünglichen Probe. Allerdings birgt dieses Verfahren technische Schwierigkeiten beispielsweise bezüglich der Sensitivität insbesondere für wenig belastete Proben (Jahnke et al. 2016b). Jahnke et al. (2016b) diskutieren verschiedene Strategien für den Transfer von Mischungen organischer Schadstoffe aus der aquatischen Umwelt in Bioteste.

Grundsätzlich sind Bioteste im Mikrotiterplattenformat sowie planare Bioteste bei der Kopplung von passiver Probenahme mit der Bioanalytik vor allem für eine mögliche Anwendung im Routinemonitoring vorteilhaft. Im Gegensatz zu dem in dieser Studie angewandten limnischen Grünalgentest, für das 9 mL Extrakt benötigt werden, wird weniger Testgut bzw. Lösemittelextrakt benötigt, so dass weniger oder gar keine Passivsammlerextrakte vereinigt werden müssen und ein Extrakt ggf. in mehreren Biotesten parallel untersucht werden kann. Die Basisuntersuchungen mit dem limnischen Grünalgentest haben auch gezeigt, dass das Lösemittel, welches für die Extraktion der Sammler verwendet wird, eine Wirkung im Biotest erzielen kann. Die Ursachen für diesen Effekt im limnischen Grünalgentest sind unklar, zumal das Lösemittel vor der Durchführung des Biotests bis zur Trockene eingeengt wird. Ist es nicht möglich, das Extrakt in ein für den entsprechenden Biotest kompatibles Lösemittel zu lösen, sollte geprüft werden, ob die Passivsammler bereits mit dem Lösemittel extrahiert werden können, welches auch im Biotest eingesetzt wird. Für die chemische Analytik mittels GC-MS/MS werden Silikonstreifen in unserem Labor in der Regel mit n-Heptan extrahiert (Becker et al. 2020). In dieser Studie wurden Silikonstreifen für die anschließende Dosierung in die Bioteste in der Soxhlet-Apparatur mit Methanol statt n-Heptan extrahiert (siehe Kapitel 8.2).

7 Ausblick

In einem Review haben Taylor et al. (2019) kürzlich verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für die passive Probenahme organischer Schadstoffe im Wasser zusammengestellt. Dazu gehören u.a. 1.) das Monitoring der Effizienz von Prozessen wie beispielsweise der Reinigungsleistung von Kläranlagen, die 2.) Überwachung von Einträgen und der Verteilung von Schadstoffen sowie 3.) das Monitoring zeitlicher und räumlicher Trends. Darüber hinaus können mit Passivsammlern die 4.) Verteilung von Schadstoffen untersucht und 5.) verschiedene Passivsammlertypen verglichen werden. Diese und weitere Studien zeigen, dass Passivsammlerextrakte neben der chemischen Analytik auch in Biotesten für ebensolche Anwendungen genutzt werden können. Die Kombination der passiven Probenahme mit effektbasierten Methoden steckt noch in den Kinderschuhen, es bietet jedoch enormes Potenzial für eine Reihe spezifischer Fragestellungen im Oberflächengewässermonitoring.

Passivsammlerproben wurden bereits mehrfach eingesetzt, um die Kläranlageneffizienz und den Einfluss von Kläranlagen auf angrenzende Oberflächengewässer zu bewerten. Jalova et al. (2013) konnten beispielsweise zeigen, dass trotz hoher Reinigungseffizienz einer Kläranlage für zytotoxische Verbindungen, Xenoöstrogene und Xenoandrogene, diese zur Verschmutzung von Oberflächengewässern mit endokrinen Substanzen beiträgt. Durch die Kopplung von POCIS mit dem YES haben Vermeirssen et al. (2008a) den Einfluss von Kläranlagen auf das östrogene Potenzial in Fließgewässern untersucht und die Effizienz von Kläranlagen mit und ohne Sandfilter zur Eliminierung von Östrogenen bewertet. In dieser Studie erwies sich insbesondere die Kopplung der Chemcatcher® mit den planaren Biotesten, p-YES und p-PSII, als vielversprechend für eine künftige Anwendung in der Überwachung von Kläranlagen. Durch die Fraktionierung der Probenextrakte auf der Dünnschichtplatte ermöglichten die planaren Teste auch eine wirkungsorientierte Analyse und gaben Hinweise auf das Vorkommen von Transformationsprodukten.

In Folge dieser und vorangegangener Studien werden Passivsammlern nun auch im REFOPLAN-Projekt BiTe (Anwendung einer biologischen Testpalette auf konventionell und mit erweiterten Methoden behandeltes Abwasser, FKZ:3718 26 321 0) eingesetzt, in dem Empfehlungen zur chemischen und ökotoxikologischen Bewertung einer erweiterten Abwasserbehandlung erarbeitet werden. Hierbei werden Kriterien zur Erfolgskontrolle einer Abwasserbehandlung entwickelt, die auf einer Kombination chemischer und biologischer Parameter beruhen. Diese Parameter sollen sich hinsichtlich ihrer Aussagekraft ergänzen und eine möglichst umfassende Bewertung der Abwasserqualität ermöglichen. Für die Probenahme werden neben Tages- und Wochenmischproben entlang der Abwasserbehandlung auch Passivsammler mit verschiedenen Sammelphasen eingesetzt und im Vergleich zu den angereicherten Mischproben mittels verschiedener biologischer Testverfahren wie dem YES, dem YDS und dem AMES-Test untersucht. Gerade für die Bewertung der Eliminationseffizienz einer Kläranlage könnte der Einsatz von Passivsammlern sehr nutzbringend sein, da Schadstoffe über einen längeren Zeitraum integrativ gesammelt werden können und damit Tages- und Wochengänge nicht zu einer verzerrten oder sogar falschen Bewertung der Eliminationseffizienz führen.

Im Rahmen dieser Studie sollte darüber hinaus die Effizienz von Maßnahmen zur Reduktion des Eintrags von Schwebstoffen, die mit Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB belastet sind, aus Tongruben in Oberflächengewässer überprüft werden (siehe Kapitel 5). Durch den enormen zeitlichen Verzug der Maßnahmen in den Tongruben, war dies jedoch in diesem Projekt nicht mehr möglich. Da silikonbasierte Passivsammler hydrophobe Analyten sehr stark anreichern und die chemische Analytik von Dioxinen sehr herausfordernd ist, ist der Einsatz der Kopplung in diesem Zusammenhang besonders interessant und sollte künftig weiterverfolgt werden. Grundsätzlich ist der Einsatz der Kopplung von Passivsammlern mit effektbasierten Methoden vor allem für Substanzen oder Substanzgruppen, die chemisch nur schwer quantifiziert werden können, für Substanzen mit geringen Wirkkonzentrationen und für Substanzgruppen, die den gleichem Wirkmechanismus besitzen, attraktiv.

Untersuchungen im Flusseinzugsgebiet der Nette (siehe Kapitel 3 und 4) und der Saar (Kapitel 6) zeigen, dass durch die Verknüpfung der passiven Probenahme mit Biotesten räumliche und teils auch zeitliche Unterschiede in der toxischen Belastung nachgewiesen werden können. So haben z.B. Estoppey et al. (2015) gezeigt, dass die passive Probenahme zur Quellenidentifikation von PCB genutzt werden können. Galle et al. (2020) konnten mit Hilfe der passiven Probenahme über einen kompletten saisonalen Verlauf Pestizidkonzentrationen ermitteln und Fracht abschätzen. Wird eine zusätzliche Kopplung mit Biotesten durchgeführt, kann ein effektbasiertes räumliches Monitoring und Trendmonitoring durchgeführt werden. Insbesondere die planaren Bioteste erwiesen sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der wirkungsorientierten Analyse der Proben durch die Fraktionierung auf der Dünnschichtplatte als vielversprechend. Riegraf et al. (2019b) konnten kürzlich weitere klassische in vitro Bioteste mit der Dünnschichtchromatographie koppeln, mit denen künftig neben östrogenen Wirkungen weitere endokrine Effekte und dioxin-ähnliche Wirkungen in Oberflächengewässern – auch in Kombination mit der passiven Probenahme - untersucht werden können. Um die im planaren Biotest aktiven Substanzen eindeutig zu identifizieren, können Substanzen von der Dünnschichtplatte bei den entsprechenden Fluoreszenzsignalen extrahiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden (Buchinger et al. 2013). Für eine Routineanwendung sollten die planaren Bioteste und insbesondere der p-PSII-Test künftig optimiert und standardisiert werden (siehe Kapitel 3.2). Alternativ zu den planaren Biotesten können für wirkungsorientierte Analysen Passivsammlerextrakte auch fraktioniert und in Biotesten eingesetzt werden. So haben Creusot et al. (2013, 2014) zunächst die Verteilung steroid- und dioxin-ähnlicher Aktivitäten in Extrakten von Passivsammlern (POCIS, SPMD) und Sedimenten untersucht und anschließend Fraktionen der Extrakte analysiert, um die Herkunft der aktiven Substanzen zu identifizieren. Für eine umfangreichere Bewertung der Toxizitäten und Erstellung von Toxizitätsprofilen wurden in den letzten Jahren vermehrt mehrere Typen an Passivsammlern und Biotesten gleichzeitig getestet (Creusot et al. 2013, Liscio et al. 2014). Darüber hinaus kann die Messung der Toxizität von Passivsammlerextrakten im Labor auch mit der Untersuchung von Biomarkern oder ähnlichen Indikatoren für die Tiergesundheit in situ kombiniert werden, um eine integriertere Bewertung aquatischer Ökosysteme zu ermöglichen (Zounkova et al. 2014).

Die BfG setzt aktuell Passivsammler während Baggermaßnahmen oder bei der Unterbringung von Baggergut im Küstenbereich ein, um die Freisetzung und Bioverfügbarkeit hydrophober organischer Chemikalien zu bewerten. Für ein toxikologisches Monitoring solcher Maßnahmen könnten Passivsammlerextrakte, die in solchen Kampagnen gewonnen werden, künftig auch in Biotesten eingesetzt werden. Für die Bewertung bioverfügbarer organischer Schadstoffe sind auch Passivsammler interessant, die in Sedimenten angewandt werden, da mit diesen das Risiko von Schadstoffmischungen in dieser komplexen Matrix realistischer bewertet werden kann (Brack et al. 2009, Mayer et al. 2014). Witt et al. (2020) haben kürzlich ein detailliertes Protokoll für die Untersuchung hydrophober organischer Schadstoffe in Sedimenten mit Hilfe von Gleichgewichtssammlern wie beispielsweise silikon-beschichtete Glasgefäße veröffentlicht. Antoni (2013) hat Extrakte solcher Sammler, die *ex situ* mit Sedimenten exponiert worden waren, im YES eingesetzt, um endokrine Wirkungen in Sedimenten der Binnenelbe zu untersuchen. Im Vergleich zu konventionellen Lösemittelextrakten der Sedimente waren die östrogenen Effekte allerdings sehr gering und nur an wenigen Standorten nachweisbar.

Im November 2020 fand der Workshop "Passivsammler: Neue Entwicklungen für das Gewässermonitoring" statt, welcher gemeinsam vom Umweltbundesamt und der BfG organisiert wurde. Neben Beiträgen von Expert*innen aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz wurden die Ergebnisse dieses und des REFOPLAN-Projektes "Realistische Abbildung von Schadstoffbelastungen in Gewässern unter Einsatz von Passivsammlern" (PASTraMi, FKZ 3717 67 418 0) präsentiert. Die Teilnehmer*innen dieser Videokonferenz haben verschiedene Schwerpunkte für künftige Aufgabenfelder bzw. Forschungsbedarf identifiziert, von denen im Nachfolgenden die erwähnt werden, die für die Kopplung der passiven Probenahme mit Biotesten relevant sind:

Für einen Einsatz der Kopplung von passiver Probenahme mit Biotesten in das regulatorische Monitoring müssen die Methoden künftig optimiert und Standards erarbeitet werden. Bislang gibt es nur einen sehr grundlegenden ISO-Standard (ISO 2011) für die passive Probenahme und eine ICES-Richtlinie (Smedes und Booij 2012) für die Anwendung von Silikonstreifen als Passivsammler für hydrophobe organische Verbindungen in Oberflächengewässern. Weitere nationale und internationale Standards für andere Typen an Passivsammlern und weitere Zielanalyten aber auch für die Verwendung von Passivsammlerproben in Biotesten sind erforderlich. Für die Standardisierung von Verfahren mit Passivsammlern muss auch die Verfügbarkeit der Materialien langfristig sichergestellt sein: In den letzten Jahren gab es mehrfach Probleme bezüglich der Verfügbarkeit bestimmter Passivsammler, da die Produktion eingestellt (AlteSil™ Silikonstreifen, Altec Product Limited, Bude, UK; siehe Kapitel 8.1) oder der Vertrieb verlagert wurde (Empore™ SDB-PRS Disks, 3M™, St. Paul, MN, USA; Becker et al. 2021).

Werden adsorptionsbasierte Passivsammler eingesetzt, zu denen viele Sammler für hydrophile Substanzen und Metalle wie auch die in dieser Studie verwendeten Chemcatcher® gehören, ist die Aufnahme der (Ziel-)Analyten in die Sammelphase bislang nur unzureichend verstanden. Experimentelle Studien und mechanistische Modelle, die zum Verständnis dieser Aufnahmeprozesse beitragen, werden dringend benötigt – auch um die Aufnahme von Mischungen aktiver Substanzen in die Sammelphase zu verstehen. Das REFOPLAN-Projekt PASTraMi wird diesbezüglich einen wichtigen Beitrag leisten, da es die Aufnahme und Desorption verschiedener Substanzen in die Sammelphase von Passivsammlern in Abhängigkeit von Peakereignissen und anderer Effekte wie beispielsweise Biofouling untersucht.

8 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die Materialien und Methoden dieser Studie zusammengestellt. Um den Bericht möglichst kurz zu halten, wird nach Möglichkeit auf entsprechende Studien verwiesen oder die Durchführung von Untersuchungen stichwortartig oder tabellarisch dargestellt.

8.1 Passive Probenahme

In diesem Projekt wurden sowohl Silikonstreifen als auch Chemcatcher[®] eingesetzt. Der Ablauf der passiven Probenahme für die verschiedenen Untersuchungsgebiete (siehe Kapitel 8.4) war grundsätzlich gleich und ist in Tabelle 7 beschrieben.

	Silikonstreifen (Absorptionssammler) ²⁰	Chemcatcher [®] (Adsorptionssammler)
Materialien	Gas Permeable PDMS Membranes, 250 μm Dicke (=0.010'') (Shielding Solutions, Great Notley, Essex, UK) ²¹	Styroldivinylbenzol-Reversed Phase Sulfonat (SDB-RPS)-Disks, Ø 47 mm, (3M™, St. Paul, MN, USA ²²)
Vorbereitung	Zuschnitt auf geeignete Größe Aufreinigung mit Hilfe mehrerer Lösemittelextraktionen zur Entfernung von Kontaminationen und unvernetzter Silikonoligomere; Ggf. Dotieren mit Referenzverbindungen (PRC) ²³ Anschließend mit bidestilliertem Wasser spülen, abtrocknen und in Alufolie verpacken Lagerung bei ≤ -18 °C	30 Min. in einem Becherglas mit 20 mL Methanol/Disk geschüttelt Entfernung des Methanols Kurz mit 20 mL bidestilliertem Wasser/Disk geschüttelt Zugabe von 20 mL bidestilliertes Wasser/Disk und 30 Min. Schütteln Lagerung in bidestilliertem Wasser In Anlehnung an Fernández et al. (2014)
Ausbringvorrichtungen	Sammlerkörbe: Befestigung von bis zu 18 Silikonstreifen, Fixierung am Gewässerufer Konstruktion in Anlehnung an Smedes und Booij (2012) Metallstäbe: Verwendung bei geringer Wassertiefe; 60 cm Länge, Befestigung von bis zu 3 Silikonstreifen; Fixierung der Stäbe im Sediment Siehe Abbildung 10	Edelstahl-Gehäuse: Befestigung der Disks in Gehäusen; Fixierung der Gehäuse parallel in Fließrichtung des Gewässers im Sediment Konstruktion nach Vermeirssen et al. (2012) Siehe Abbildung 11

 Tabelle 7:
 Ablauf der passiven Probenahme für Silikonstreifen und Chemcatcher®

²⁰ Details zur passiven Probenahme mit Silikonstreifen siehe Becker et al. (2020)

²¹ In bisherigen Studien (z.B. Kraus et al. 2015, Becker et al. 2020) wurden meist AlteSil™ Silikonstreifen der Fa. Altec Product Limited (Bude, UK) eingesetzt. Die Herstellung dieses Produktes wurde jedoch in 2016 eingestellt. Ein internationales Wissenschaftlerkonsortiums hatte die in dieser Studie verwendeten Silikonstreifen der Fa. Shielding Solutions als alternatives Material vorgeschlagen (unveröffentlicht).
²² 3M™ hat die Herstellung dieses Produktes in 2018 eingestellt. In der Zwischenzeit wurde die Produktion von CDS Analytical LLC (Oxford, PA, USA) übernommen. Alternativ können z.B. AttractSPE™ Disks SDB-RPS der Firma AFFINISEP verwendet werden (Becker et al. 2021).

²³ Bei der chemischen Analyse der Passivsammler für die anschließende Bestimmung zeitgemittelter Konzentrationen erforderlich. Siehe Anlage 10.

	Silikonstreifen (Absorptionssammler) ²⁰	Chemcatcher [®] (Adsorptionssammler)
Ausbringung und Exposition	Transport in Kühlboxen (≤ 4 °C) zum Gewässer Feldkontrollen: Exposition während des Ausbringer Lagerung bei -28°C (Silikonstreifen) bzw. im Kühlsch Befestigung der Passivsammler an Ausbringvorricht Exposition von neun bis 18 Silikonstreifen pro Standort (nach der Exposition Vereinigung von je drei Silikonstreifen zu einer Mischprobe -> drei bzw. sechs Replikate/Standort) Exposition: ca. 28 Tage Passivsammler sollten sich während der gesamten befinden	ns an der Luft; während der Exposition der Proben hrank (Chemcatcher®) tung unmittelbar vor der Exposition i.d.R. Exposition von 3 Chemcatchern® pro Standort Exposition: i.d.R. 2 Wochen Expositionszeit unterhalb der Wasseroberfläche
olen	Feldkontrollen erneute Exposition an der Luft währ Entnahme der Ausbringvorrichtung(en) aus dem Ge In einem Eimer mechanische Reinigung von anhaftendem Bewuchs und Partikeln mit Elusswasser von der Probenahmestelle	rend des Einholens der Passivsammler ewässer; Entfernung der Passivsammler Vorsichtige Reinigung mit bidestilliertem Wasser und fusselfreien Tüchern Überführung in 10 ml. Headspace-Vials mit 6 ml
Einh	Auf Alufolie Entfernung des restlichen Bewuchses und des verbliebenen Wassers mit fusselfreien Tüchern und Verpacken der Silikonstreifen in Alufolie Verpacken der Feldkontrollen Transport von Proben und Feldkontrollen in Kühlbo	Aceton oxen (≤ 4 °C) in das Labor

In der Regel wurden für beide Sammlertypen je drei Replikate ausgebracht. Zusätzlich zu den eigentlichen Proben wurden auch Feldkontrollen mitgeführt, die dazu dienen mögliche Kontaminationen während des Aus- und Einbringens der Passivsammler ins Gewässer zu identifizieren. Bei der Verwendung von Referenzverbindungen (PRC) in den Silikonstreifen wurden zusätzlich je Probenahmekampagne drei bis sechs Proben verwendet, um die Konzentration der PRCs in den Silikonstreifen vor der Exposition im Gewässer zu ermitteln (sog. t₀-Proben). Für die Ausbringung wurden je nach Gewässertiefe und Befestigungsmöglichkeiten unterschiedliche Ausbringvorrichtungen genutzt (siehe Abbildung 7, Abbildung 8). Beim Einholen der Sammler wurden diese am Gewässer vorsichtig mechanisch gereinigt und anschließend ins Labor transportiert.



Abbildung 10: Ausbringvorrichtungen für Silikonstreifen

a – Passivsammlerkorb für die Ausbringung in Gewässern mit größerer Wassertiefe; b – Gestänge für die Befestigung von bis zu 18 Silikonstreifen, welches im Passivsammlerkorb (a) montiert wird; c – Edelstahlstange mit 3 Silikonstreifen, die im Sediment in geringer Wassertiefe fixiert werden kann; d – zwei Edelstahlstangen mit Silikonstreifen während der Exposition im Gewässer. Quelle: eigene Fotos, BfG.

Abbildung 11: Ausbringvorrichtungen für Chemcatcher®



a – zwei Chemcatcher[®]-Gehäuse mit Stangen für die Befestigung im Sediment, b – ein Chemcatcher[®] mit noch nicht verschraubtem Edelstahlgehäuse. Die Edelstahlgehäuse können alternativ auch direkt mit Hilfe von Kabelbindern an Passivsammlerkörben (Abbildung 10a) befestigt werden. Quelle: eigene Fotos, BfG.

8.2 Extraktion der Passivsammler

Im Labor wurden die Passivsammler mit Lösemittel extrahiert, wobei sich die Extraktion je nach Passivsammlertyp und anschließender Verwendung der Proben unterschied (siehe Abbildung 12). Von den Silikonstreifen wurden vor der Extraktion drei Stück zu einer Probe vereinigt. Sie wurden in einer Soxhlet-Apparatur entweder mit n-Heptan oder mit Methanol extrahiert. n-Heptanextrakte konnten anschließend mittels GC-MS/MS und Methanolextrakte mittels LC-MS/MS chemisch analysiert werden. Die Chemcatcher[®] wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mittels Methanol und Aceton extrahiert. Für die chemischen Analysen wurden zu den Passivsammlerextrakten interne Standards zugefügt (siehe Anlage 11 bis Anlage 13).

Für die Untersuchung der Extrakte in den Biotesten mussten diese ggf. in ein für die Testorganismen kompatibles Lösemittel wie Methanol, Ethanol oder DMSO überführt werden, indem das Probenextrakt zunächst bis zur Trockene eingeengt und anschließend in ein anderes Lösemittel wieder aufgenommen wurde.





[#] in Anlehnung an Vermeirssen et al. (2012). Der erste Extraktionsschritt wird mit Aceton durchgeführt, welches beim Einholen der Chemcatcher[®] in die Gasraum- Glasgefäße (headspace vials) vorgelegt wurde (siehe Kapitel 8.1). * Das Lösemittel wird je nach anschließender chemischer Analysemethode (LC-MS/MS – Methanol, GC-MS/MS – n-Heptan) ausgewählt. Sollen mit den Proben sowohl gas- als auch flüssigchromatographische Analysen durchgeführt werden, können die Silikonstreifen mit n-Heptan extrahiert werden. Für die LC-MS/MS Analytik werden die Extrakte dann in Methanol umgelöst. ^{\$} Siehe Anlage 4 [§] Die Aufreinigung der Extrakte mittels Aluminiumoxidsäule ist in Kapitel 7.1 beschrieben und im Detail in Becker et al. (2020) dargestellt. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

8.3 Festphasenextraktion von Wasserproben

In einigen Probenahmekampagnen wurden beim Aus- und/oder Einholen der Passivsammler auch mit einem Eimer Wasserschöpfproben am Gewässer entnommen, in Glasflaschen gefüllt und gekühlt ($\leq 4^{\circ}$ C) ins Labor transportiert. Im Labor wurden 0,5 – 2 L Wasserproben (Oberflächenwasser, Abwasser) mit einem Glasfaserfilter (47 mm, Typ A/C, 1 µm Porengröße von Pall, Port Washington, NY, USA) filtriert. Anschließend wurden die Proben mittels Festphase extrahiert (Festphasenextraktion, SPE; Buchinger et al. 2013). Dazu wurden Oasis[®] HLB-Kartuschen (200 mg, 6 cc) von Waters (Mildford/PA, USA) mit verschiedenen Lösemitteln (1*2 mL n-Heptan, 1*2mL Aceton, 3*2mL Methanol, 4*2 mL bidestilliertes Wasser) konditioniert. Die filtrierten Proben wurden auf die vorkonditionierten SPE-Kartuschen gegeben (Flussrate ca. 10 mL min⁻¹). Die Kartuschen wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit Methanol (4 * 2 mL) eluiert. Die Extrakte wurden unter einen leichten Stickstoffstrom auf ca. 500 µl eingeengt.

8.4 Monitoring

In diesem Projekt wurden verschiedene Probenahmekampagnen mit Passivsammlern durchgeführt: 1.) Im Flusseinzugsgebiet der Nette (siehe Kapitel 6.4.1) wurden Passivsammler ausgebracht und deren Extrakte auf hormonähnliche Wirkungen und Photosystem II-Inhibitoren untersucht. Dieselben Bioteste wurden auch an Proben angewandt, die 2.) in einer Kläranlage gewonnen wurden (siehe Kapitel 6.4.2). In einem weiteren Projekt wurden Passivsammler in Oberflächengewässern, die für ihre Belastung mit Dioxinen bekannt sind (siehe Kapitel 6.4.3) ausgebracht, und die gewonnenen Extrakte auf dioxinähnliche Wirkungen untersucht.

8.4.1 Flusseinzugsgebiet der Nette

Im Flusseinzugsgebiet der Nette wurden von März bis Juli 2018 insgesamt sechs Probenahmestandorte, zwei im Krufter Bach, einem Zufluss der Nette, und vier in der Nette untersucht. Um den Einfluss des Krufter Baches auf die Gewässerqualität der Nette bewerten zu können, lag von den Probenahmestandorten in der Nette im Stadtgebiet Plaidt einer oberhalb (4) und der andere unterhalb der Mündung des Krufter Baches (5). Darüber hinaus gab es einen Probenahmestandort (6) kurz vor der Nettemündung in den Rhein. In den Abbildungen 14 und 15 sind die Probenahmestandorte und deren Positionen im Flusseinzugsgebiet der Nette dargestellt.



Abbildung 13: Probenahmestandorte im Flusseinzugsgebiet der Nette

1 – Krufter Bach Quelle; 2 – Krufter Bach, Mündung; 3 – Nette, Quelle; 4 Nette Plaidt flussaufwärts; 5 Nette, Plaidt, flussabwärts; 6 Nette, Weißenthurm. Die Standorte 5 und 6 in der Nette wurden im Zeitraum vom 26.03. bis 04.07. in sechs Kampagnen untersucht. Die Standorte 1-4 wurden nur in der dritten Kampagne (23.04. – 07.05.) beprobt. Quelle:
 ©GeoBasis-DE/BKG 2012 (BKG), Wasser- und Schifffahrtsverwaltung des Bundes (WSV) und Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG); eigene Darstellung, BfG



Abbildung 14: Probenahmstandorte im Flusseinzugsgebiet der Nette

1 – Krufter Bach Quelle; 2 – Krufter Bach, Plaidt; 3 – Nette, Quelle; 4 Nette Plaidt flussaufwärts; 5 Nette, Plaidt, flussabwärts; 6 Nette, Weißenthurm. Quelle: eigene Fotos, BfG

An den beiden Standorten 5 und 6 in der Nette (Plaidt/flussabwärts, Weißenthurm) wurde vom 26.03. bis 4.07.2018 ein Langzeitmonitoring mit insgesamt sechs Probenahmekampagnen durchgeführt. Dabei wurden in den ersten fünf Probenahmekampagnen Passivsammler jeweils zwei Wochen lang exponiert, um die passive Probenahme methodisch zu etablieren und Schadstoffprofile erfassen zu können. Um langfristig Schadstoffe erfassen zu können, wurden die Passivsammler in der folgenden Probenahmekampagne vier Wochen exponiert (Tabelle 8). Alle sechs Probenahmestandorte wurden in der dritten Kampagne, vom 23.04. – 07.05.2018 untersucht.

Kampagne	Passivsammlertyp	Expositionszeitraum	Expositionsdauer
К1	Chemcatcher®	26.03 09.04.2018	2 Wochen
	Silikonstreifen		
К2	Chemcatcher®	09.04 23.04.2018	
	Silikonstreifen		
КЗ	Chemcatcher®	23.04 07.05.2018	
	Silikonstreifen		
К4	Chemcatcher®	07.05 22.05.2018	
	Silikonstreifen	07.0505.06.2018*	
К5	Chemcatcher®	22.0505.06.2018	
	Silikonstreifen	Nicht exponiert	
К6	Chemcatcher®	05.0604.07.2018	4 Wochen
	Silikonstreifen		

Tabelle 8: Probenahmekampagnen im Flusseinzugsgebiet der Nette

Angegeben sind die jeweilige Probenahmekampagne, der eingesetzte Passivsammlertyp, der Expositionszeitraum und die Expositionsdauer. * = 4 Wochen Exposition

8.4.2 Kläranlage

Im Juli 2018 (10.07. – 06.08.) wurden Chemcatcher® und Silikonstreifen vier Wochen im Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage (120.000 Einwohnergleichwerte) einer rheinlandpfälzischen Mittelstadt exponiert. Im Zulauf wurden die Sammler nach dem Sand- und Fettfang und im Ablauf nach der letzten Reinigungsstufe positioniert (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).



Abbildung 15: Schematische Darstellung der untersuchten kommunalen Kläranlage

Rote Pfeile markieren die Position der Passivsammler. Quelle: eigene Darstellung, BfG.



Abbildung 16: Probenahmestellen in der kommunalen Kläranlage

a – Kläranlagenzulauf, b – Kläranlagenablauf. Quelle: eigene Fotos, BfG.

Vor der Exposition wurden die Silikonstreifen mit PRC dotiert (siehe Kapitel 8.1), um die Sammelrate bzw. das beprobte Wasservolumen im Zu- und Ablauf bestimmen zu können. Für die Exposition in der Kläranlage wurden Sammlerkörbe als Ausbringvorrichtung genutzt (Becker et al. 2020). Dabei wurden die Silikonstreifen an den dafür vorgesehenen Halterungen des Edelstahlgestänges befestigt, während die Chemcatcher® mit Kabelbindern am Edelstahlgestänge fixiert wurden. Im Zulauf war der äußere Schutzkorb nach der Exposition komplett mit organischem Material zugesetzt und die Passivsammler stark mit Biobewuchs belegt. Im Ablauf war der Korb nicht zugesetzt, allerdings waren die Passivsammler stark mit Algen bewachsen. Zum Zeitpunkt des Ausbringens der Passivsammler wurde eine 1 L 24h-Mischprobe der vorherigen 24 Stunden von den Betreibern der Kläranlage zur Verfügung gestellt.

8.4.3 Altlasten in Oberflächengewässern

Silikonstreifen und Chemcatcher[®] wurden im Juni/Juli 2018 vier Wochen in zwei mit Dioxinen und dioxinähnlichen PCB belasteten Fließgewässern²⁴ (Gelbach und Ahrbach, RLP) exponiert (siehe Abbildung 17, Abbildung 18). Dabei wurden an zwei Standorten jeweils Chemcatcher[®]-Disks (n = 3 Replikate) und 15 mit PRC (siehe Anlage 1) beladene Silikonstreifen (n = 5 Replikate á 3 Silikonstreifen) ausgebracht. Parallel wurden Feldkontrollen (jeweils n = 1 Replikat Silikonstreifen bzw. Chemcatcher[®]-Disk) mitgeführt. Während des Ausbringens der Passivsammler wurden an beiden Standorten zusätzlich mittels Schöpfprobe je 1 L Oberflächenwasser entnommen.





Im Ahrbach und im Gelbach unterhalb der Mündung des Ahrbachs wurden Passivsammler (Silikonstreifen und Chemcatcher®) und Wasserproben entnommen. Quelle: ©GeoBasis-DE/BKG 2012 (BKG), Wasser- und Schifffahrtsverwaltung des Bundes (WSV) und Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG); eigene Darstellung, BfG

²⁴ Engel (2012); Kalbhenn und Korte (2015)



Abbildung 18: Probenahmestellen im Flusseinzugsgebiet des Gelbachs

a - Ahrbach, b – Gelbach. Quelle: eigene Fotos, BfG.

8.5 Bioteste

In dieser Studie wurden Passivsammlerextrakte in verschiedenen Biotesten untersucht. Beim limnischen Grünalgentest mit *Desmodesmus subspicatus* wurden relativ große Volumina der Passivsammlerextrakte benötigt, daher wurden nachfolgend zunächst Biotestsysteme im Mikrotiterplattenformat genutzt. Da die Sensitivität der Testsysteme teilweise noch nicht ausreichte, um Effekte quantifizieren zu können, wurden *in vitro* Testsysteme auf Dünnschichtplatten genutzt. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das Lösemittel der Proben nach der Auftragung auf der Dünnschichtplatte und vor der chromatographischen Trennung bis zur Trockene eingeengt wird, so dass die Probe höher konzentriert ist als im Probenextrakt.

In Tabelle 9 sind die angewandten Bioteste aufgeführt. Als Testorganismen wurden vor allem die limnische Grünalge *Desmodesmus subspicatus* und gentechnisch veränderte Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet. Der konventionelle Grünalgentest wurde in Reagenzgläsern durchgeführt, während alle anderen Tests entweder im Mikrotiterplattenformat (96-well Platten) oder auf Dünnschichtplatten durchgeführt wurden. Aliquote der Passivsammlerextrakte wurden in die Bioteste dotiert, wobei ein jeweils für den Biotest kompatibles Lösemittel (z.B. Wasser, Methanol, Ethanol, DMSO) gewählt wurde. Dazu musste der Lösemittelextrakt ggf. zunächst bis zur Trockene eingeengt und wieder in Lösemittel gelöst werden (siehe Tabelle 7). Auf eine Aufreinigung der Passivsammlerextrakte wurde nach Möglichkeit verzichtet, da diese die Chemikalienmischung im Extrakt modifizieren kann (Jahnke et al. 2016b) und dies bei den ausgewählten Biotesten nicht notwendig war. Die Endpunkte unterschieden sich in den Testsystemen, wobei die Hemmung des Photosystems II und die Aktivierung der Östrogenrezeptors jeweils sowohl im Mikrotiterplattenformat als auch auf der Dünnschichtplatte untersucht wurde.

Tabelle 9: Übersicht über angewandte Bioteste

Biotest	Format	Spezies	Expositionszeit	Endpunkt	Dosierung in den Biotest
Algentest	Reagenzgläser	Desmodesmus subspicatus	72 h	Chlorophyll- Fluoreszenz	Methanolischen Extrakt bis zur Trockene einengen und in Wasser aufnehmen
PS(II)- Inhibition	96-Well Mikrotiterplatten	Desmodesmus subspicatus	2, 4, 6 h	Hemmung von PS(II)	Methanolischen Extrakt einsetzen (3 % MeOH im Test)
p-PS(II)- Inhibition	Dünnschichtplatten	Desmodesmus subspicatus	30 min	Hemmung von PS(II)	Direkte Applikation des methanolischen Extraktes (ca. 5-100 μl)
YES	96-Well Mikrotiterplatten	Saccharomyces cerevisiae	20 h	Aktivierung des Östrogenrezeptors	Extrakt bis zur Trockene einengen und in gleichem Volumen Ethanol wieder aufnehmen
p-YES	Dünnschichtplatten	Saccharomyces cerevisiae	3 h	Aktivierung des Östrogenrezeptors	Direkte Applikation des methanolischen Extraktes (ca. 5-100 μl)
YDS	96-Well Mikrotiterplatten	Saccharomyces cerevisiae	20 h	Aktivierung des AhR	Extrakt bis zur Trockene einengen und in gleichem Volumen DMSO wieder aufnehmen

8.5.1 Limnischer Grünalgentest

In dieser Studie wurde der für die Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Eluaten, Poren- und Abwasserproben verwendete limnische Grünalgentest für die Untersuchung von Passivsammlerextrakten modifiziert. Der Test wurde in Anlehnung an die DIN 38412-33 (DIN 1991) und LAWA (1998) mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* durchgeführt.

Im limnischen Grünalgentest wurden zunächst Extrakte von Silikonstreifen untersucht. Dazu wurden Silikonstreifen (jeweils Poolprobe aus drei Silikonstreifen) in einer Soxhlet-Apparatur mit n-Heptan extrahiert und anschließend unter einem Stickstoffstrom auf ein mL eingeengt. 800 µl des Extraktes wurden in einer 50 mL Schottflasche unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt und in 30 mL bidestilliertem Wasser wieder aufgenommen (für den Algentest benötigtes Volumen). Diese umgelösten n-Heptanextrakte der Silikonstreifen zeigten allerdings stark schwankende und hohe Blindwerte im Algentest. Auch Feldkontrollen der Silikonstreifen²⁵ sowie Lösemittelkontrollen²⁶ zeigten unabhängig von der Verdünnungsstufe im Testansatz Hemmwerte von 0 bis 87 %. Wurden die Silikonstreifen hingegen in der Soxhlet-Apparatur mit Methanol extrahiert, bis zur Trockene eingeengt und anschließend wieder in Wasser gelöst, so wurden keine hohen Blindwerte festgestellt. Für die Untersuchungen im Algentest wurden die Silikonstreifen daher mit Methanol extrahiert.

Für die Chemcatcher®-Extrakte wurden pro Chemcatcher® 4 mL Extrakt hergestellt. Davon wurde von drei Sammlern je drei Milliliter entnommen und vereinigt. Diese Mischprobe wurde ebenfalls in einer 50 mL Schottflasche manuell unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt und mit 30 mL bidestilliertem Wasser wieder aufgenommen.

Grünalgen wurden nach Einstellung der Zellzahl und unter konstanten Wachstumsbedingungen mit einer geometrischen Verdünnungsreihe der Passivsammlerextrakte inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt und mit einem Kontrollansatz verglichen, um die Hemmwirkung zu ermitteln.

8.5.2 Grünalgentest im Mikrotiterplattenformat

Die Hemmung der Photosynthese der Süßwassergrünalge *Desmodesmus subspicatus* wurde nach Riegraf et al. (2019a) in transparenten 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurde die Hemmung des Photosystems II (PSII) mittels maxi Imaging-Pulse-Amplitude-Modulation (IPAM)-Fluorometer bestimmt, dass die effektive Quantenausbeute des PSII (YII) misst. Die Herkunft der Algen, das Ansetzen der Algenkultur und die Messung mit dem IPAM ist im Detail in Kapitel 8.5.4 beschrieben. Als Proben wurden methanolische Extrakte der Chemcatcher® verwendet, wobei die Konzentration von Methanol im Test 3 % nicht überstieg, um toxische Effekte auf die Algen zu vermeiden. Als Positivkontrolle wurde Diuron mit einer Testkonzentration von 43,7 µg L⁻¹ verwendet. Die Grünalgen wurden 2, 4 und 6 Stunden mit den Proben inkubiert.

8.5.3 Reportergentests im Mikrotiterplattenformat (YES und YDS)

In dieser Studie wurden zwei Reportergentests im Mikrotiterplattenformat durchgeführt: der Yeast Estrogen Screen (YES) und der Yeast Dioxin Screen (YDS). Die beiden Tests unterscheiden

²⁵ Silikonstreifen, die wie die eigentlichen Proben für die Exposition im Feld vorbereitet wurden, die jedoch beim Ausbringen und Einholen der Proben in einer Kühlbox (4° C) zur Probenahmestelle transportiert und dort an der Luft exponiert wurden. Während der Exposition der Proben im Feld wurden sie bei -18°C gelagert. Die Feldkontrollen wurden wie die eigentlichen Proben aufgearbeitet und analysiert.

²⁶ reines n-Heptan bis zur Trockene eingeengt und in 30 mL bidestilliertem Wasser wieder aufgenommen

sich durch die verwendeten Teststämme der Hefen (*S. cerevisiae*) (siehe Tabelle 10), die unterschiedliche Reportergene besitzen, mit denen sich entweder hormonähnliche oder dioxinähnliche Effekte nachweisen lassen. Als Referenzsubstanz wurde für den YES 17 β -Estradiol (E2) und für den YDS ß-Naphthoflavon (β NF) verwendet. Beide Tests werden analog auf die folgende Art und Weise durchgeführt.

Test	YES	YDS
Referenz	ISO 19040-1 (ISO 2018)	Analog zu ISO 19040-1 (ISO 2018)
Teststamm	S. cerevisiae BJ3505 nach McDonnell (1991)	S. cerevisiae nach Miller (1999)
Referenzsubstanz	17β-Estradiol (E2)	ß-Naphthoflavon (ßNF)
Induktionsrate	17β-Estradiol-Äquivalente (EEQ)	ß-Naphthoflavon-Äquivalente (NEFQ)

Tabelle 10: Verwendete Reportergentests im Mikrotiterplattenformat

8.5.3.1 Testdurchführung

Die Analyse der 1:100 mit autoklaviertem, bidestillierten Wasser verdünnten Passivsammlerextrakte mittels Reportergentests erfolgten nach ISO 19040-1 (ISO 2018). Dazu wurden sterile 96-Well Mikrotiterplatten mit 80 μl Probe bzw. Verdünnungen der Passivsammlerextrakte pro Well beladen. Insgesamt wurden je Test vier Replikate einer Probe in sieben Verdünnungsstufen getestet. Als Negativkontrolle wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet. Feldblindwerte und Lösemittelkontrollen wurden ebenfalls getestet. Als Referenz und zur Ableitung von 17β-Estradiol- (EEQ) bzw. ß-Naphthoflavon-Äquivalenzkonzentrationen (NEFQ) wurden zweifach auf jeder Platte Konzentrations-Wirkungskurven von sieben Verdünnungsstufen der jeweiligen Referenzsubstanz (E2 bzw. ßNF) gemessen.

Hefezellen (Lagerung in 15 % Glycerin (V/V), -80°C) wurden am Tag vor dem Test angeimpft und 20-22 h bei 30°C inkubiert. Durch eine photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde die Zellzahl bestimmt und die benötigte Menge an Zellsuspension ermittelt. Die errechnete Menge an Zellsuspension wurde zentrifugiert (2500g, 10 Min.), das Zellpellet wurde im Testmedium resuspendiert und die Zellzahl durch erneute Messung der OD₆₀₀ kontrolliert. In jedes Well wurden mit Ausnahme der Blankproben 40 µl der eingestellten Zellsuspension pipettiert.

Die Mikrotiterplatten wurden 18 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten 2 Min. geschüttelt und das Zellwachstum bei OD_{600} bestimmt.

Aus jedem Well wurde ein Aliquot von 30 μ l entnommen und in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Zu jedem Well wurden 50 μ l Substrat-Lösung (frisch hergestellt aus LacZ Lösung, Lyticase, Chlorophenol Rot- β -D- Galactopyranosid (CPRG), Cystein) zugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden erneut 1 h bei 900 rpm und 30°C inkubiert und abschließend zur Bestimmung der Reportergenaktivität die Absorption bei 580 nm gemessen.

8.5.3.2 Testauswertung

Der östrogene bzw. dioxin-ähnliche Effekt wurde als Induktionsrate berechnet: Die gemessene Absorption bei 580 nm, die die Aktivierung des entsprechenden Rezeptors durch östrogen- bzw. dioxin-ähnliche Substanzen widerspiegelt, wurde auf die gemessene Zelldichte (OD₆₀₀) normiert. Diese korrigierte Absorption der Probe wurde durch die korrigierte Absorption der entsprechenden Negativkontrollen korrigiert, um den Induktionsfaktor zu bestimmen. E2 bzw. βNF-Äquivalente (EEQ bzw. NEFQ) wurden für jede Verdünnung der Probe durch nicht-lineare Interpolation anhand der Messung der E2- bzw. βNF-Referenz berechnet. Die resultierenden EEQ bzw. NEFQ-Werte für jeden Verdünnungsschritt wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Der EEQ bzw. NEFQ-Wert für eine Probe wurde mit dem mittleren EEQ- bzw. NEFQ-Werten der Verdünnungsstufen berechnet, die im dynamischen Bereich der Referenzkurve des Standards lagen. Proben, die zytotoxische Effekte aufwiesen, wurden nicht ausgewertet, da toxische Effekte die Reportergenaktivierung überlagern können. Proben wurden als zytotoxisch bewertet, wenn deren Wachstum um mehr als 20% gegenüber der Negativkontrolle reduziert war.

8.5.4 Bioteste auf Dünnschichtplatte (p-YES, p-PSII-Inhibition)

Ein planarer Biotest wird nach chromatographischer Auftrennung der Proben und Standards bzw. Standardmischungen direkt auf der Oberfläche einer Dünnschichtplatte durchgeführt. Dazu wird der klassische Biotest beispielsweise im Mikrotiterplattenformat (vgl. Kapitel 8.5.3) durch verschiedene Modifikationen angepasst (z.B. Schönborn et al. 2017, Riegraf et al. 2019a, Buchinger et al. 2013). Planare Bioteste werden häufig mit dem Vorzeichen "p-" gekennzeichnet, um sie von klassischen Biotesten zu unterscheiden. In dieser Studie wurden der hefezellbasierte YES und ein algenbasierter Photosystem II-Inhibtionstest als planare Bioteste angewandt (siehe Tabelle 11). Vor der Durchführung der planaren Bioteste wurden die Proben jeweils mittels Dünnschichtchromatographie, die sich bei beiden Tests nur durch wenige Details unterscheidet, chromatographisch aufgetrennt (siehe Kapitel 0). Anschließend wurde entweder der planare YES (p-YES, siehe Kapitel 8.5.4.2) oder der planare PSII-Inhibitionstest (p-PSII, siehe Kapitel 8.5.4.3) durchgeführt.

Test	p-YES	p-PSII-Inhibition
Referenz	Spira et al. (2013) Buchinger et al. (2013) Schönborn et al. (2013, 2017)	Riegraf et al. (2019a)
Teststamm	Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BJ3505 nach McDonnell 1991	Süßwassergrünalge <i>Desmodesmus subspicatus</i> , SAG Stammnr. 86.81, Algenkultursammlung der Universität Göttingen
Referenzsubstanzen	17α-Ethinylestradiol (EE2) 17β-Ethinylestradiol (E2) Estron (E1) Estriol (E3)	Terbutryn Simazin Atrazin Diuron
Messprinzip	Reportergenassay: östrogenabhängige Expression der β-Galactosidase	Effektive Quantenausbeute des Photosystems II (YII) mittels Imaging Pulse-Amplitude-Modulation (IPAM)

 Tabelle 11:
 Verwendete Bioteste auf Dünnschichtplatte
Test	p-YES	p-PSII-Inhibition
Substrat	4-Methylumbelliferyl-β-D- galactopyranosid (MUG)	k.A.
Produkt	4-Methylumbelliferon (4-MU)	k.A.

k.A. – keine Angabe

8.5.4.1 Durchführung der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (high-performance thin-layer chromatography, HPTLC) wurde, wie von verschiedenen Autoren veröffentlicht (Spira et al. 2013, Buchinger et al. 2013, Schönborn et al. 2017 und Riegraf et al. 2019a) durchgeführt. Für den p-YES wurden 20 x 10 cm Siliziumgel 60 F₂₅₄-Platten (Merck, Deutschland) und für den p-PSII-Test 13 x 10 cm Siliziumgel-Platten (Merck, Deutschland) verwendet. Die Standardlösungen oder Proben wurden als Banden mit einem automatischen HPTLC-Applikationsgerät (ATS 4, CAMAG, Schweiz) mit Hilfe der Software visionCATS (CAMAG, version 2.5. SP1) auf die HPTLC-Platten gesprüht. Mit einem automatischen multiplen Entwicklungssystem (AMD2, CAMAG) wurde wie folgt eine zwei-Schritt Entwicklung durchgeführt: 1.) Fokussierung der Probenbande von der Auftragungslinie bei 8 mm bis zu 20 mm mit 100 % Methanol und anschließendem 2minütigen Trocknen unter Vakuum. 2.) Chromatographische Entwicklung der HPTLC-Platte bis zu 90 mm mit einer Lösemittelmischung aus Chloroform/Ethylacetat/Petroleum (55:20:25, V/V/V) als mobile Phase. Anschließend wurde die Platte erneut 7 Minuten unter Vakuum getrocknet. Um mögliche Interferenzen der Proben mit den anschließenden Messungen zu berücksichtigen sowie während der Entwicklung entstandene Unregelmäßigkeiten zu erkennen, wurden Fotos der entwickelten Platten unter weißem Licht und UV-Licht (254 nm und 366 nm) aufgenommen (TLC Visualizer 2, CAMAG).

8.5.4.2 Hefezellbasierter Biotest (p-YES)

Die Durchführung des p-YES wurde im Detail bereits von Spira et al. (2013), Buchinger et al. (2013) und Schönborn et al. (2017) beschrieben und wird hier nur in Kürze dargestellt. Nach der Chromatographie wurden die HPTLC-Platten mit 3 mL einer Hefezell-Suspension besprüht (HPTLC Derivatizer, CAMAG, Germany). Die Zelldichte der Suspension wurde zuvor auf 1500 ± 50 FAU bei 600 nm (ISO 7027) eingestellt.

Die besprühten HPTLC-Platten wurden anschließend in eine Plastikbox mit Deckel platziert, die wiederum in einem Inkubator (30 °C) mit gesättigter Luftfeuchte (>90% relative Feuchte) stand. Dort wurden die Hefezellen 3 Stunden exponiert.

Nach der Inkubation wurde das Substrat (siehe Tabelle 8) auf die HPTLC-Platte appliziert. Die Substratstammlösung wurde zu dem *lacZ*-Puffer zugefügt (finale Konzentration von 0,5 mg mL⁻ ¹) und die HPTLC-Platte wurde 5 min mit kalter Luft getrocknet. Anschließend wurden 2,5 mL der frisch hergestellten Sprühlösung mittels eines Derivatisators (HPTLC derivatizer, CAMAG, Germany) auf jede Platte aufgebracht. Für die enzymatische Reaktion wurden die Platten 6 Min. in einer Plastikschale ohne Deckel bei 37°C in einem Inkubator inkubiert.

Das Fluoreszenzsignal des gespaltenen Substrates, das ein Maß für das östrogene Potential der Substanz oder Probe ist, wurde bei einer Anregungswellenlänge von λ_{ex} =366 nm mithilfe des TLC Visualizer 2 (CAMAG) beobachtet und bildlich dokumentiert. Quantitative Auswertungen der Fluoreszenzsignale wurden mit einem TLC-Scanner (TLC Scanner 4, CAMAG) in

Kombination mit der Software *visionCATS* (CAMAG, version 2.5. SP1) durchgeführt. Für die Fluoreszenzdetektion des Substrates auf der HPTLC-Platte wurde eine Deuteriumlampe verwendet und die Anregungswellenlänge auf λ_{ex} =320 nm eingestellt. Um nur die emittierte Fluoreszenz über einem Schwellenwert zu detektieren, wurden Cutoff-Filter > 400 nm eingesetzt. Das Spaltmaß für den Scan wurde auf 10 x 0.6 mm eingestellt. Um Dosis-Wirkungskurven zu erstellen, wurden arbiträre Einheiten (arbitrary units, AU) der bestimmen Peakflächen verwendet.

8.5.4.3 Algenbasierter Biotest (p-PSII-Test)

Die Süßwassergrünalge *Desmodesmus subspicatus* von der Algenkultursammlung (SAG, Stammnr. 86.81) der Universität Göttingen wurde in Bringmann-Kühn-Medium (Bringmann und Kühn 1982) gehältert. Eine drei Tage alte Kultur wurde zentrifugiert (Hettich[®] Universal 320R, 2700 g, 10 Min.) und das Pellet in 10 mL L33-Medium (DIN 1991) resuspendiert. Vor der Auftragung auf die HPTLC-Platte wurde die Zelldichte der Algensuspension mit einem 96-Well Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Infinite[®] 200 PRO) auf eine optische Dichte (OD) von 3.7 ± 0.2 bei 685 nm eingestellt.

Die Bildgebung der Chl α -Fluoreszenz mittels maxi Imaging-Pulse-Amplitude-Modulation (IPAM)-Fluorometer für die Bestimmung der PSII-Inhibition (Schreiber et al. 2007) und die Kombination mit der HPTLC (Riegraf et al. 2019) wurden bereits im Detail veröffentlicht und werden nachfolgend kurz beschrieben.

2,5 mL der eingestellten Algensuspension wurden mit einem HPTLC-Derivatisator (CAMAG, roter Zerstäuber, Stufe 5) auf die chromatographisch entwickelten Platten aufgetragen, direkt mit einer sauberen Glasplatte abgedeckt und in das IPAM-Fluorometer platziert.

Das IPAM-Fluorometer wird für die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute (quantum yield, Y(II)) des Photosystems II (PSII) als ein Maß für die Effektivität der Photochemie des PSII verwendet. Das IPAM-Fluorometer beobachtet kontinuierlich die aktuelle Fluoreszenzausbeute F_t bei eingeschaltetem Messlicht. Bei konstanten Testbedingungen nimmt F_t in Anwesenheit von PSII-Inhibitoren zu (Schreiber et al. 2007). Die Messung weiterer Parameter erfolgt in Verbindung mit gesättigten Lichtimpulsen (saturation pulse, SP), die in Intervallen von 90 s appliziert wurden. Dies führt zu einer vollständigen Anregung aller Photosysteme und damit zu einer Blockade der photosynthetischen Elektronentransportprozesse durch die Bindung von reduziertem Plastochinon am D1-Protein im Photosystem II. Damit können weitere, durch die Chlorophyllantennen aufgenommene Lichtquanten nicht in chemische Energie umgesetzt werden, was zu einer maximalen Chlorophyllfluoreszenz führt. Kurz vor der SP-Applikation wird die aktuelle Fluoreszenzausbeute (Ft) für 3 s gemittelt, um die Fluoreszenzausbeute (F) zu bestimmen. Während des SP erreicht die Fluoreszenzausbeute ein Plateaulevel, so dass die maximal emittierte Fluoreszenz (F'm) bestimmt werden kann. Basierend auf diesen Parametern wird Y(II) gemäß der folgenden Gleichung ermittelt (Schreiber 2007, 2014):

Y(II) = (F'm - F) / F'm

Die Messung wurde mit den folgenden Einstellungen am IPAM durchgeführt: Intensität des Pulsmodulierenden Messlichts (ML) = 7, Pulsfrequenz des Messlichts (MF) = 1, gain =3, aktinisches Licht (AL) = 0 (Riegraf et al. 2019a). Das vom IPAM-Fluorometer generierte Y(II)-Bild wurde zur Daten- und Bilderfassung genutzt. Dafür wurden punktuell Bereiche von Interesse ausgewählt und anschließend die über den ausgewählten Bereich gemittelten Y(II)-Werte ausgelesen. Zusätzlich wurde nach der Datenerfassung das aktinische Licht eingeschaltet und das F_t-Bild dokumentiert. Die Berechnung der Inhibition des Photosystems II erfolgt auf Basis der Quantenausbeute (Y(II)) der Probe im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (Schreiber et al. 2007):

Inhibition [%] = $(1 - (Y(II)_{Probe} / Y(II)_{Kontrolle})) * 100\%$

8.6 Chemische Analyse der Passivsammlerextrakte

8.6.1 Photosynthese II- Inhibitoren und Östrogene

Die chemische Analytik der PSII-Inhibitoren und Östrogene erfolgte mit einer 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) gekoppelt mit einem QTrap 4500 Tandem Massenspektrometer (ABSciex, Farmingham, MA, USA) über eine Kinetex (\emptyset C18 Säule (\emptyset = 2.1 mm; L = 100 mm) mit entsprechender Vorsäule.

Die PSII- Inhibitoren wurden mit drei verschiedenen Methoden quantifiziert, die im Detail in Riegraf et al. (2019a) beschrieben sind.

Für die Östrogene bestand die mobile Phase aus 4 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Der Gradient startete mit 80% A und 20% B für 0,5 Minuten. Der Methanol (B)-Anteil wurde stufenweise erhöht: von 0,5 bis 2 Minuten auf 60%, von 2 bis 10 Minuten auf 70% und von 10 bis 10.1 Minuten auf 95%. Von 10,1 bis 11,5 Minuten wurde er konstant gehalten und bis zur 12. Minute dann wieder auf 20% abgesenkt. Diese Bedingungen wurden zur Äquilibrierung der Säule bis zur 15. Minute konstant gehalten. Die Flussrate betrug 400 μL min⁻¹, das Injektionsvolumen 40 μl. Die Östrogene wurden im ESI-negativ Mode gemessen.

Für die LC -MS/MS Analytik von Passivsammlerextrakten hat sich eine 1:10 Verdünnung aus einem 4 mL Volumen ohne weitere Aufreinigung bewährt. Die EE2-Analyse der Kläranlagenproben war ohne Aufreinigung nicht möglich, dafür wurden die Proben über eine C18 Säule fraktioniert und anschließend analysiert.

8.6.2 Referenzverbindungen für die Bestimmung von Sammelraten

In dieser Studie wurden Silikonstreifen für die Ermittlung der Sammelraten (R_s) der Passivsammler mittels GC-MS/MS auf 13 als PRC verwendete PCB-Kongenere (siehe Anlage 10) analysiert. Die chemische Analyse hydrophober organischer Analyten in Silikonstreifen-Extrakten ist im Detail in Becker et al. (2020) beschrieben und nachfolgend zusammenfassend beschrieben: Die Extrakte wurden jeweils mit einer 2 g Aluminiumoxidsäule aufgereinigt und unter einem Stickstoffstrom eingeengt (siehe Kapitel 8.2). Sie wurden mittels GC-MS/MS (GC-MS/MS 7000, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit einem 7890 GC-System mit GC Probengeber 80 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die GC-Säule war eine HP 5 MS Säule (30 m * 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent, J&W GC columns, USA). Die Konzentrationen der PRC in den Silikonstreifen wurden vor und nach der Exposition gemessen und der verbliebene Anteil der PRC in den Silikonstreifen (f(PRC)) nach der Exposition ermittelt. Mittels ungewichteter nicht-linearer Regression wurde der Regressionsparameter B bestimmt (Smedes und Booij 2012) mit dem die *in situ* Sammelrate, für eine Modellsubstanz mit einer Molekülmasse (M) von 300 g mol⁻¹ berechnet wurde (Rusina et al. 2010):

 $R_s = B / M^{0,47}$

8.6.3 PCDD/F und dl-PCB

n-Heptanextrakte von folgenden Proben, die im Gelbach und Ahrbach gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.3), wurden auf PCDD/F und dl-PCB analysiert:

- Silikonstreifen je 3 Replikate von beiden Standorten sowie eine Feldkontrolle
- Chemcatcher[®] jeweils 1 Replikat aus Gelbach und Ahrbach
- Oberflächenwasserproben jeweils 1 Replikat (1 L) aus Gelbach und Ahrbach, Anreicherung mittels SPE siehe Kapitel 8.3.

Die Herstellung der Passivsammler- und SPE-Extrakte ist in Kapitel 8.2 und Kapitel 8.3 beschrieben. Aliquote der Extrakte wurden an ein Vergabelabor geschickt und dort analysiert. Die Analyse der PCDD/F wurde nach ISO 18073:2004-04 (ISO 2004) und die der dl-PCB nach ISO 17858:2007 (ISO 2007) durchgeführt.

9 Quellenverzeichnis

Addeck, A.; Croes, K.; Van Langenhove, K.; Denison, M.; Elskens, M.; Baeyens, W. (2012): Dioxin analysis in water by using a passive sampler and CALUX bioassay. Talanta 88, 73-78

Addeck, A.; Croes, K.; Van Langenhove, K.; Denison, M.S.; Elhamalawy, A.; Elskens, M.; Baeyens, W. (2014): Time-integrated monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) in urban and industrial wastewaters using a ceramic toximeter and the CALUX bioassay. Chemosphere 94, 27-35

Antoni, C. (2013): Passive sampling of sediment-associated contaminants in the river Elbe, Master Thesis, Johann Wolfang Goethe-Universität Frankfurt am Mai, 106 S.

Balaguer, P.; Francois, F.; Comunale, F.; Fenet, H.; Boussioux, A.M.; Pons, M.; Nicolas, J.C.; Casellas, C. (1999): Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. Science of the Total Environment 233, 47-56

Becker, B.; Duffek, A.; Lepom, P.; Buchinger, S.; Möhlenkamp, C.; Claus, E.; Schäfer, S. (2016): Assessing the toxic potential of river water by combining passive sampling with bioassays. Poster Presentation. SETAC Europe, 22.-26. Mai, Nantes, FR

Becker, B.; Claus, E.; Möhlenkamp, C.; Bachtin, J.; Paschke, A.; Schäfer, S. (2020): Anwendung von Passivsammlern in Überwachungsprogrammen gemäß WRRL und MSRL - Identifizierung von Kontaminationsschwerpunkten, Referenzstandorten und neuen Schadstoffen (AnPassa), UBA Texte 110/2020, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 130 S. <u>https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/anwendung-vonpassivsammlern-in</u>

Becker, B.; Kochleus, C.; Spira, D.; Möhlenkamp, C.; Bachtin, J.; Meinecke, S.; Vermeirssen, E. (2021): Passive sampler phases for pesticides: evaluation of AttractSPETM SDB-RPS and HLB versus EmporeTM SDB-RPS, Environmental Science and Pollution Research, published online 13.01.2021

Booij, K. (2019): Determination of influencing factors for the calculation of the freely dissolved pollutant concentrations using passive samplers andies their effect on measurement uncertain, Report for the German Federal Institute for Hydrology, Koblenz, 55 S.

Brack, W.; Bandow, N.; Schwab, K.; Schulze, T.; Streck, G. (2009): Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. Trac-Trends in Analytical Chemistry 28, 543-549

Brack, W.; Dulio, V.; Agerstrand, M. et al. (2017): Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. Science of the Total Environment 576, 720-737

Brinke, M.; Szöcs, E.; Foit, K.; Bänsch-Baltruschat, B.; Liess, M.; Schäfer, R.B.; Keller, M. (2017): Umsetzung des nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pestiziden – Bestandsaufnahme zur Erhebung von Daten zur Belastung von Kleingewässern der Agrarlandschaft. UBA Texte 89/2017, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 142 S. <u>https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/umsetzung-des-nationalen-aktionsplans-zur</u>

Buchinger, S.; Spira, D.; Bröder, K.; Schlüsener, M.; Ternes, T.; Reifferscheid, G. (2013): Direct Coupling of Thin-Layer Chromatography with a Bioassay for the Detection of Estrogenic Compounds: Applications for Effect-Directed Analysis. Analytical Chemistry 85, 7248-7256

Charriau, A.; Lissalde, S.; Poulier, G.; Mazzella, N.; Buzier, R.; Guibaud, G. (2016): Overview of the Chemcatcher (R) for the passive sampling of various pollutants in aquatic environments Part A: Principles, calibration, preparation and analysis of the sampler. Talanta 148, 556-571

Creusot, N.; Tapie, N.; Piccini, B.; Balaguer, P.; Porcher, J.M.; Budzinski, H.; Ait-Aissa, S. (2013): Distribution of steroid- and dioxin-like activities between sediments, POCIS and SPMD in a French river subject to mixed pressures. Environmental Science and Pollution Research 20, 2784-2794

Creusot, N.; Ait-Aissa, S.; Tapie, N.; Pardon, P.; Brion, F.; Sanchez, W.; Thybaud, E.; Porcher, J.M.; Budzinski, H. (2014): Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. Environmental Science & Technology 48, 3649-3657

Dermirpence, E.; Cuchesne, M.-J.; Badia, E.; Gagne, D.; Pons, M. (1993): MVLN cells: A bioluminescent MCF-7derived cell line to study the modulation of estrogenc activity. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 46, 355-364

DIN (1991): Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L33) DIN 38412 Teil 33:). DIN 38412 Teil 33, 12 S., <u>https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/textilnorm/veroeffentlichungen/wdc-</u> beuth:din21:1666207

DIN (2008): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von Vibrio fischeri (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (ISO 11348-1:2007), Deutsche Fassung EN ISO 11348-1:2008, pp. 36,

https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/textilnorm/veroeffentlichungen/wdcbeuth:din21:113162789

Eichbaum, K. (2016): In vitro bioassay tools for the toxicological evaluation of dioxins and dioxin-like compounds in sediments and biota, PhD thesis, RWTH Aachen, Worms, 219 S.

Emelogu, E.S.; Pollard, P.; Robinson, C.D.; Smedes, F.; Webster, L.; Oliver, I.W.; McKenzie, C.; Seiler, T.B.; Hollert, H.; Moffat, C.F. (2013): Investigating the significance of dissolved organic contaminants in aquatic environments: Coupling passive sampling with in vitro bioassays. Chemosphere 90, 210-219

Engel, M. (2012): Schwebstoffuntersuchungen im Gelbachsystem: Dibenzodioxine, Dibenzofurane, PCB und übrige Parameter, LUWG Kurzbericht, Landesamt für Umwelt, Wasserwirtschaft und Gewerbeaufsicht, Rheinland-Pfalz, Mainz, 51 S.

Escher, B.I.; Bramaz, N.; Mueller, J.F.; Quayle, P.; Rutishauser, S.; Vermeirssen, E.L.M. (2008): Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. Journal of Environmental Monitoring 10, 612-621

Escher, B.I.; Lawrence, M.; Macova, M.; Mueller, J.F.; Poussade, Y.; Robillot, C.; Roux, A.; Gernjak, W. (2011): Evaluation of Contaminant Removal of Reverse Osmosis and Advanced Oxidation in Full-Scale Operation by Combining Passive Sampling with Chemical Analysis and Bioanalytical Tools. Environmental Science & Technology 45, 5387-5394

Estoppey, N.; Omlin, J.; Schopfer, A.; Esseiva, P.; Vermeirssen, E.L.M.; Delemont, O.; De Alencastro, L.F. (2015): Low density polyethylene (LDPE) passive samplers for the investigation of polychlorinated biphenyl (PCB) point sources in rivers. Chemosphere 118, 268-276

EU (2015) Durchführungsbeschluss (EU) 2015/495 der Kommission vom 20. März 2015 2020 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates. 3. S. <u>https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2015/495/oj</u>

EU (2020) Beschlüsse: Durchführungsbeschluss (EU) 2020/1161 der Kommission vom 4. August 2020 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der

Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates. 4 S. <u>https://trade.ec.europa.eu/doclib/press/index.cfm?id=2225</u>

Fernández, D.; Vermeirssen, E.L.M.; Bandow, N.; Munoz, K.; Schäfer, R.B. (2014): Calibration and field application of passive sampling for episodic exposure to polar organic pesticides in streams. Environmental Pollution 194, 196-202

Friedman, C.L.; Cantwell, M.G.; Lohmann, R. (2012): Passive sampling provides evidence for Newark Bay as a source of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans to the New York/New Jersey, USA, atmosphere. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 253-261

Friedman, C.L. und Lohmann, R. (2014): Comparing sediment equilibrium partitioning and passive sampling techniques to estimate benthic biota PCDD/F concentrations in Newark Bay, New Jersey (U.S.A.). Environmental Pollution 186, 172-179

Gallé, T.; Bayerle, M.; Pittois, D.; Huck, V. (2020): Allocating biocide sources and flow paths to surface waters using passive samplers and flood wave chemographs. Water Research 173, 115533

Harman, C.; Farmen, E.; Tollefsen, K.E. (2010): Monitoring North Sea oil production discharges using passive sampling devices coupled with in vitro bioassay techniques. Journal of Environmental Monitoring 12, 1699-1708

Harman, C.; Allan, I.J.; Vermeirssen, E.L.M. (2012): Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2724-2738

Höher, N.; Kochleus, C.; Buchinger, S.; Reifferscheid, G. (Entwurf): Erfolgsmonitoring der Vermeidung und Verminderung des Eintrags von anthropogenen Mikroverunreinigungen in die Umwelt durch weitergehende Abwasserbehandlungsmaßnahmen mit Hilfe von biologischen Testverfahren (Wirktestscreening). Abschlussbericht, UBA Texte, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau

ISO (2004): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von tetra- bis octachlorierten Dioxinen und Furanen -Verfahren nach Isotopen-Verdünnung HRGC/HRMS. ISO 18073:2004-04 ISO, 61 S., <u>https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/naw/wdc-beuth:din21:73163653</u>

ISO (2007): Water quality — Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls — Method using gas chromatography/mass spectrometry. ISO 17858:2007. ISO, 54 S., <u>https://www.iso.org/standard/38503.html</u>

ISO (2011): Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 23: Anleitung zur Anwendung von Passivsammlern in Oberflächengewässern. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN, ISO 5667-23:2011, 35 S., <u>https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/textilnorm/veroeffentlichungen/wdc-</u> <u>beuth:din21:136914139</u>

ISO (2018): Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (Saccharomyces cerevisiae). ISO 19040-1. ISO, 58 S., https://www.iso.org/standard/64451.html

Jahnke, A.; Witt, G.; Schäfer, S.; Haase, N.; Escher, B.I. (2016a): Combining Passive Sampling with Toxicological Characterization of Complex Mixtures of Pollutants from the Aquatic Environment, In: Reifferscheid, G.; Buchinger, S.; (eds) In vitro Environmental Toxicology – Concepts, Application and Assessment. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 157, 225-261, Springer, Cham

Jahnke, A.; Mayer, P.; Schäfer, S.; Witt, G.; Haase, N.; Escher, B.I. (2016b): Strategies for Transferring Mixtures of Organic Contaminants from Aquatic Environments into Bioassays. Environmental Science & Technology 50, 5424-5431

Jalova, V.; Jarosova, B.; Blaha, L.; Giesy, J.P.; Ocelka, T.; Grabic, R.; Jurcikova, J.; Vrana, B.; Hilscherova, K. (2013): Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. Environment International 59, 372-383

Jarosova, B.; Blaha, L.; Vrana, B.; Randak, T.; Grabic, R.; Giesy, J.P.; Hilscherova, K. (2012): Changes in concentrations of hydrophilic organic contaminants and of endocrine-disrupting potential downstream of small communities located adjacent to headwaters. Environment International 45, 22-31

Kalbhenn, U. und Korte, E. (2015): Untersuchung des Gelbachs auf Dioxine und PCB. Untersuchung im Auftrag der Struktur- und Genehmigungsdirektion Nord, Riedstadt, 132 S.

Kochleus C.; Spira D.; Möhlenkamp C.; Becker B. (Entwurf): Realistische Abbildung von Schadstoffbelastungen in Gewässern unter Einsatz von Passivsammlern, UBA Texte, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau

Könemann, S.; Kase, R.; Simon, E. 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

Kraus, U.R.; Gunold, R.; Paschke, A.; Theobald, N. (2015): Prüfung und Validierung der Einsatzmöglichkeiten neuartiger Passivsammler für die Überwachung prioritärer Schadstoffe unter der WRRL, der MSRL und im Rahmen von HELCOM und OSPAR. UBA-Texte 25/2015, Umweltbundesamt, Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit, 129 S. <u>https://www.umweltbundesamt.de/en/publikationen/pruefung-validierung-der-einsatzmoeglichkeiten</u>

Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz (2019): Messdaten: Pegel Nettegut /Gewässer: Nette, Tagesmittelwerte des Abflusses, letzter 3-Jahres-Zeitraum bis heute, ungeprüfte Rohdaten, <u>http://213.139.159.46/prj-wwvauskunft/projects/messstellen/wasserstand/register1.jsp?intern=true&msn=2714050000&dfue=1</u> (16.01.2019)

Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz (2021): Messdaten: Pegel Weinähr/Gewässer: Aubach, Gelbach, <u>http://213.139.159.46/prj-</u>

wwvauskunft/projects/messstellen/wasserstand/register1.jsp?intern=false&msn=2589030600&dfue=1
(19.01.2021)

LAWA (1998): AQS-Merkblatt zu den Rahmenempfehlungen der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen: Bestimmung der nicht gifitgen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38 412 - L33), P-9/3, 9 S., <u>https://www.lawa.de/documents/p-09-</u> <u>3 gruenalgentest weissdruck 1998-01 2 1568279132.pdf</u>

Liebenstein, A.; Manz, W.; Pesch, R.; Schmidt, G.; Schröder, W.; Wahrendorf, D.-S. (2009): Miniaturisierung des Wachstumshemmtestes mit der Grünalge Desmodesmus subspicatus nach DIN 38412 Teil 33. Environmental Science Europe 21, 504-515

Liscio, C.; Abdul-Sada, A.; Al-Salhi, R.; Ramsey, M.H.; Hill, E.M. (2014): Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. Water Research 57, 258-269

Luft, A.; Wagner, M.; Ternes, T.A. (2014): Transformation of Biocides Irgarol and Terbutryn in the Biological Wastewater Treatment. Environmental Science & Technology 48, 244-254

Mayer, P.; Parkerton, T.F.; Adams, R.G.; Cargill, J.G.; Gan, J.; Gouin, T.; Gschwend, P.M.; Hawthorne, S.B.; Helm, P.; Witt, G.; You, J.; Escher, B.I. (2014): Passive sampling methods for contaminated sediments: Scientific rationale supporting use of freely dissolved concentrations. Integrated Environmental Assessment and Management 10, 197-209

McDonnell, D.P.; Nawaz, Z.; Densmore, C.; Weigel, N.L.; Pham, A.; Clark, H.; O'Malley, B.W.O. (1991): High level expression of biologically active estrogen receptor in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 39, 291-297

Miller, C.A. (1999): A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. Toxicology and Applied Pharmacology 160, 297-303,

Muller, R.; Schreiber, U.; Escher, B.I.; Quayle, P.; Nash, S.M.B.; Mueller, J.F. (2008): Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. Science of the Total Environment 401, 51-59

Otte, J.C.; Keiter, S.; Fassbender, C.; Higley, E.B.; Rocha, P.S.; Brinkmann, M.; Wahrendorf, D.S.; Manz, W.; Wetzel, M.A.; Braunbeck, T.; Giesy, J.P.; Hecker, M.; Hollert, H. (2013): Contribution of Priority PAHs and POPs to Ah Receptor-Mediated Activities in Sediment Samples from the River Elbe Estuary, Germany. PLoS One 8 (10)

Rahm, H.; Obschernicat, K.; Dittmar, M.; Rosenbaum-Mertens, J.; Selent, K. (2018): Belastungen von Oberflächengewässern und von aktiven Grubenwassereinleitungen mit bergbaubürtigen PCB (und PCB-Ersatzstoffen). Ergebnisse des LANUV-Sondermessprogramms. 1. Folgebericht, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), Recklinghausen, 110 S., <u>https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuv/wasser/pdf/2018-12-05</u> Bericht LANUV PCB Grubenwasser.pdf

Rahm, H.; Plantikow, K.; Spira, D.; Reifferscheid, G.; Schäfer, S. (2019): Neues Leben ohne Grubenwasser? Auswirkungen der Beendigung des Steinkohlebergbaus auf die Gewässerqualität. Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie 3/2019, 67-71,

https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk und Strukturen/Fachgruppen/Umweltchemie OEkotox ikologie/mblatt/2019/b1h319.pdf

Rastall, A.C.; Getting, D.; Goddard, J.; Roberts, D.R.; Erdinger, L. (2006): A biomimetic approach to the detection and identification of estrogen receptor agonists in surface waters using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioassay-directed chemical analysis. Environmental Science and Pollution Research 13, 256-267

Riegraf, C.; Reifferscheid, G.; Becker, B.; Belkin, S.; Hollert, H.; Feiler, U.; Buchinger, S. (2019a): Detection and Quantification of Photosystem II Inhibitors Using the Freshwater Alga Desmodesmus subspicatus in Combination with High-Performance Thin-Layer Chromatography. Environmental Science & Technology 53, 13458-13467

Riegraf, C.; Reifferscheid, G.; Belkin, S.; Moscovici, L.; Shakibai, D.; Hollert, H.; Buchinger, S. (2019b): Combination of yeast-based in vitro screens with high-performance thin-layer chromatography as a novel tool for the detection of hormonal and dioxin-like compounds. Analytica Chimica Acta 1081, 218-230

Routledge, E.J. und Sumpter, J.P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry 15, 241-248

Rusina, T.P.; Smedes, F.; Koblizkova, M.; Klanova, J. (2010): Calibration of Silicone Rubber Passive Samplers: Experimental and Modeled Relations between Sampling Rate and Compound Properties. Environmental Science & Technology 44, 362-367

Schönborn, A. und Grimmer, A.A. (2013): Coupling Sample Preparation with Effect-Directed Analysis of Estrogenic Activity - Proposal for a New Rapid Screening Concept for Water Samples. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc 26, 402-408

Schönborn, A.; Schmid, P.; Bram, S.; Reifferscheid, G.; Ohlig, M.; Buchinger, S. (2017): Unprecedented sensitivity of the planar yeast estrogen screen by using a spray-on technology. Journal of Chromatography A 1530, 185-191

Schreiber, U.; Quayle, P.; Schmidt, S.; Escher, B.I.; Mueller, J.F. (2007): Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. Biosensors & Bioelectronics 22, 2554-2563

Schreiber, U. (2014): Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee (Editors), Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration. 19, 279-319, Springer, Dordrecht

Smedes, F.; Geertsma, R.W.; van der Zande, T.; Booij, K. (2009): Polymer-Water Partition Coefficients of Hydrophobic Compounds for Passive Sampling: Application of Cosolvent Models for Validation. Environmental Science & Technology 43, 7047-7054

Smedes, F.; Bakker, D.; de Weert, J. (2002) The use of passive sampling in WFD monitoring. The possibilities of silicon rubber as a passive sampler. Deltares. Rijkswaterstaat Centre for Water Management, project 1202337-004. 59 S. <u>https://puc.overheid.nl/rijkswaterstaat/doc/PUC_145941_31/</u>

Smedes, F. und Booij, K. (2012): Guidelines for passive sampling of hydrophobic contaminants in water using silicone rubber samplers. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 52, Copenhagen, Denmark, 20 S.

Spira, D.; Reifferscheid, G.; Buchinger, S. (2013): Combination of High-Performance Thin-Layer Chromatography with a Specific Bioassay - A Tool for Effect-Directed Analysis. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc 26, 395-401

Statistisches Landesamt Rheinland-Pfalz (2016): Bodennutzung landwirtschaftlicher Betriebe 2016 nach ausgewählten Hauptnutzungs- und Kulturarten, Teil 1 – 3,

https://www.statistik.rlp.de/de/wirtschaftsbereiche/landwirtschaft/basisdaten-regional/ (09.12.2020)

Tapie, N.; Devier, M.H.; Soulier, C.; Creusot, N.; Le Menach, K.; Ait-Aissa, S.; Vrana, B.; Budzinski, H. (2011): Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water. Water Science and Technology 63, 2418-2426

Taylor, A.C.; Fones, G.R.; Vrana, B.; Mills, G.A. (2019): Applications for Passive Sampling of Hydrophobic Organic Contaminants in Water - A Review. Critical Reviews in Analytical Chemistry

Theisen, C. (2018): Kombiniertes chemisches und ökotoxikologisches Gewässermonitoring – Kopplung von Passivsammlern und limnischem Algentest, Master thesis, Universität Koblenz-Landau, 93 S.

Vermeirssen, E.L.M.; Asmin, J.; Escher, B.I.; Kwon, J.H.; Steimen, I.; Hollender, J. (2008a): The role of hydrodynamics, matrix and sampling duration in passive sampling of polar compounds with Empore (TM) SDB-RPS disks. Journal of Environmental Monitoring 10, 119-128

Vermeirssen, E.L.M.; Eggen, R.I.L.; Escher, B.I.; Suter, M.J.F. (2008b): Estrogens in Swiss rivers and effluents - Sampling matters. Chimia 62, 389-394

Vermeirssen, E.L.M.; Bramaz, N.; Hollender, J.; Singer, H.; Escher, B.I. (2009): Passive sampling combined with ecotoxicological and chemical analysis of pharmaceuticals and biocides - evaluation of three Chemcatcher (TM) configurations. Water Research 43, 903-914

Vermeirssen, E.L.M., Hollender, J., Bramaz, N., van der Voet, J., Escher, B.I. (2010): Linking Toxicity in Algal and Bacterial Assays with Chemical Analysis in Passive Samplers Deployed in 21 Treated Sewage Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 2575-2582

Vermeirssen, E.L.M.; Dietschweiler, C.; Escher, B.I.; van der Voet, J.; Hollender, J. (2012): Transfer Kinetics of Polar Organic Compounds over Polyethersulfone Membranes in the Passive Samplers Pocis and Chemcatcher. Environmental Science & Technology 46, 6759-6766 Vethaak, A.D.; Davies, I.M.; Thain, J.E.; Gubbins, M.J.; Martinez-Gomez, C.; Robinson, C.D.; Moffat, C.F.; Burgeot, T.; Maes, T.; Wosniok, W.; Giltrap, M.; Lang, T.; Hylland, K. (2017): Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. Marine Environmental Research 124, 11-20

Witt, G.; Bachtin, J.; Schäfer, S. (2020): Equilibrium sampling of hydrophobic organic contaminants in sediments. In: Seiler TB, Brinkmann M (Editors), Toolbox for assessment of in situ bioavailability and toxicity of organic chemicals in aquatic systems. Methods in Pharmacology & Toxicology. Springer, New York, NY, 26 S.

Wittmer, I.K.; Scheidegger, R.; Bader, H.P.; Singer, H.; Stamm, C. (2011): Loss rates of urban biocides can exceed those of agricultural pesticides. Science of the Total Environment 409, 920-932

Zennegg, M.; Vermeirssen, E.; Schmid, P. (2016): Messung von PCB und Dioxinen in Fliessgewässern. Evaluation der Praxistauglichkeit von Sedimentanalysen und Messungen mittels Passivsammlern in der Wasserphase zur Lokalisation von Emissionsquellen. Umwelt-Wissen Nr. 1639. Bundesamt für Wasserbau. Bern. Schweiz. 54 S., https://www.bafu.admin.ch/bafu/de/home/themen/chemikalien/publikationen-studien/publikationen/messung-pcb-dioxinen-fliessgewaessern.html

Zounkova R.; Jalova V.; Janisova M.; Ocelka T.; Jurcikova J.; Halirova J.; Giesy J.P.; Hilscherova K. (2014): In situ effects of urban river pollution on the mudsnail Potamopyrgus antipodarum as part of an integrated assessment. Aquatic Toxicology 150, 83-92

10 Anlagen





Dosis-Wirkungskurven methanolischer Silikonstreifenextrakte im limnischen Grünalgentest mit *Desmodesmus subspicatus*. Dargestellt ist die Hemmung der Chlorophyll-Fluoreszenz (%) durch Silikonstreifenextrakte, die in der Kampagne 3 am Standort 5 exponiert worden waren, in Abhängigkeit von der Masse an Sammlerpolymer im Testansatz. Es wurden verschiedene Passivsammlerreplikate desselben Standortes und derselben Probenahmekampagne entweder in einer 1:2 (gefüllte Symbole) bzw. einer 1:4 Verdünnungsreihe (offene Symbole) getestet. Es sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der technischen Replikate (n = 3) dargestellt. Quelle: eigene Darstellung, BfG.

PSII-Inhibitor	Silikonstreifen: Standort 5	Silikonstreifen: Standort 6	Chemcatcher [®] : Standort 5	Chemcatcher [®] : Standort 6
Atrazin	4,110	4,345	14,123	10,122
Bentazon	<bg< td=""><td><bg< td=""><td>0,327</td><td>0,317</td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td>0,327</td><td>0,317</td></bg<>	0,327	0,317
Chloroxuron	<bg< td=""><td><bg< td=""><td>0,138</td><td>0,058</td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td>0,138</td><td>0,058</td></bg<>	0,138	0,058
Cybutryn	1,090	3,610	0,575	0,927
Cybutryn-Metabolit 1	<bg< td=""><td><bg< td=""><td>1,743</td><td>1,525</td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td>1,743</td><td>1,525</td></bg<>	1,743	1,525
Diuron	2,753	2,300	49,687	29,437
Fluomethuron	0,937	0,700	<bg< td=""><td><bg< td=""></bg<></td></bg<>	<bg< td=""></bg<>
Isoproturon	2,06	1,985	27,217	16,125
Methabenzthiazuron	0,283	0,260	1,290	0,798
Monolinuron	<bg< td=""><td><bg< td=""><td>4,315</td><td>3,847</td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td>4,315</td><td>3,847</td></bg<>	4,315	3,847
Monuron	<bg< td=""><td><bg< td=""><td>1,032</td><td>0,798</td></bg<></td></bg<>	<bg< td=""><td>1,032</td><td>0,798</td></bg<>	1,032	0,798
Prometon	1,013	1,890	0,268	0,203
Prometryn	5,007	4,145	1,430	0,908
Propazin	0,693	0,770	0,823	0,858

Anlage 2: Konzentration von PSII-Inhibitoren in Passivsammlern

PSII-Inhibitor	Silikonstreifen: Standort 5	Silikonstreifen: Standort 6	Chemcatcher®: Standort 5	Chemcatcher [®] : Standort 6
Simazin	2,733	2,980	95,495	55,497
Terbutryn	60,210	58,510	22,272	13,287
Terbutylazin	4,763	3,490	43,197	36,763
Thiabendazol	4,793	3,540	15,410	9,863
Summe	90	89	279	181

Angegeben sind mittlere Konzentrationen (n = 3) der PSII-Inhibitoren in ng mL⁻¹ Extrakt der Passivsammler, die in Kampagne 5 zwei Wochen und in Kampagne 6 vier Wochen an den Standorten 5 und 6 exponiert worden waren. Von den Passivsammlern wurden jeweils 4 mL Extrakt hergestellt. BG = Bestimmungsgrenze

Standort	1 Krufter Bach Quelle	2 Nette Quelle	3 Krufter Bach Mündung	4 Nette Plaidt fluss- aufwärts	5 Nette Plaidt fluss- abwärts	6 Nette Weißen- thurm
рН	6,6	7,4	8,5	8,1	8,1	7,9
Temperatur in °C	11,1	14,1	14,6	15,0	14,1	13,8
Leitfähigkeit in µS/cm	1026	148	1063	940	939	967
Sauerstoff in mg/l	6,9	9,9	10,8	9,9	10,0	10,2
Fließgeschwindigkeit in m/s	≤ 0,26	≤ 0,26	0,53	0,37	0,64	0,7

Anlage 3: Abiotische Parameter im Flusseinzugsgebiet der Nette während der Kampagne 3

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte, die während des Ausbringens und Einholens der Proben gemessen wurden. Bei den Fließgeschwindigkeiten lag die Bestimmungsgrenze des Messgerätes bei 0,26 m/s.

Anlage 4: Hemmung des Photosystems II nach chromatographischer Auftrennung eines Standards

Standard	Menge (ng)	Inhibition (%)
Diuron	1,5	84,3
Simazin	5	66,0
Atrazin	10	68,1
Terbutryn	10	58,4

Die Tabelle zeigt die berechnete prozentuale Inhibition der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II (YII) durch die Standards Diuron, Simanzin, Atrazin und Terbutryn im planaren Biotest (siehe Abbildung 3, obere Dünnschichtplatte) bei der Untersuchung verschiedener Standorte im Flusseinzugsgebiet der Nette. Die Ermittlung der prozentualen Inhibition der YII wird in Kapitel 8.5.4.3 näher beschrieben.





In den Kampagnen 1 bis 5 gemessene Tagesmittelwerte des Abflusses in m³/s (Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz 2019). Quelle: eigene Darstellung, BfG.

Matrix	Probe	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Mittelwert Test 1-4
Chemcatcher®	Zu_1	n.v.	4,7 ± 0,03	4,0 ± 0,06	3,3 ± 0,05	4,0 ± 0,67
Chemcatcher®	Zu_2	n.v.	5,0 + 0,05	3,6 ± 0,04	3,9 ± 0,05	4,2 ± 0,73
Chemcatcher®	Ab_1	1,2 ± 0,04	2,6 ± 0,04	1,0 ± 0,04	1,7 ± 0,02	1,6 ± 0,73
Chemcatcher®	Ab_2	1,2 ± 0,39	1,3 ± 0,07	1,3 ± 0,12	1,4 ± 0,05	1,3 ± 0,08
Chemcatcher®	Zu_3 2fach	n.v.	8,5 ± 0,07	9,3 ± 0,12	7,0 ± 0,07	8,3 ± 1,16
SPE	Zu	4,4 ± 0,04	4,6 ± 0,05	3,9 ± 0,01	5,7 ± 0,03	4,6 ± 0,76
SPE	Ab	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,13	1,3 ± 0,05	0,8 ± 0,68
Silikonstreifen	Zu_5	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,04	< LOQ	0,6
Silikonstreifen	EA_Zu_4	0,51 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,01	< LOQ	0,5 ± 0,08

Anlage 6: Östrogene Aktivität (EEQ) von Proben aus einem Kläranlagenzu- und -ablauf

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung in ng mL⁻¹ Extrakt, die im YES bestimmt wurden. Es wurden vier unabhängige Bioteste durchgeführt und Mittelwerte der verschiedenen Tests ermittelt. n.v. = nicht valide. Zu = Zulauf, Ab = Ablauf, EA = Ethylacetatfraktion; 2fach = 2fach konzentriert; LOQ < 0,5 ng mL⁻¹ Extrakt

Probe	Volu- men (μL)	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (ng mL ⁻¹ Extrakt)	Summe EEQ (ng mL ⁻¹ Extrakt)
Zu-1	5	1	0,19	Estriol (E3)	0,0213	10,12	4,43	0,89	>2,0
		2	0,23	k.A.	0,0166	7,88	2,84	0,57	
		3	0,32	k.A.	0,0443*	21,03	n.b.	n.b.	
		4	0,44	Estradiol (E2)	0,0686*	32,61	n.b.	n.b.	
		5	0,58	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,0100	4,76	1,44	0,29	
		6	0,69	Estron (E1)	0,0485*	23,05	n.b.	n.b.	
		7	0,77	k.A.	0,0012	0,56	1,07	0,21	
Zu-2	5	1	0,19	Estriol (E3)	0,0232	10,91	5,21	1,04	>2,2
		2	0,2	k.A.	0,0187	8,81	3,49	0,70	
		3	0,3	k.A.	0,0435*	20,49	n.b.	n.b.	
		4	0,42	Estradiol (E2)	0,063*	29,66	n.b.	n.b.	
		5	0,55	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,01	4,71	1,44	0,29	
		6	0,67	Estron (E1)	0,053*	24,96	n.b.	n.b.	
		7	0,76	k.A.	0,001	0,47	1,08	0,22	
Ab-1	10	1	0,19	Estriol (E3)	0,0015	1,38	1,05	0,11	>1,2
		2	0,23	k.A.	0,0139	12,79	2,15	0,22	
		3	0,29	k.A.	0,0471*	43,4	n.b.	n.b.	
		4	0,42	Estradiol (E2)	0,014	12,94	2,17	0,22	
		5	0,55	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,0105	9,7	1,51	0,15	
		6	0,66	Estron (E1)	0,021	19,39	4,32	0,43	
		7	0,78	k.A.	0,0004	0,4	1,12	0,11	

Anlage 7: Kläranlage: Östrogene Wirkungen auf Dünnschichtplatte

Probe	Volu- men (μL)	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (ng mL ⁻¹ Extrakt)	Summe EEQ (ng mL ⁻¹ Extrakt)
Ab-2	10	1	0,19	Estriol (E3)	0,0018	1,68	1,04	0,10	>1,1
		2	0,22	k.A.	0,0141	13,19	2,20	0,22	
		3	0,29	k.A.	0,049*	45,75	n.b.	n.b.	
		4	0,42	Estradiol (E2)	0,013	12,16	1,96	0,20	
		5	0,56	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,0101	9,39	1,45	0,15	
		6	0,66	Estron (E1)	0,0186	17,34	3,46	0,35	
		7	0,78	k.A.	0,0005	0,5	1,11	0,11	
SPE_Zu	5	1	0,18	Estriol (E3)	0,0188	10,7	3,53	0,71	>3,7
200x		2	0,19	k.A.	0,0166	9,48	2,84	0,57	
		3	0,3	k.A.	0,0336	19,14	10,91	2,18	
		4	0,411	Estradiol (E2)	0,0627*	35,76	n.b.	n.b.	
		5	0,555	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,0032	1,8	1,00	0,20	
		6	0,661	Estron (E1)	0,0405*	23,12	n.b.	n.b.	
		7	n.d.	k.A.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
SPE_Ab	10	1	0,19	Estriol (E3)	0,0014	5,31	1,06	0,11	0,88
500x		2	0,21	k.A.	0,0028	10,97	1,01	0,10	
		3	0,28	k.A.	0,0188	73,29	3,53	0,35	
		4	0,42	Estradiol (E2)	0,0006	2,42	1,10	0,11	
		5	0,56	Ethinyl- estradiol (EE2)	0,0009	3,47	1,08	0,11	
		6	0,66	Estron (E1)	0,0012	4,55	1,07	0,11	
		7	n.d.	k.A.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	

Angegeben sind 1) die Probenbezeichnung, 2) das aufgetragene Extraktvolumen 3) die Nummer des Peaks auf der Dünnschichtplatte, 4) Der Retentionsfaktor (R_{F Max}) bei maximaler Fluoreszenzintensität des entsprechenden Peaks, 5) die Substanz der Mischung östrogener Referenzverbindung, die ein vergleichbares

Laufverhalten aufweist, 6/7) die Fläche (AU) und der prozentuale Anteil der Fläche (%) des Peaks, 8) die Menge an E2 (pg), die eine entsprechende Fluoreszenzintensität auf der Dünnschichtplatte bewirkt und die ermittelten Estradiol-Equivalenz-Konzentrationen (EEQ, ng L⁻¹). Mit * markierte Werte lagen über der Kalibrierung für das E2. Für diese konnten die Menge an E2 und die EEQ-Werte nicht ermittelt werden. Die Menge an E2 (pg) wurden anhand folgender Kalibrierung ermittelt: E2 (pg) = 11075 * Fläche² - 81,701 * Fläche + 1,1478 (R² = 1, Kalibrierbereich \leq 0,032 AU): 8.) die Summe der EEQ für die Peaks 1 bis 7. n.d. = nicht detektiert, k.A. = keine Angabe, n.b. = nicht bestimmt

Standort Nr.	Standort Name	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (pg mL ⁻¹ Extrakt)
1	Krufter Bach	1	n.d.	E3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Quelle	2	n.d.	k.A.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		3	n.d.	E2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		4	n.d.	EE2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		5	n.d.	E1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2	Nette Quelle	1	0,184	E3	0,00057	30,49	0,59	23,59
		2	n.d.	k.A.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		3	0,421	E2	0,0003	15,84	0,48	19,26
		4	n.d.	EE2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		5	0,687	E1	0,00101	53,67	0,77	30,91
3	Nette Plaidt flussaufwärts	1	0,215	E3	0,00042	0,59	0,53	21,17
		2	0,294	k.A.	0,00198	2,74	1,20	48,09
		3	0,424	E2	0,02303*	31,93	n.b.	n.b.
		4	0,595	EE2	0,00614	8,51	3,46	138,31
		5	0,687	E1	0,04057*	56,24	n.b.	n.b.
4	Krufter Bach Mündung	1	0,22	E3	0,00068	1,49	0,63	25,39
	Wandung	2	0,289	k.A.	0,00568	12,45	3,18	127,01
		3	0,423	E2	0,0171*	37,5	n.b.	n.b.

Anlage 8: Oberflächengewässer/verschiedene Standorte: Östrogene Wirkung auf Dünnschichtplatte

Standort Nr.	Standort Name	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (pg mL ⁻¹ Extrakt)
		4	0,568	EE2	0,00059	1,3	0,60	23,92
		5	0,685	E1	0,02155*	47,26	n.b.	n.b.
5	Nette Plaidt	1	0,212	E3	0,00019	0,41	0,44	17,52
	nussabwarts	2	0,29	k.A.	0,00152	3,32	0,99	39,76
		3	0,423	E2	0,01863*	40,64	n.b.	n.b.
		4	0,595	EE2	0,00244	5,33	1,42	56,74
		5	0,685	E1	0,02306*	50,3	n.b.	n.b.
6	Nette	1	0,211	E3	0,00084	2,49	0,70	28,05
	weisentituttit	2	0,283	k.A.	0,00274	8,13	1,56	62,57
		3	0,423	E2	0,01321	39,24	8,83	353,19
		4	0,595	EE2	0,00083	2,47	0,70	27,88
		5	0,687	E1	0,01605*	47,66	n.b.	n.b.

Angegeben sind 1) die Nummer des Probenahmestandortes, 2) der Name des Probenahmestandortes, 3) die Nummer des Peaks auf der Dünnschichtplatte, 4) Der Retentionsfaktor (R_{FMax}) bei maximaler Fluoreszenzintensität des entsprechenden Peaks, 5) die Substanz der Mischung östrogener Referenzverbindungen, die ein vergleichbares Laufverhalten aufweist, 6/7) die Fläche (AU) und der prozentuale Anteil der Fläche (%) des Peaks, 8) die Menge an E2 (pg), die eine entsprechende Fluoreszenzintensität auf der Dünnschichtplatte bewirkt und 9) die ermittelten Estradiol-Equivalenz-Konzentrationen (EEQ, pg mL⁻¹ Extrakt). Mit * markierte Werte lagen über der Kalibrierung für das E2. Für diese konnten die Menge an E2 und die EEQ-Werte nicht ermittelt werden. Die Menge an E2 (pg) wurden anhand folgender Kalibrierung ermittelt: Menge E2 = 19381 * Fläche² + 384,83 * Fläche + 0,3642; (R² = 0,999, Kalibrierbereich ≤ 0,015 AU). n.d. = nicht detektiert. k.A. = keine Angabe, n.b. = nicht bestimmt

	Kampagne	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (pg mL ⁻¹ Extrakt)					
	K1	1	0,201	E3	0,002	2,3	0,67	26,8					
		2	0,3	k.A.	0,008	9,5	1,69	67,6					
		3	0,437	E2	0,036*	44,2	n.b.	n.b.					
		4	0,595	EE2	0,004	5,1	1,02	40,9					
		5	0,693	E1	0,032	39,0	10,03	401,1					
	K2	1	0,199	E3	0,002	3,6	0,76	30,2					

Anlage 9: Oberflächengewässer/verschiedene Probenahmekampagnen: Östrogene Wirkung auf Dünnschichtplatte

Kampagne	Peak	R _{F Max}	Substanz	Fläche (AU)	Fläche (%)	Menge E2 (pg)	EEQ (pg mL ⁻¹ Extrakt)
	2	0,29	k.A.	0,005	7,6	1,19	47,5
	3	0,426	E2	0,029	42,4	8,54	341,8
	4	0,583	EE2	0,002	2,7	0,66	26,5
	5	0,683	E1	0,029	43,7	8,93	357,2
К3	1	0,209	E3	0,002	2,4	0,68	27,1
	2	0,291	k.A.	0,004	5,4	1,05	41,9
	3	0,426	E2	0,029	36,7	8,87	354,9
	4	0,579	EE2	0,004	4,8	0,96	38,6
	5	0,678	E1	0,041*	50,9	n.b.	n.b.
К4	1	0,202	E3	0,005	5,2	1,19	47,7
	2	0,289	k.A.	0,011	11,5	2,54	101,7
	3	0,424	E2	0,031	31,5	9,78	391,3
	4	0,577	EE2	0,004	4,1	1,00	40,0
	5	0,678	E1	0,047*	47,7	n.b.	n.b.
К5	1	0,2	E3	0,004	4,3	1,00	40,0
	2	0,285	k.A.	0,010	10,5	2,13	85,2
	3	0,424	E2	0,027	29,5	7,94	317,6
	4	0,578	EE2	0,003	3,5	0,87	34,9
	5	0,678	E1	0,048*	52,2	n.b.	n.b.

Angegeben sind 1) die Nummer der Probenahmekampagne in 2018 (K1 bis K5), 2) Die Nummer des Peaks auf der Dünnschichtplatte, 3) Der Retentionsfaktor ($R_{F Max}$) bei maximaler Fluoreszenzintensität des entsprechenden Peaks, 4) die Substanz der Mischung östrogener Referenzverbindungen, die ein vergleichbares Laufverhalten aufweist, 5/6) die Fläche (AU) und der prozentuale Anteil der Fläche (%) des Peaks, 7) die Menge an E2 (pg), die eine entsprechende Fluoreszenzintensität auf der Dünnschichtplatte bewirkt und 8) die ermittelten Estradiol-Equivalenz-Konzentrationen (EEQ, pg mL⁻¹ Extrakt). Mit * markierte Werte lagen über der Kalibrierung für das E2. Für diese konnten die Menge an E2 und die EEQ-Werte nicht ermittelt werden. Die Menge an E2 (pg) wurden anhand folgender Kalibrierung ermittelt: Menge E2 = $5801 * Fläche^2 + 118,18 * Fläche + 0,4331;$ ($R^2 = 1,000$, Kalibrierbereich $\leq 0,032$ AU). n.d. = nicht detektiert. k.A. = keine Angabe, n.b. = nicht bestimmt

Anlage 10: Verwendete Referenzverbindungen

PRC	Abkürzung	CAS-Nr.	M (g mol⁻¹)	log K _{ow} ª	log K _{sw} ^b
2-Chlorbiphenyl	PCB1	2051-60-7	188,7	4,40	4,22
3-Chlorbiphenyl	PCB2	2051-61-8	188,7	4,40	4,41
4-Chlorbiphenyl	PCB3	2051-62-9	188,7	4,40	4,36
2,6-Dichlorobiphenyl	PCB10	33146-45-1	223,1	5,05	4,55
3,5-Dichlorbiphenyl	PCB14	34883-41-5	223,1	5,05	5,14
2,3,4-Trichlorbiphenyl	PCB21	55702-46-0	257,5	5,69	5,43
2,4,6-Trichlorobiphenyl	PCB30	35693-92-6	257,5	5,69	5,24
2,2',4,6-Tetrachlorbiphenyl	PCB50	62796-65-0	292,0	6,34	5,70
2,3,3',4-Tetrachlorbiphenyl	PCB55	74338-24-2	292,0	6,34	6,00
3,3',4,5-Tetrachlorbiphenyl	PCB78	70362-49-1	292,0	6,34	6,05
2,2',4,6,6'-Pentachlorbiphenyl	PCB104	56558-16-8	326,4	6,98	6,17
2,2',3,4,6,6'-Hexachlorbiphenyl	PCB145	74472-40-5	360,9	7,62	6,65
2,2',3,4,4',5,6,6'-Octachlorbiphenyl	PCB204	74472-52-9	429,8	8,91	7,59

Referenzverbindungen (performance reference compounds; PRC) wurden für das Monitoring in der Kläranlage und in mit Dioxinen und dl-PBC belasteten Fließgewässern auf die Silikonstreifen dotiert, um die Sammelraten während der Exposition bestimmen zu können. Vor der Exposition wurden die PRC wie in Becker et al. (2020) beschrieben auf die Silikonstreifen dotiert. In der Tabelle ist für jede Referenzverbindung die Abkürzung, die CAS-Nr., die molare Masse (M) in g mol⁻¹, der log K_{ow} und der logarithmierte Sammler-Wasser Verteilungskoeffizient (log K_{sw}) angegeben. ^a KowwinTM v. 1.68 estimate aus: EpiSuite, ^b aus Smedes et al. (2009)

Anlage 11: Verwendete interne Standards für die Analyse der Photosynthese II-Inhibitoren²⁷

Mode	Interne Standards
ESI positiv	Atrazin-d5, Benzophenon-3-d5, Carbendazim-d4, Chlorpyrifos-d10, Cypermethrin-d5, DEET-d7, Dichlorfos-d6, Diuron-d6, Flufenacet-d4, Imazalil-d5, Imidacloprid-d4, Irgarol-d9, Isoproturon-d6, Ketoconazol-d8, Monolinuron-d6, Monuron-d6, Nicosulfuron-d6, Pirimiphos-methyl-d6, Prometryn-d6 Propazin-d6, Propiconazol-d3, Tebuconazol-d6, Terbuthylazin-d5, Terbutryn-d5, Thiabendazol-d6, UV320-d4, UV328-d4
ESI negativ	¹³ C ₁₂ -Triclosan, Bentazon-d7

Anlage 12: Verwendete interne Standards für die Analyse der Östrogene

Interne Standards
Estron(E1)-d4
Estradiol(E2)-d4
Ethinyl Estradiol(EE2)-d4
BPA-d14
ie Standards wurden im ESI negativ Mod

Anlage 13: Verwendete interne Standards für die GC-MS/MS

interner Standard	CAS-Nr.
РАК	
Acenaphthen-d10	15067-26-2
Acenaphthylen-d8	93951-97-4
Anthracen-d10	1719-06-8

²⁷ Und weiterer in dieser Studie nicht dargestellten Pflanzenschutzmittelwirkstoffe und Biozide.

interner Standard	CAS-Nr.		
Benzo[a]anthracen-d12	1718-53-2		
Benzo[a]pyren-d12	63466-71-7		
Benzo[b]fluoranthen-d12	93951-98-5		
Benzo[g,h,i]perylen-d12	93951-66-7		
Benzo[k]fluoranthen-d12	93952-01-3		
Chrysen-d12	1719-03-5		
Dibenzo[a,h]anthracen-d14	13250-98-1		
Fluoranthen-d10	93951-69-0		
Fluoren-d10	81103-79-9		
Indeno(1,2,3-c,d)pyren-d12	203578-33-0		
Naphtalin-d8	1146-65-2		
Phenanthren-d10	1517-22-2		
Pyrene-d10	1718-52-1		
РСВ			
13C-PCB 28	208263-76-7		
13С-РСВ 52	208263-80-3		
13C-PCB 101	104130-39-4		
13C-PCB 153	k.A.		
DDT und Metabolite			

p,p'-DDT-d8	93952-18-2

interner Standard	CAS-Nr.
p,p'-DDE-d8	93952-19-3
sonstige	
13C6-HCB	93952-14-8
13C4-HCBD	93951-70-3

Für die GC-MS/MS-Analytik verwendete interne Standards mit der jeweiligen CAS-Nr. k.A. – keine Angabe.

Anlage 14: Konzentrationen von PCDD/F und dl-PCB in den verschiedenen Matrizes

Analyt	Silikonstreifen (ng L ⁻¹ Extrakt)			Chemcatcher [®] (ng L ⁻¹ Extrakt)		Oberflächenwasser (ng L ⁻¹ Wasser)		
	Ahrbach	Gelbach	Feldkontrolle	Τo	Ahrbach	Gelbach	Ahrbach	Gelbach
2,3,7,8-TCDD	0,83 ± 0,40	0,67 ± 0,25	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	0,002	< 0,001
1,2,3,7,8-PeCDD	0,67 ± 0,25	0,97 ± 0,46	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	0,002	< 0,001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	< 0,40	0,657 ± 0,15	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	0,001	0,001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,50 ± 0,17	0,73 ± 0,29	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	0,002	0,002
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,80 ± 0,36	1,2 ± 0,21	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	0,004	0,006
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5,6 ± 0,38	4,8 ± 1,1	< 1,0	< 1,0	< 2,0	< 2,0	0,054	0,046
OCDD	70 ± 3,9	31,5 ± 8,9	< 0,20	< 0,20	< 4,0	< 4,0	1,81	0,823
Summe Dioxine	< 79	40 ± 12	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,9
2,3,7,8-TCDF	0,67 ± 0,25	2,0 ± 0,35	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
1,2,3,7,8-PeCDF	< 0,40	< 0,40	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001

Analyt	Silikonstreifen (ng L ⁻¹ Extrakt)			Chemcatcher [®] (ng L ⁻¹ Extrakt)		Oberflächenwasser (ng L ⁻¹ Wasser)		
	Ahrbach	Gelbach	Feldkontrolle	To	Ahrbach	Gelbach	Ahrbach	Gelbach
2,3,4,7,8-PeCDF	< 0,40	0,60 ± 0,17	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	< 0,40	< 0,40	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	< 0,40	< 0,40	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	< 0,40	< 0,40	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	< 0,40	< 0,40	< 0,20	< 0,20	< 0,40	< 0,40	< 0,001	< 0,001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	< 0,40	< 1,2	< 0,60	< 0,60	< 1,2	< 1,2	< 0,002	< 0,002
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	< 0,40	< 1,2	< 0,60	< 0,60	< 1,2	< 1,2	< 0,001	< 0,003
OCDF	< 4,0	< 4,0	< 2,0	< 2,0	< 4,0	< 4,0	< 0,004	< 0,004
Summe Furane	< 9,5	< 11	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
PCB 77	43 ± 4,0	72 ± 9,0	< 8,0	< 5,0	< 10	< 10	0,056	0,055
PCB 81	< 3,0	< 4,0	< 4,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 0,005	< 0,005
PCB 126	8,0 ± 0,0	11,0 ± 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 0,005	< 0,005
PCB 169	< 3,0	< 3,0	< 2,0	< 2,0	< 3,0	< 3,0	< 0,005	< 0,005
PCB 105	133 ± 12	150 ± 10	< 40	< 30	< 50	< 50	< 0,30	< 0,30
PCB 114	< 20	< 20	< 10	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10
PCB 118	527 ± 72	590 ± 30	< 100	< 60	< 100	< 100	< 0,60	< 0,60
PCB 123	< 23	< 20	< 10	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10
PCB 156	100 ± 10	120 ± 20	< 2,0	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10
PCB 157	< 23	< 30	< 10	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10

Analyt	Silikonstreifen (ng L ⁻¹ Extrakt)			Chemcatcher [®] (ng L ⁻¹ Extrakt)		Oberflächenwasser (ng L ⁻¹ Wasser)		
	Ahrbach	Gelbach	Feldkontrolle	To	Ahrbach	Gelbach	Ahrbach	Gelbach
PCB 167	60 ± 0,0	80 ± 20	< 10	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10
PCB 189	< 20	< 20	< 10	< 10	< 20	< 20	< 0,10	< 0,10
Summe dl-PCB	< 963	< 1120	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Die Konzentrationen in den Silikonstreifen an den Standorten Gelbach und Ahrbach sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von je drei Replikaten (n=3). Alle anderen Proben sind Einzelproben. Die Feldkontrolle wurde wie die anderen Silikonstreifen behandelt, aber während der Exposition der eigentlichen Proben im Gewässer im Labor gelagert. Die t₀-Probe sind Silikonstreifen, die mit PRC dotiert und wie die eigentlichen Proben analysiert wurden, aber nicht mit zum Gewässer transportiert und ausgebracht wurden. Die Konzentrationen sind in pg mL⁻¹ Extrakt (Passivsammler) bzw. pg mL⁻¹ Wasser (Oberflächenwasserproben) angegeben. Bei den Passivsammlern entsprechen pg mL⁻¹ Extrakt pg g⁻¹ Silikon für die Silikonstreifen bzw. pg pro ¼ -Disk für die Chemcatcher[®]. Summenparameter (Dioxine, Furane, dl-PCB) sind fett markiert. < = < Bestimmungsgrenze (BG). Für die Berechnung von Mittelwerten und Summenparametern wurde bei Werten < BG mit der ganzen BG gerechnet. n.b. = nicht bestimmt.

Matrix	Standort	Einheit	PCDD/F	dl-PCB
Silikonstreifen	Ahrbach	ng L ⁻¹ Extrakt	2,1 ± 0,9	0,7 ± 0,0
	Gelbach	ng L ⁻¹ Extrakt	2,5 ± 1,2	0,7 ± 0,2
	Feldkontrolle	ng L ⁻¹ Extrakt	< 0,6	< 0,3
	to	ng L ⁻¹ Extrakt	< 0,6	< 0,3
Chemcatcher®	Ahrbach	ng L ⁻¹ Extrakt	< 1,3	< 0,3
	Gelbach	ng L ⁻¹ Extrakt	< 1,3	< 0,3
Oberflächenwasser	Ahrbach	ng L ⁻¹ Wasser	0,0058	0,0010
	Gelbach	ng L ⁻¹ Wasser	0,0036	0,0010

Anlage 15: WHO-TEQ

WHO-TEQ (2005) für die PCDD/F und die dl-PCB in den verschiedenen Matrizes (Silikonstreifen, Chemcatcher[®], Oberflächenwasser), die anhand der chemischen Analysen ermittelt wurden. Die TEQ-Werte wurden inkl. der Bestimmungsgrenze der Analyten berechnet. Die Werte für die Silikonstreifen von den Standorten Gelbach und Ahrbach sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von je drei Replikaten (n=3); alle anderen Daten sind Ergebnisse von Einzelproben. Von den Silikonstreifen wurden auch eine Feldkontrolle sowie eine t0-Probe gemessen. Die Werte sind in ng L⁻¹ Extrakt (Passivsammler) bzw. ng L⁻¹ Wasser (Oberflächenwasserproben) angegeben. Bei den Passivsammlern entsprechen ng L⁻¹ Extrakt ng kg⁻¹ Silikon für die Silikonstreifen bzw. ng pro ¼ -Disk für die Chemcatcher[®]. < = < Bestimmungsgrenze (BG). Für die Berechnung von Mittelwerten wurde bei Werten < BG mit der ganzen BG gerechnet. In den Oberflächenwasserproben wurden zwar rechnerisch TEQ-Werte für die dl-PCB ermittelt, allerdings wurde jeweils nur das PCB 77 detektiert, während alle anderen dl-PCB < BG waren.