

Pilotprojekt zur Eignung von *in vitro*-Biotestverfahren für ein effektbasiertes Monitoring in Oberflächengewässern

Abschlussbericht
2022



Niedersachsen

Dieser Bericht wurde im Auftrag des NLWKN und in Zusammenarbeit mit der GWT-TUD GmbH erstellt:

GWT-TUD GmbH
Freiberger Straße 33
01067 Dresden

Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft,
Küsten- und Naturschutz
Betriebsstelle Hannover-Hildesheim
An der Scharlake 39
31135 Hildesheim

Autoren:

Stephanie Graumnitz, GWT-TUD GmbH
Sara Schubert, GWT-TUD GmbH,
Jessica M. Rosolowski, GWT-TUD GmbH
Dr. Dirk Jungmann, GWT-TUD GmbH (Projektleitung)
Tanja Lieke, NLWKN Hannover-Hildesheim
Dr. Mario Schaffer, NLWKN Hannover-Hildesheim

Februar 2022

Titelbild: Sara Schubert, Jessica M. Rosolowski

Zusammenfassung

Im Hinblick auf die Entwicklungen und die Empfehlung der Implementierung effektbasierter Methoden in das Gewässermonitoring nach WRRL durch verschiedene Wissenschaftler, sollte in diesem Pilotprojekt die generelle Eignung und praktische Umsetzung von *in vitro*-Biotestverfahren als Ergänzung zum regulären chemischen Schadstoffmonitoring untersucht werden.

Dazu wurden im Rahmen des Routinemonitorings des Gewässerüberwachungssystems Niedersachsens (GÜN) im August 2020 und März 2021 jeweils 40 Proben aus Oberflächengewässern im Bereich des Dienstbezirks der NLWKN Betriebsstelle Hannover-Hildesheim entnommen. Diese Gewässerproben wurden mittels Festphasenextraktion angereichert und konserviert. Die gewon-

nenen Extrakte wurden am Institut für Hydrobiologie der Technischen Universität Dresden in insgesamt acht *in vitro*-Biotests eingesetzt, um diese auf endokrines, mutagenes und gentoxisches Potential zu untersuchen. Die häufigsten Nachweise wurden hierbei für östrogenes und dioxinähnliches Potential festgestellt. Hinweise auf mutagenes Potential und gentoxisches Potential wurde für die Proben vom Frühjahr 2021 häufiger festgestellt als für die Proben vom Sommer 2020.

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den *in vitro*-Biotests wurden insgesamt 23 Oberflächengewässermessstellen identifiziert, für welche ein fokussiertes chemisches Monitoring empfohlen wird, um die jeweilige Belastungssituation detaillierter zu erfassen.

Inhaltsverzeichnis

1	Hintergrund.....	1
2	Monitoringkonzept und verwendete Methoden	2
2.1	Probenahme	2
2.2	Probenvorbereitung und Anreicherung über Festphasenextraktion.....	2
2.3	In vitro-Biotests.....	2
3	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Biotests des Gewässermonitorings Sommer 2020 und Frühjahr 2021	5
3.1	Hefereportergergen-Tests zur Erfassung endokrin wirksamer Substanzen.....	5
3.1.1	Östrogene Wirkpotentiale (YES-Test)	5
3.1.2	Anti-östrogene Wirkpotentiale (YAES-Test)	7
3.1.3	Androgene Wirkpotentiale (YAS-Test)	9
3.1.4	Anti-androgene Wirkpotentiale (YAAS-Test).....	9
3.1.5	Dioxinähnliche Wirkpotentiale (YDS-Test)	11
3.2	Bakterienbasierte in vitro-Tests zur Erfassung mutagener und genotoxischer Substanzen...	13
3.2.1	Mutagenität durch Rasterschubmutationen (Ames TA98)	13
3.2.2	Mutagenität durch Basenpaarsubstitutionen (Ames TA100).....	14
3.2.3	Erbgutveränderndes Potential im Umu-Test (TA 1535/pSK1002)	14
3.3	Mikrokern-Test zur Erfassung genotoxischer Substanzen.....	17
4	Identifizierung von Oberflächengewässer für ein fokussiertes Monitoring.....	20
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	20
4.2	Vergleich der Ergebnisse der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021	21
4.3	Schlussfolgerungen	24
	Danksagung.....	25
	Literatur.....	25
	Anhang	27

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Elution der beladenen Kartuschen im Zug der Festphasenextraktion 2
- Abb. 2:** Sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Positivkontrolle 17 β -Estradiol (E2) zum Nachweis von östrogenem Potential im YES-Test; Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD). 5
- Abb. 3:** Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YES-Test, dargestellt als MW \pm SD der 17 β -Estradiol-Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (> 3*LOQ) Äquivalentkonzentration..... 6
- Abb. 4:** Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YES-Test, dargestellt als MW \pm SD der 17 β -Estradiol-Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (> 3*LOQ) Äquivalentkonzentration..... 6
- Abb. 5:** Anti-östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAES-Test, dargestellt als MW \pm SD der OHT-Äquivalente (OHT-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. 8
- Abb. 6:** Anti-östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAES-Test, dargestellt als MW \pm SD der OHT-Äquivalente (OHT-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (>3*LOQ) Äquivalentkonzentration. 8
- Abb. 7:** Androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAS-Test, dargestellt als MW \pm SD der Testosteron-Äquivalente (T-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. 9
- Abb. 8:** Androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAS-Test, dargestellt als MW \pm SD der Testosteron-Äquivalente (T-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. 10
- Abb. 9:** Anti-androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAAS-Test dargestellt als dargestellt als MW \pm SD der Flutamid-Äquivalente (Flu-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. .. 10
- Abb. 10:** Anti-androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAAS-Test dargestellt als MW \pm SD der Flutamid-Äquivalente (Flu-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. 11
- Abb. 12:** Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YDS-Test dargestellt als MW \pm SD der β -Naphthoflavon-Äquivalente (β -NF-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (>3*LOQ) Äquivalentkonzentration..... 12
- Abb. 13:** Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 in YDS-Test dargestellt als MW \pm SD der β -Naphthoflavon-Äquivalente (β -NF-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (>3*LOQ) Äquivalentkonzentration..... 13

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der für die Messkampagne angewendeten <i>in vitro</i> -Biotests mit jeweiligem summarischen Wirkpotential zum Nachweis von endokrinem, mutagenem und gentoxischem Potential sowie Beispiele für Substanzen, deren Effekte mit den Tests erfasst werden können	4
Tab. 2: Berechnung des finalen Anreicherungs-faktors der Proben in den Biotests unter Verrechnung der Anreicherung mittels Festphasenextraktion mit der spezifischen testbedingten Verdünnung der Extrakte.	4
Tab. 3: Mutagenität entsprechend den Resultaten der Ames-Tests mit den <i>Salmonella</i> -Stämmen TA98 und TA100 für die je 40 Gewässerproben der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 bei 40-facher Anreicherung. *Validitätskriterium der Positivkontrolle mit mind. 25 von 48 Wells mit Revertantenwachstum nicht erfüllt	15
Tab. 4: Mikrokernrate und Bewertung der Gentoxizität (GT) mittels Mikrokern-Test in 3 Verdünnungsstufen (VS1-3) für die Gewässerproben (1-40); Anreicherungsstufe: 10-fach (VS1), 5-fach (VS2) und 2,5-fach (VS3). n.a.=Proben nicht auswertbar, *Proben mit erhöhter Anzahl von Mikrokernen, aber geringem Mitoseindex im Testansatz	18
Tab. 5: Übersicht der Ergebnisse des effektbasierten Monitorings für 2020 und 2021 für endokrines Potential (YES, YAES, YAS, YAAS, YDS; 20,8-fache Anreicherung), Mutagenität (TA98, TA100; 40-fache Anreicherung) und Gentoxizität (MN-Test; 10-fache, 5-fache und 2,5-fache Anreicherung).....	22
Tab. A-1: Übersicht der 40 Probenahmestellen der Routineprobenahmen des NLWKN im Sommer 2020 und Frühjahr 2021	27

Abkürzungsverzeichnis

2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
4-NOPD	4-Nitro-Phenylendiamin
4-NP	4-Nonylphenol
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
B(a)P	Benzo(a)pyren
BPA	Bisphenol A
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEHP	Diethylhexylphthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
EBM	Effektbasiertes Monitoring
EE2	17 α -Ethinyl-Estradiol
E-EQ	Estradiol Equivalent Quotient, 17 β -Estradiol-Äquivalent Konzentration
Flu-EQ	Flutamid Equivalent Quotient, Flutamid-Äquivalent Konzentration
ISO	(Norm der) Internationale(n) Organisation für Normung
HCB	Hexachlorbenzol
HCH	Hexachlorcyclohexan
Hep-G2	Humane Leberkarzinomzellen
LOQ	Limit of Quantification, Quantifizierungsgrenze, Bestimmungsgrenze
MW	Mittelwert
NF-EQ	β -Naphthoflavone Equivalent Quotient, β -Naphthoflavon-Äquivalent Konzentration
NK	Negativkontrolle des Biotests
NLWKN	Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz
OECD	(Richtlinien der) Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OHT-EQ	OHT Equivalent Quotient, 4-Hydroxytamoxifen-Äquivalent Konzentration
OP	Octylphenol
PAKs	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PK	Positivkontrolle des Biotests
P,p'-DDE	p,p'-Dichlordiphenyldichlorethen
PTFE	Polytetrafluorethylen
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion

TA100	Bakterienstamm TA100 zum Nachweis von Mutagenität im Ames-Test
TA98	Bakterienstamm TA98 zum Nachweis von Mutagenität im Ames-Test
TBT	Tributylzinn
T-EQ	Testosterone Equivalent Quotient, Testosteron-Äquivalent-Konzentration
VS1-3	Verdünnungsstufe 1-3
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
YAAS	Yeast Anti-Androgen Screen, Hefetest zum Nachweis anti-androgener Wirkpotentiale
YAES	Yeast Anti-Estrogen Screen, Hefetest zum Nachweis anti-östrogener Wirkpotentiale
YAS	Yeast Androgen Screen, Hefetest zum Nachweis androgener Wirkpotentiale
YDS	Yeast Dioxin-like Screen, Hefetest zum Nachweis dioxinähnlicher Wirkpotentiale
YES	Yeast Estrogen Screen, Hefetest zum Nachweis östrogener Wirkpotentiale

1 Hintergrund

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

Mit *in vivo*-Biotests können schädliche Effekte einer Wasserprobe auf Organismen-Ebene erfasst werden. Ein Beispiel für *in vivo*-Biotests ist der Fischeitest.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit *in vitro*-Biotests, die mit Kulturen von einzelnen, teilweise modifizierten Zellen durchgeführt werden. Mit diesen Tests lassen sich spezielle toxische Mechanismen bestimmter Substanzklassen nachweisen. Als Beispiel ist hier der Nachweis östrogenaktiver Substanzen mit dem hefezellbasierten Östrogen-test (Yeast Estrogen Screen, YES) zu nennen.

Da bei *in vivo*- und *in vitro*-Biotests das toxische Potential einer Wasser- oder Abwasserprobe auf Basis des Effekts auf den exponierten Organismus/die exponierte Zelle bestimmt wird, wird hier auch von effektbasierten Methoden gesprochen. Die Implementierung effektbasierter Methoden in das Gewässermonitoring nach WRRL wird von verschiedenen Wissenschaftlern befürwortet (Brack et al., 2019, Könemann et al., 2018) und für die Novellierung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie geprüft. Hintergrund ist unter anderem die Vielzahl umweltrelevanter Chemikalien sowie Chemikaliengemische, die die Wasserqualität beeinflussen können, aber durch die chemische Analyse nach WWRL in ihrer Komplexität nicht erfasst werden.

In vitro-Biotests, können daher aufgrund der summarischen Erfassung der Belastung von Gewäs-

sern mit Substanzen mit bestimmten Wirkmechanismen, eine sinnvolle Ergänzung zur chemischen Analyse darstellen.

So können die Ergebnisse aus *in vitro*-Biotests als Information für eine fokussierte stoffspezifische chemische Analyse dienen. Die Biotests ermöglichen die Untersuchung und Bewertung von Stoffgemischen, deren Zusammensetzung unbekannt ist und erfassen darüber hinaus auch additive, synergistische oder antagonistische Effekte verschiedener Substanzen in einer Probe. Weiterhin erfassen *in vitro*-Biotests Effekte von Substanzen, für welche ein Nachweis durch chemische Analytik besonders schwierig ist oder von unbekanntem Transformationsprodukten, die innerhalb eines Prozesses entstehen. Während die chemische Analytik gezielt Einzelsubstanzen identifizieren und quantifizieren kann, erlauben biologisch/ökotoxikologische Tests eine Einschätzung, inwiefern ein Risiko durch Schadstoffe für das betroffene Ökosystem besteht. Beide Herangehensweisen ergänzen sich und sollten stets in Kombination angewendet werden

Ziel dieses Pilotprojektes war die Untersuchung der Eignung von *in vitro*-Biotests für ein effektbasiertes Monitoring als Ergänzung zum Schadstoffüberwachungsprogramm der Oberflächengewässer des NLWKN. Dazu wurden mit Extrakten von Wasserproben aus niedersächsischen Oberflächengewässern verschiedene *in vitro*-Biotests durchgeführt.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung sollten mögliche Belastungen der Oberflächengewässer mit Substanzen, die eine hormonelle, mutagene oder genotoxische Wirkung haben, identifiziert werden. Zudem sollte aus den Ergebnissen eine Empfehlung von Messstellen für eine fokussiertere chemische Analyse abgeleitet werden.

2 Monitoringkonzept und verwendete Methoden

2.1 Probenahme

Die untersuchten Gewässerproben sind im Rahmen des Gewässerüberwachungssystems Niedersachsens (GÜN) aus Oberflächengewässern des Dienstbezirks der NLWKN Betriebsstelle Hannover-Hildesheim an insgesamt 40 Messstellen entnommen worden (**Tab. A-1**). Die Probenahme und Anreicherung erfolgte im Zeitraum vom 06.08.2020 bis 01.09.2020 und vom 04.03.2021 bis 30.03.2021 durch Mitarbeiter des NLWKN in enger Abstimmung mit der GWT-TUD GmbH.

Für die Probenahme wurden Braunglasflaschen verwendet, die zuvor mehrfach mit technischem Aceton gespült und danach getrocknet wurden. Die Schöpfproben wurden von der Probenahme bis zur Weiterverarbeitung bei max. 7°C im Dunkeln transportiert bzw. gelagert.

2.2 Probenvorbereitung und Anreicherung über Festphasenextraktion

Nach Probeneingang wurde innerhalb von 24 h eine Anreicherung der Proben durchgeführt. Hierbei wurden die potenziell in der Probe enthaltenen Schadstoffe aufkonzentriert, so dass deren Wirkungsschwelle im jeweiligen Biotest erreicht wird, ohne die testspezifische Zytotoxizität zu überschreiten.

Um die Gewässerproben anzureichern, wurde jeweils 1 L der Probe mittels Vakuumpumpe über einen Glasfaserfilter (< 0,7 µm; 90 mm Durchmesser; Sartorius) filtriert. Die filtrierte Probe wurde im Anschluss mittels Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) angereichert. Für die SPE wurden mit Aceton und Methanol sowie Reinstwasser konditionierte HLB Kartuschen (200 mg; Waters Oasis) verwendet, die mit der vorbereiteten Gewässerprobe beladen (6–8 mL/min) wurden. Die beladenen Kartuschen wurden anschließend bei Raumluft getrocknet und bis zur Versendung an das Institut für Hydrobiologie, Technischen Universität Dresden bei -20 °C gelagert.

Die Elution (**Abb. 1**) wurde mit Aceton und Methanol für alle Proben durchgeführt. Anschließend wurden die Eluate unter Stickstoff vollständig ge-

trocknet und in 100 µl DMSO wieder aufgenommen. Somit wurde das Probenvolumen um das 10.000-fache angereichert.

Die gewonnenen Extrakte wurden bei -20 °C in Glasvials (1,5 mL, VWR) gelagert. Für die hefebasierten Biotests wurden die 40 Gewässerproben jeweils zusammen untersucht, um Schwankungen zwischen verschiedenen Ansätzen z.B. hinsichtlich Bestimmungsgrenze und Zytotoxizität zu minimieren. Materialien, die während der Filtration und Extraktion in direktem Kontakt mit der Probe standen, bestanden ausschließlich aus mit Lösungsmittel und Reinstwasser gespültem Teflon™ (PTFE), Glas, Edelstahl oder Keramik, um mögli-



Abb. 1: Elution der beladenen Kartuschen im Zug der Festphasenextraktion

che Verunreinigungen aus beispielsweise Kunststoffmaterialien auszuschließen. Es wurden Aceton, Methanol und DMSO (jeweils analytical grade, > 99,8 %, Carl Roth GmbH) sowie Reinstwasser (ultrapure water, steril filtriert, autoklaviert) für die Probenvorbereitung genutzt.

2.3 In vitro-Biotests

In **Tab. 1** sind die *in vitro*-Biotests aufgelistet, in die die Gewässerextrakte eingesetzt wurden, sowie die jeweiligen Wirkpotentiale, die mit ihnen erfasst werden und Beispiele für Substanzen, welche diese Potentiale auslösen.

Die eingesetzten Hefereportergergen-Tests erfassen östrogenes (YES, Yeast Estrogen Screen), anti-östrogenes (YAES, Yeast Anti-Estrogen

Screen), androgenes (YAS, Yeast Androgen Screen), anti-androgenes (YAAS, Yeast Anti-Androgen Screen) und dioxinähnliches (YDS, Yeast Dioxin-like Screen) Potential. Hierbei werden endokrin aktive Substanzen wie Hormone, Weichmacher, Insektizide oder andere chemisch völlig unterschiedliche Substanzen bzw. Substanzgruppen erfasst.

Weiterhin wurden Ames-Tests („Bacterial Reverse Mutation Test“) zur Erfassung von mutagenem Potential durchgeführt. In Abhängigkeit des verwendeten Stammes des Bakteriums *Salmonella typhimurium* wird entweder die Auslösung von Rasterschubmutationen (Stamm TA98) oder von Basenpaarsubstitutionen (Stamm TA100) nachgewiesen. Als Beispiel mutagener Substanzen sind hier die Stoffgruppen der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) und der Schwermetalle zu nennen. Zusätzlich wurde für alle Proben im ökotoxikologischen Labor des NLWKN der im Abwasserbereich etablierte und ebenfalls mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* (Stamm TA 1535/pSK1002) durchgeführte umu-Test komplementär eingesetzt, um weitere Hinweise auf potenziell gentoxische Effekte zu erhalten.

Im Mikrokern-Test („*in vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test“) werden humane Leberkarzinomzellen (HepG2) zur Erfassung von gentoxischem Potential genutzt, welches anhand einer Schädigung von Chromosomen oder des Spindelapparates nachgewiesen wird. Solche gentoxischen Effekte können beispielsweise durch Substanzen wie PAKs oder Zytostatika verursacht werden.

Wichtiges Validitätskriterium für alle in **Tab. 1** gelisteten Biotests ist ein optimales Wachstum der Zellen im Test. Wird dieses nicht erreicht, gilt die Probe als zytotoxisch bzw. wachstumshemmend. In solchen Fällen kann die Probe nach Verdünnung erneut getestet werden. Dies führt jedoch auch dazu, dass die möglicherweise in der Probe enthaltenen endokrin wirksamen, mutagenen oder gentoxischen Substanzen verdünnt werden und damit möglicherweise die Wirkschwelle des Tests nicht mehr erreicht wird. Hieraus ergibt sich, dass eine Vergleichbarkeit grundsätzlich nur zwischen Proben der gleichen Anreicherungsstufe möglich ist.

Im Zuge der Testdurchführung wird zu den 10.000-fach angereicherten Gewässerprobenextrakten unter anderem Medium oder Zellkultur hinzugegeben und dadurch verdünnt. Die finale Anreicherung der Probe im Biotest ergibt sich schließlich aus der Verrechnung der Anreicherung über SPE mit der testspezifischen Verdünnung der Extrakte und ist für alle Biotests in **Tab. 2** angegeben.

Die Ergebnisse der Biotests beziehen sich immer auf eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle. Die Negativkontrolle gibt unter Berücksichtigung eines testspezifischen Sicherheitsfaktors auch die laborinterne Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantification) vor.

Weitergehende Informationen zu den Biotests enthält der jeweils entsprechende Abschnitt im nachfolgenden Kapitel 3, welches die Auswertung der Ergebnisse für alle Gewässerproben erläutert.

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

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

Tab. 2: Berechnung des finalen Anreicherungs-faktors der Proben in den Biotests unter Verrechnung der Anreicherung mittels Festphasenextraktion mit der spezifischen testbedingten Verdünnung der Extrakte.

Matrix	Anreicherung SPE	Biotest	Verdünnung im Test	Finale Anreicherung
Gewässer	10.000-fach	Hefereportergergen-Test	1:480	20,8-fach
		Ames-Test	1:250	40,0-fach
		Mikrokern-Test	1:1000 (VS1)	10,0-fach
			1:2000 (VS2)	5,0-fach
			1:4000 (VS3)	2,5-fach

3 Ergebnisse der *in vitro*-Biotests des Gewässermonitorings Sommer 2020 und Frühjahr 2021

3.1 Hefereportergergen-Tests zur Erfassung endokrin wirksamer Substanzen

Zur Erfassung endokrin wirksamer Substanzen werden genetisch veränderte Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber den, in der Festphasenextraktion 10.000-fach angereicherten Extrakten der Gewässerproben exponiert. Je nach Tests enthalten die genetisch veränderte Hefezellen den humane Östrogenrezeptor α (hER α) zur Erfassung östrogenen und anti-östrogenen Substanzen (YES und YAES), den humanen Androgenrezeptor (hAR) zur Erfassung androgenen und anti-androgenen Substanzen (YAS und YAAS) oder den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (aHR, veraltet Dioxinrezeptor) zur Erfassung von dioxinähnlichen Substanzen bzw. Substanzen mit Affinität zur Bindung an den aHR. Seit August 2018 ist für den Yeast Estrogen Screen (YES-Test) eine ISO-Norm verfügbar (ISO19040-1).

Die jeweiligen Äquivalentkonzentrationen (EQ) der untersuchten Wasserproben wurde aus den sigmoidalen Standardkurven (**Abb. 2**) der jeweiligen Referenzsubstanzen ermittelt. Die Berechnung der Standardkurven der Referenzsubstanzen erfolgte mittels nicht-linearer Regression (4-Parameter Hill Funktion). Aus diesen Kurven wurden anschließend die Äquivalentkonzentrationen abgeleitet.

Die Ableitung der Äquivalentkonzentrationen sowie die Verrechnung des in Kapitel 2.3 erwähnten Anreicherungs-faktors (**Tab. 2**) der extrahierten Proben wird auf internationaler Ebene kritisch diskutiert (Könemann *et al.* 2018, Kunz *et al.* 2017, Völker *et al.* 2016). Ein entsprechender ISO-Standard ist derzeit in Vorbereitung zur Veröffentlichung (Vermeirssen, 2021). Die Verrechnung der abgeleiteten Äquivalentkonzentrationen erfolgte für die vorliegende Pilotstudie mittels Division durch den Anreicherungs-faktor von 20,8.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde für jeden Testansatz durch Addition der 3fachen Standardabweichung der mittleren Aktivität der Negativkontrolle zur mittleren Aktivität der Negativkontrolle berechnet. Die ermittelten Äquivalentkonzentrationen wurden im vorliegenden Bericht als

erhöht eingestuft, wenn die mittlere Äquivalentkonzentration größer als das 3fache des jeweiligen LOQ-Wertes war.

Als zytotoxisch wurden Proben eingestuft, wenn das Zellwachstum im Mittel deutlich unter der 80% Linie des Zellwachstums der Negativkontrolle lag.

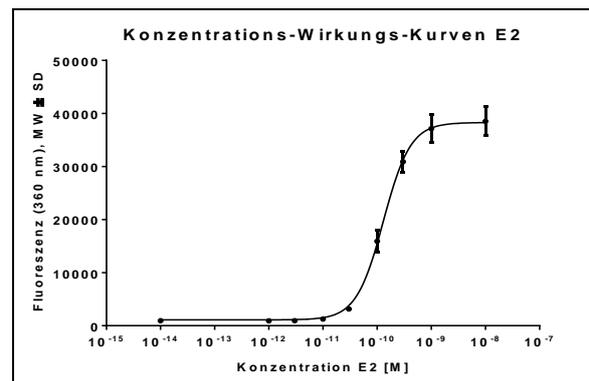


Abb. 2: Sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Positivkontrolle 17 β -Estradiol (E2) zum Nachweis von östrogenem Potential im YES-Test; Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD).

3.1.1 Östrogene Wirkpotentiale (YES-Test)

Die Ergebnisse für das östrogene Potential (YES – Yeast Estrogen Screen; ISO19040-1) in den Extrakten der Gewässerproben sind in **Abb. 3** und **Abb. 4** dargestellt. Als Positivkontrolle für diesen Hefereportergergen-Test wurde die Substanz 17 β -Estradiol (E2; CAS: 50-28-2; > 99% Reinheit; Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet.

In den Gewässerproben der Probenahme im Sommer 2020 (**Abb. 3**) lag das östrogene Potential für den Brevörder Bach (unterhalb Glesse), die Emmer (Emmern), die Fluthamel (Afferde II), den Hasselbach (Holzminden), den Hollenbach (unterhalb Zerse), die Innerste (Heinde), die Lenne (Bodenwerder), den Mittellandkanal (Lohnde) und den Waltersthagener Bach (Klein Amerika) unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für einen Großteil der anderen Gewässerproben wurde ein moderates östrogenes Potential von 0,07 bis 0,2 ng E-EQ/L festgestellt. Ein erhöhtes östrogenes Potential von > 0,2 ng E-EQ/L wurde in der Gewässerprobe Hülse (Lauenhagen) nachgewiesen.

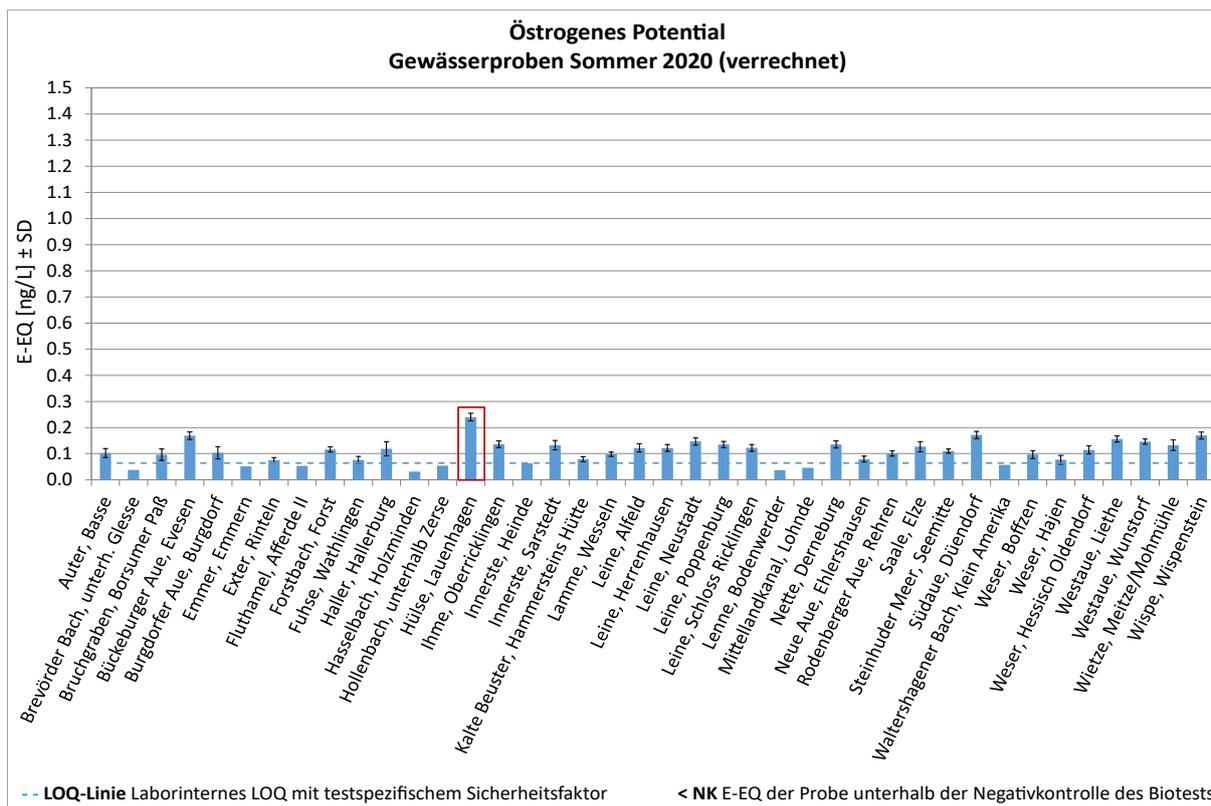


Abb. 3: Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmeaktion Sommer 2020 im YES-Test, dargestellt als $MW \pm SD$ der 17β -Estradiol-Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($> 3 \cdot LOQ$) Äquivalentkonzentration.

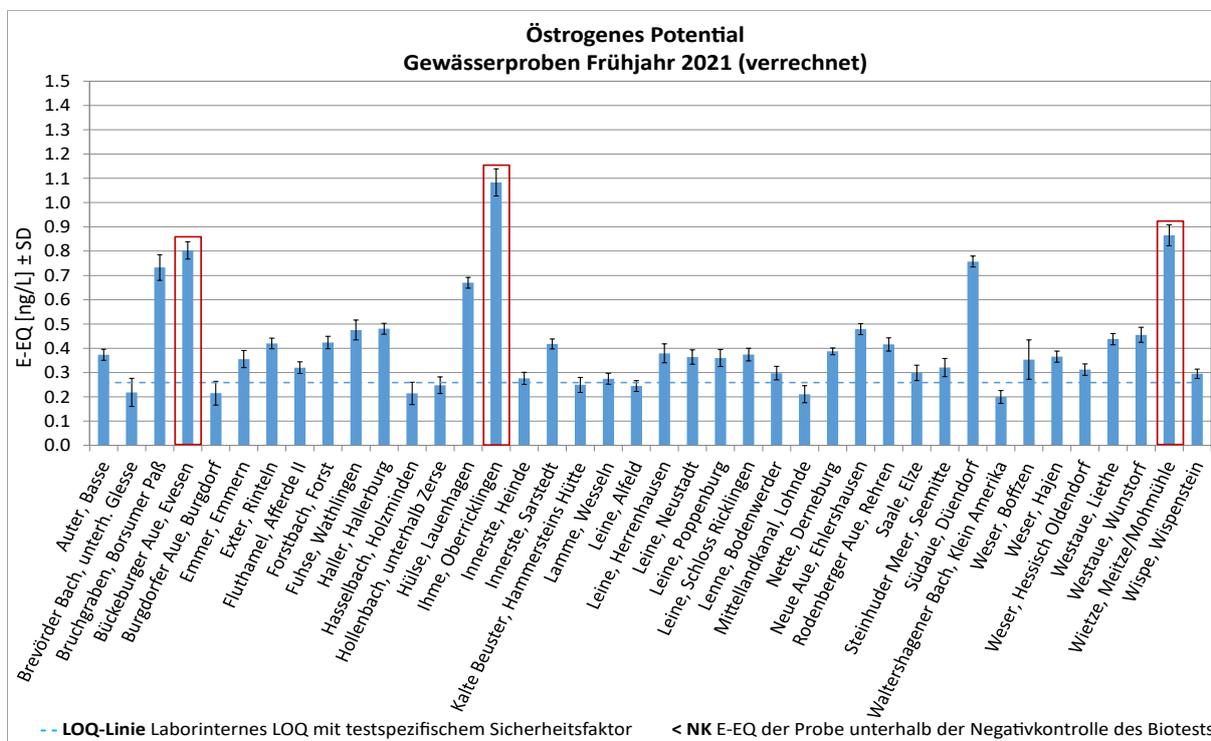


Abb. 4: Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmeaktion Frühjahr 2021 im YES-Test, dargestellt als $MW \pm SD$ der 17β -Estradiol-Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($> 3 \cdot LOQ$) Äquivalentkonzentration.

Für die Gewässerproben der Probenahme im Frühjahr 2021 (**Abb. 4**) wurden im Vergleich zu den Gewässerproben aus dem Sommer 2020 insgesamt ein etwas höheres östrogenes Potential festgestellt. Mögliche Gründe dafür und Anmerkungen zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse der zwei Probenahmen werden im Abschnitt 4.2 diskutiert.

Für die Gewässerproben aus dem Brevörder Bach (unterhalb Glesse), der Burgdorfer Aue (Burgdorf), dem Hasselbach (Holzminden), dem Hollenbach (unterhalb Zerse), der Kalten Beuster (Hammersteins Hütte), der Leine (Alfeld), dem Mittellandkanal (Lohnde) und dem Waltersshagener Bach (Klein Amerika) lag der Mittelwert des E-EQ unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für die Gewässerproben der Messstellen Bückenburger Aue (Evesen), Ihme (Oberricklingen) und Wietze (Meitze/Mohmühle) wurden ein erhöhtes östrogenes Potential >0.8 ng E-EQ/L festgestellt. Für die weiteren 29 der 40 analysierten Gewässerproben wurde ein moderates östrogenes Potential festgestellt.

3.1.2 Anti-östrogene Wirkpotentiale (YAES-Test)

Die Ergebnisse für die Bestimmung der anti-östrogenen Potentiale (YAES – Yeast Anti-Estrogen Screen), die Substanzen mit einer Hemmung des Östrogenrezeptors bzw. eine anti-östrogene Wirkung im Hefereporter-Test erfassen, sind in **Abb. 5** und **Abb. 6** dargestellt. Als Positivkontrolle für diesen Hefereporter-Test wurde die Substanz 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT; CAS: 68392-35-8; $>70\%$ Reinheit, Z-Isomer; Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet.

Für die Probenahme im Sommer 2020 wurde in den Gewässerproben der Messstellen Burgdorfer

Aue (Burgdorf), Leine (Alfeld) und Wispe (Wispenstein) kein anti-östrogenes Potential nachgewiesen (**Abb. 5**). Für den Großteil der Proben lag die OHT-Äquivalentkonzentration unterhalb der laborinternen Bestimmungsgrenze. Für die Messstellen Auter (Basse), Fuhse (Wathlingen), Hülse (Lauenhagen), Ihme (Oberricklingen), Rodenberger Aue (Rehren) Steinhuder Meer (Seemitte), Südaue (Düendorf) und Westaue (Wunstdorf) wurde ein moderates anti-östrogenes Potential von 443 bis $1300 \mu\text{g OHT-EQ/L}$ festgestellt. Ein erhöhtes anti-östrogenes Potential von $> 1300 \mu\text{g OHT-EQ/L}$ wurde für keine der Gewässerprobe nachgewiesen. Mit einer mittleren Äquivalentkonzentration von $958 \mu\text{g OHT-EQ/L}$ zeigt die Gewässerprobe Rodenberger Aue (Rehren), aber deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu den übrigen Messstellen.

Für den Großteil der Gewässerproben der Probenahme im Frühjahr 2021 (**Abb. 6**) konnte kein anti-östrogenes Potential (24/40 Proben) nachgewiesen werden oder die OHT-Äquivalentkonzentration lag unterhalb der laborinternen Bestimmungsgrenze (11/40).

Ein moderates anti-östrogenes Potential von 103 bis $318 \mu\text{g OHT-EQ/L}$ wurde für die Messstellen Leine (Herrenhausen), Mittellandkanal (Lohnde), Neue Aue (Ehlershausen) und Wietze (Meitze/Mohmühle) festgestellt. Lediglich die Gewässerprobe der Messstelle Burgdorfer Aue (Burgdorf) wies eine erhöhte OHT-Äquivalentkonzentration $>318 \mu\text{g OHT-EQ/L}$ auf. Auffällig ist dabei, dass diese Messstelle bei der Probenahme im Sommer 2020 kein anti-östrogenes Potential aufwies. Umgekehrt wurde für die Probenahmestelle Rodenberger Aue (Rehren) im Sommer 2020 ein erhöhtes anti-östrogenes Potential nachgewiesen, wohingegen die Proben im Frühjahr 2021 kein anti-östrogenes Potential zeigte.

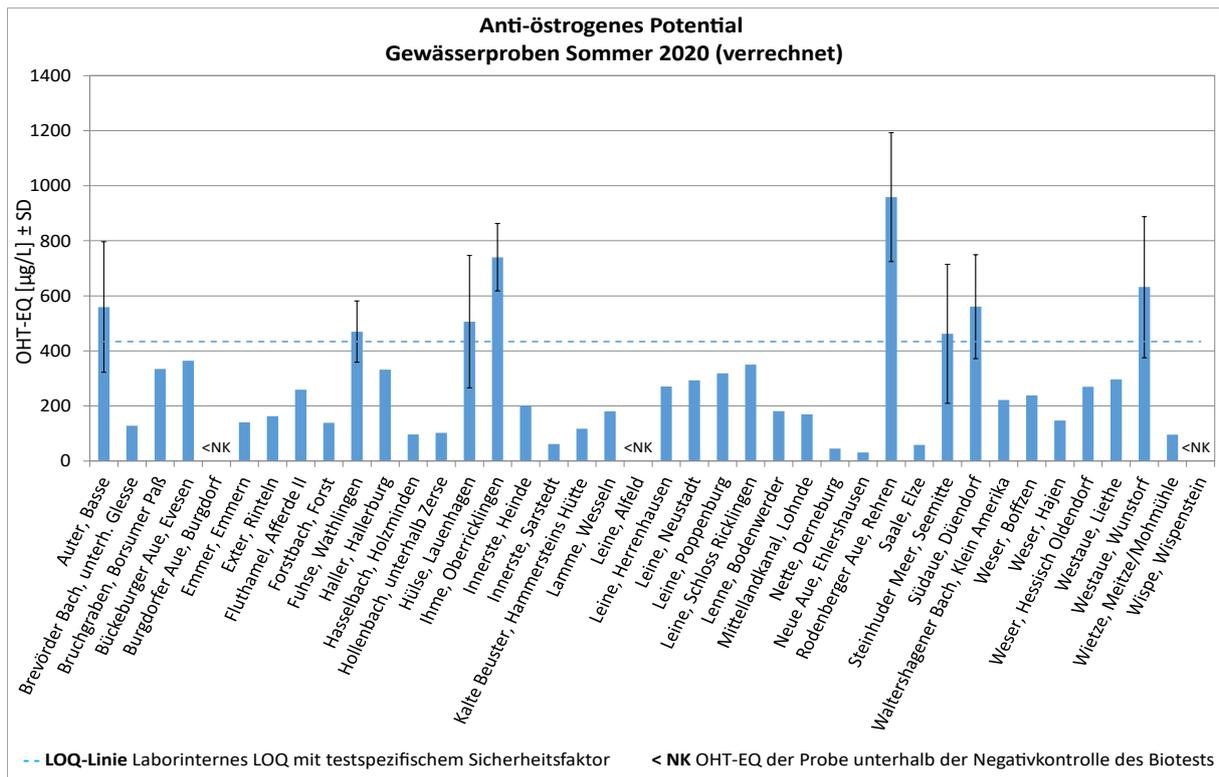


Abb. 5: Anti-östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAES-Test, dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der OHT-Äquivalente (OHT-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$.

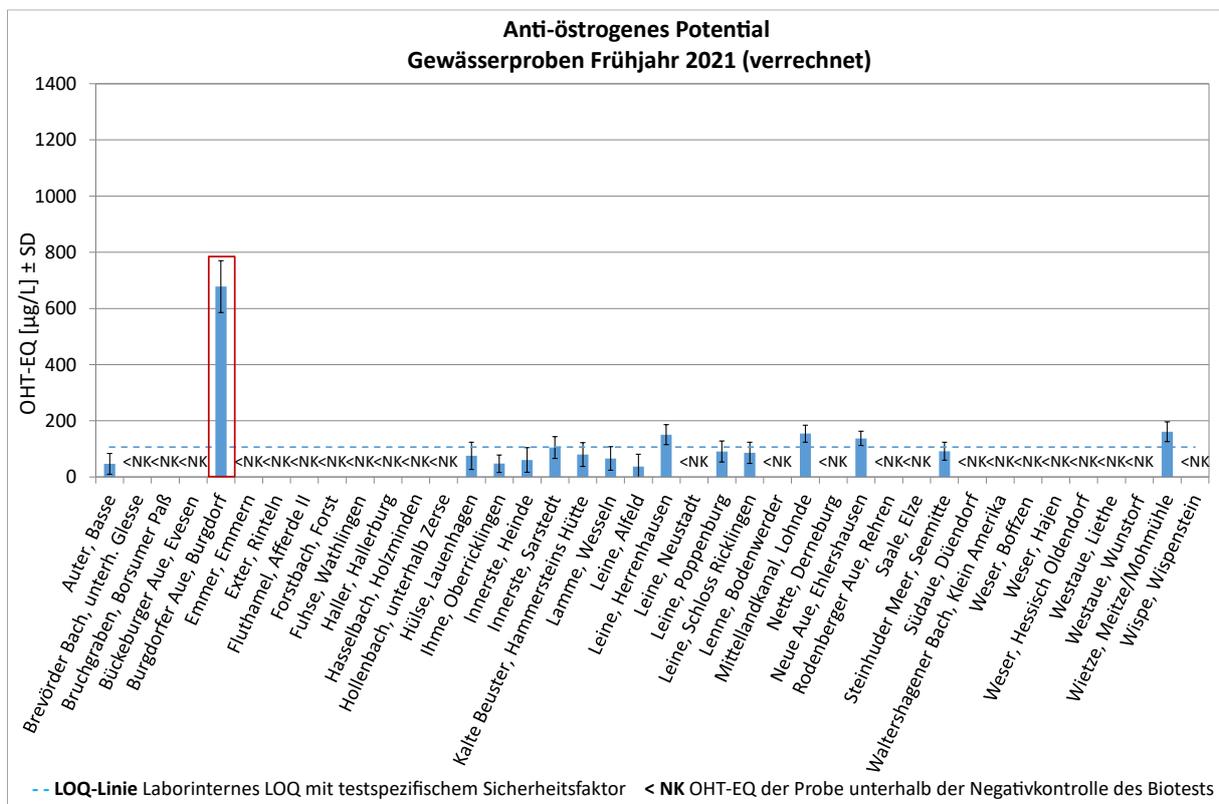


Abb. 6: Anti-östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAES-Test, dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der OHT-Äquivalente (OHT-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($>3 \cdot \text{LOQ}$) Äquivalentkonzentration.

3.1.3 Androgene Wirkpotentiale (YAS-Test)

Die Ergebnisse für die Bestimmung der androgenen Potentiale (YAS – Yeast Androgen Screen), welche im Hefereportergergen-Test durch die Aktivierung des Androgenrezeptors erfasst werden, sind in **Abb. 7** und **Abb. 8** dargestellt. Als Positivkontrolle für diesen Hefereportergergen-Test wurde die Substanz Testosteron (T; CAS: 58-22-0; > 98 %; Merck, Darmstadt) verwendet.

In den meisten der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne im Sommer 2020 wurde kein androgenes Potential bzw. ein androgenes Potential unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen (**Abb. 7**). Lediglich in den Proben aus der Fuhse (Wathlingen) und der Kalten Beuster (Hammersteins Hütte) wurde ein moderates androgenes Potential von $2,34 \pm 0,58$ bzw. $2,31 \pm 0,64$ ng T-EQ/L nachgewiesen.

Auch für die Probenahmekampagne im Frühjahr 2021 konnte in den Gewässerproben der meisten Messstellen kein androgenes Potential bzw. ein

androgenes Potential unterhalb der laborinternen Bestimmungsgrenze festgestellt werden (**Abb. 8**). Lediglich für die Messstelle Westtaue (Liethe) wurde ein moderates androgenes Potential von $3,46 \pm 1,85$ ng T-EQ/L ermittelt.

3.1.4 Anti-androgene Wirkpotentiale (YAAS-Test)

Die Ergebnisse für die Bestimmung der anti-androgenen Potentiale (YAAS – Yeast Anti-Androgen Screen), die Substanzen mit einer anti-androgenen Wirkung im Hefereportergergen-Test erfassen, sind in **Abb. 9** und **Abb. 10** dargestellt. Als Positivkontrolle für diesen Hefereportergergen-Test wurde die Substanz Flutamid (CAS: 13311-84-7; Sigma-Aldrich F 9397) verwendet.

In den untersuchten Gewässerproben wurde für beide Probenahmekampagnen kein anti-androgenes Potential bzw. lediglich ein anti-androgenes Potential unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen.

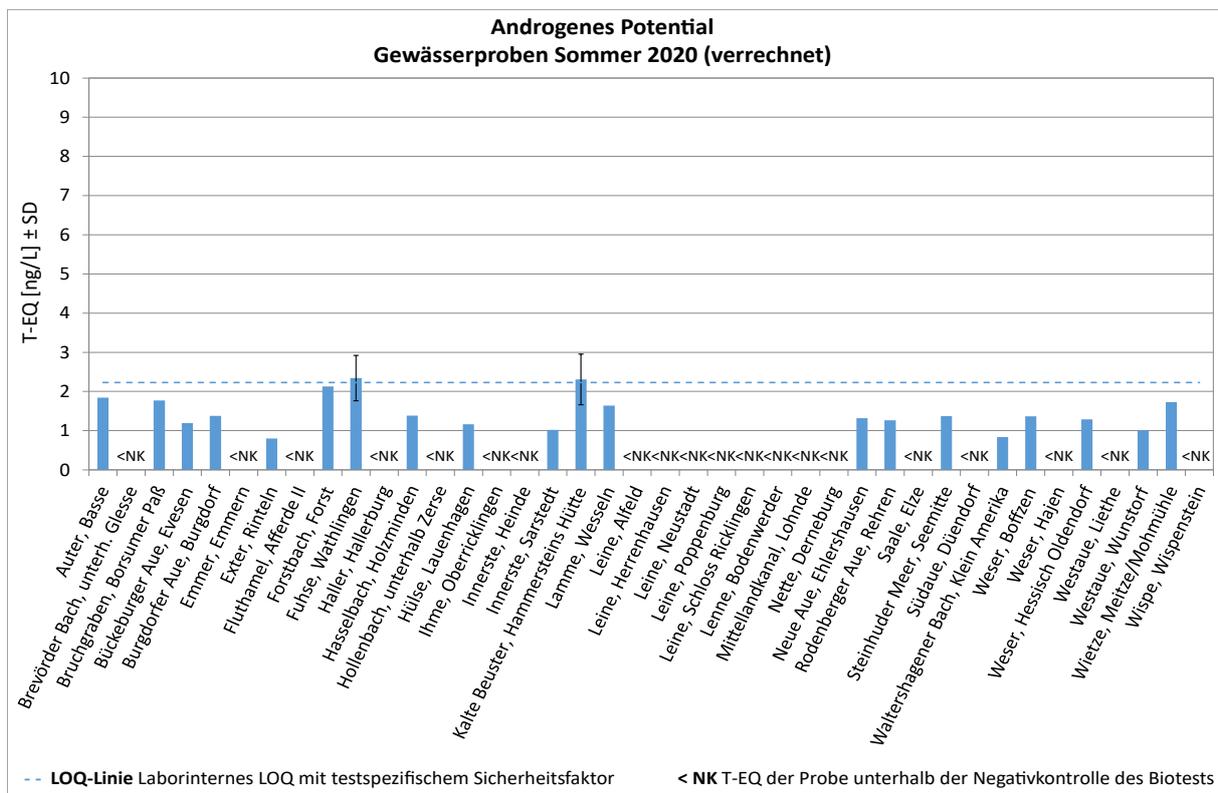


Abb. 7: Androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAS-Test, dargestellt als $MW \pm SD$ der Testosteron-Äquivalente (T-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$.

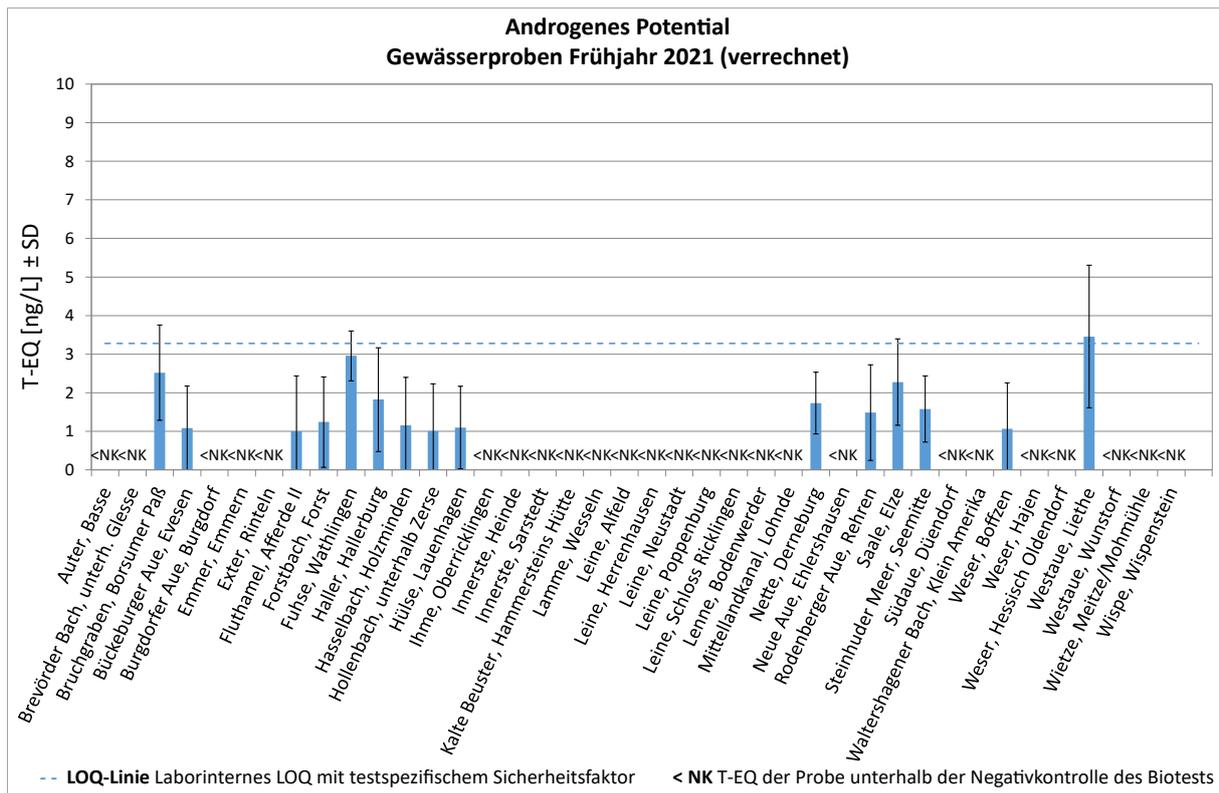


Abb. 8: Androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAS-Test, dargestellt als $MW \pm SD$ der Testosteron-Äquivalente (T-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$.

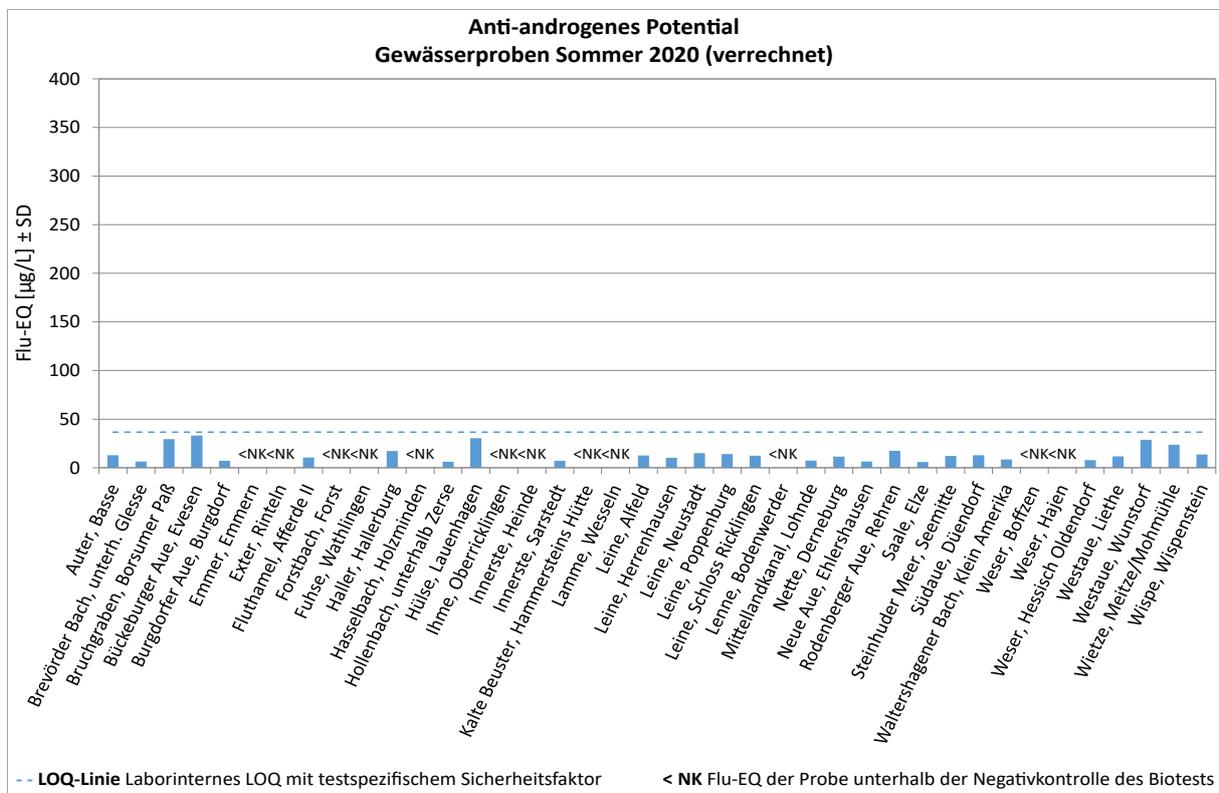


Abb. 9: Anti-androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YAAS-Test dargestellt als $MW \pm SD$ der Flutamid-Äquivalente (Flu-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$.

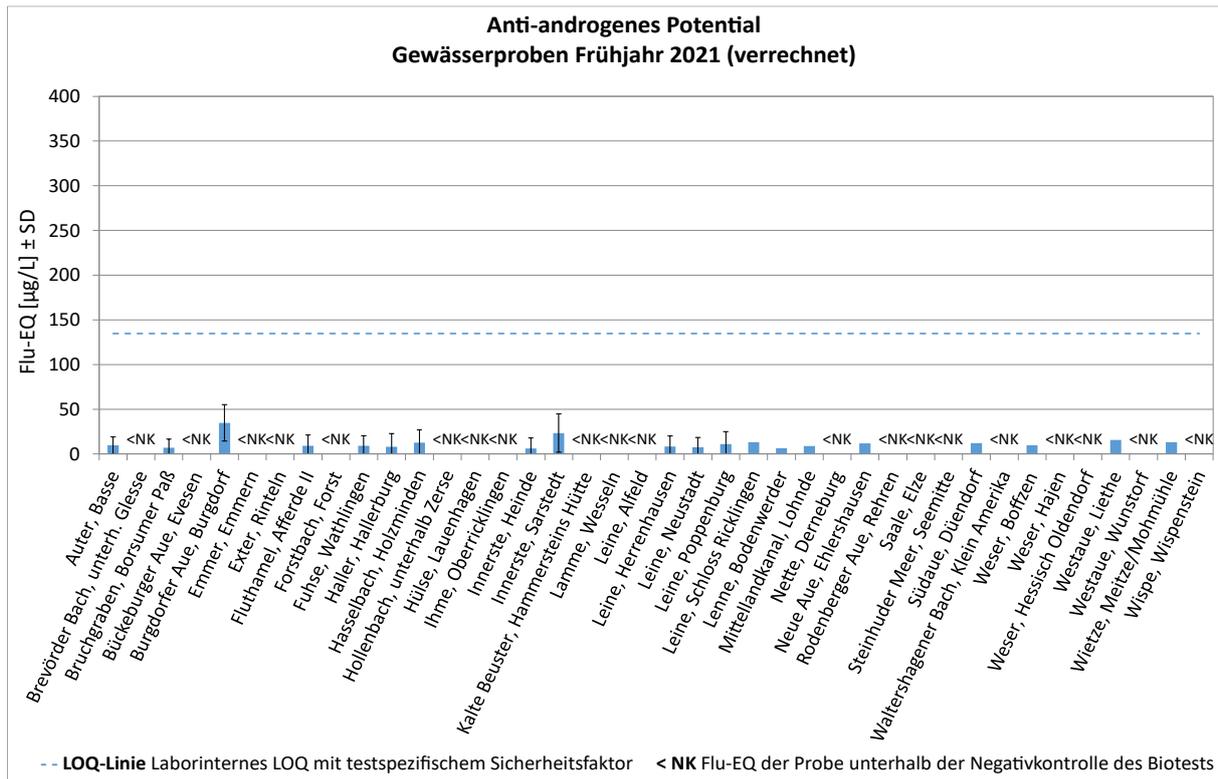


Abb. 10: Anti-androgenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 im YAAS-Test dargestellt als $MW \pm SD$ der Flutamid-Äquivalente (Flu-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$.

3.1.5 Dioxinähnliche Wirkpotentiale (YDS-Test)

Die Ergebnisse der Bestimmung des dioxinähnlichen Potentials (YDS – Yeast Dioxin-like Screen) der angereicherten Gewässerproben ist in **Abb. 11** und **Abb. 12** dargestellt. Als Positivkontrolle für diesen Hefereporter-Test wurde die Substanz β -Naphtho-flavon (CAS: 6051-87-2; purum; Fluka/70415) verwendet.

Die Analyse der Gewässerproben der Probenahmekampagne im Sommer 2020 (**Abb. 11**) ergab, dass das dioxinähnliche Potential für die Messstellen Exter (Rinteln), Hasselbach (Holzminden), Hollenbach (unterhalb Zerse), Nette (Derneburg) und Wispe (Wispenstein) unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. In 20 der untersuchten Gewässerproben wurde moderates dioxinähnliches Potential von 0,15 bis 0,44 $\mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ nachgewiesen. In 15 der untersuchten Gewässerproben wurde erhöhtes dioxinähnliches Potential von $> 0,44 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ festgestellt. Das höchste nachgewiesene dioxinähnliche Potential in diesem Monitoring zeigte dabei die Gewässerprobe

Bruchgraben (Borsumer Paß) mit $1,19 \pm 0,18 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$.

Die Analyse der Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 zeigten für die Messstellen Forstbach (Forst) und Hasselbach (Holzminden) ein dioxinähnliches Potential unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für 28 Messstellen konnte in den Gewässerproben ein moderates dioxinähnliches Potential zwischen 0,13 und 0,4 $\mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ nachgewiesen werden. Ein erhöhtes dioxinähnliches Potential von $> 0,4 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ wurden in 8 Gewässerproben nachgewiesen. Die Gewässerproben der Messstellen Burgdorfer Aue (Burgdorf) und Saale (Elze) waren nach den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Kriterium im Test zytotoxisch. Das heißt, das optimale Wachstum der im Test verwendeten Hefezellen wurde durch toxische Substanzen in den Proben gestört. Da die Proben trotz verringertem Zellwachstum ein dioxinähnliches Potential von 0,40 bzw. 0,32 $\mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ aufwiesen und in den übrigen Hefetests hinsichtlich der Zytotoxizität nicht auffällig waren, ist ein chemisches Monitoring hinsichtlich Substanzen, die eine hohe Bindungsaffinität zum Aryl-

Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) aufweisen, empfehlenswert. Neben klassischen AhR-Liganden wie zum Beispiel Dioxine, dioxinähnlichen PCBs oder PAKs können dies auch natürlich vorkommende

Stoffe wie beispielsweise Indol und Indolderivate, Tetrapyrrole oder verschiedene Carotinoide sein (Denison & Nagy, 2003, Andreeva-Gateva et al., 2020).

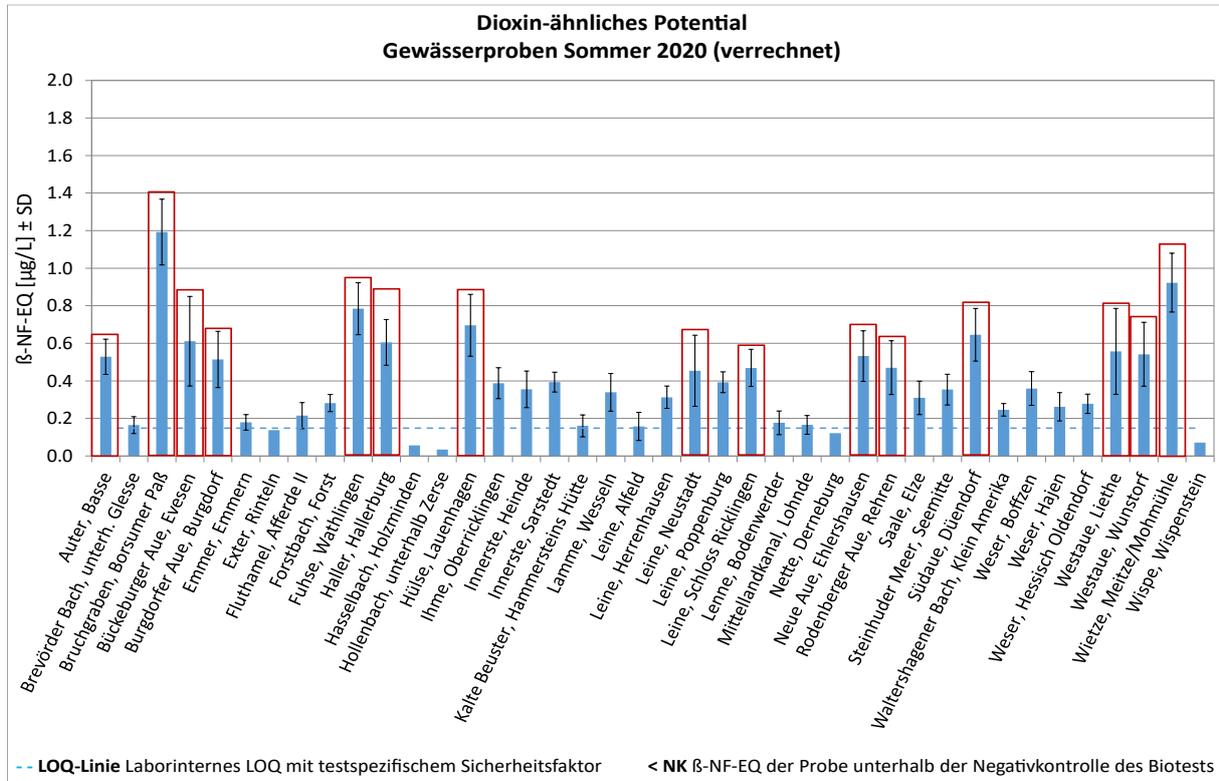


Abb. 11: Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YDS-Test dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der β -Naphthoflavin-Äquivalente (β -NF-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($>3 \cdot \text{LOQ}$) Äquivalentkonzentration.

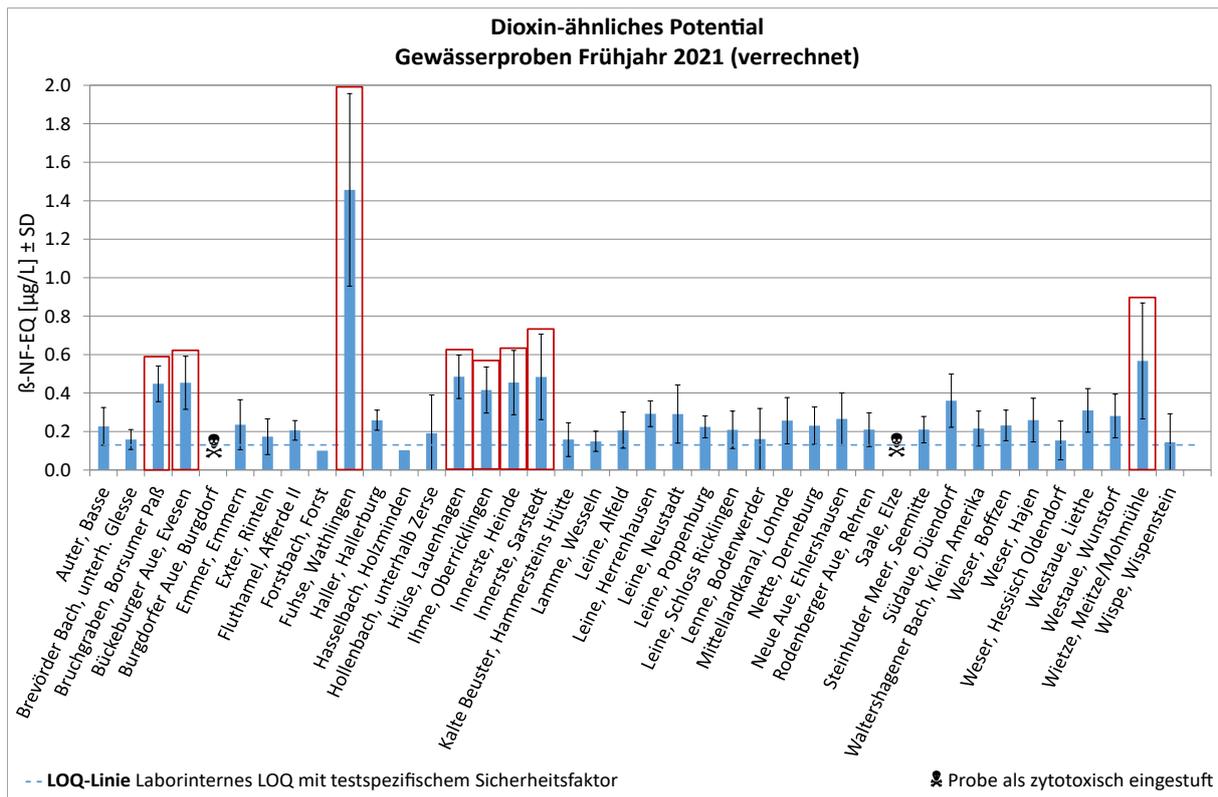


Abb. 12: Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 in YDS-Test dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der β -Naphthoflavon-Äquivalente (β -NF-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($>3 \cdot \text{LOQ}$) Äquivalentkonzentration.

3.2 Bakterienbasierte *in vitro*-Tests zur Erfassung mutagener und gentoxischer Substanzen

Zur Erfassung mutagener bzw. gentoxischer Substanzen werden die in der Festphasenextraktion 10.000-fach angereicherten Extrakte der Oberflächengewässerproben in den Ames-Tests und den umu-Tests eingesetzt.

Der Ames-Test ist ein *in vitro*-Biotest, bei dem sogenannte Histidin-Mangelmутanten des gentechnisch veränderten Bakteriums *Salmonella typhimurium* verwendet werden. Zur Beurteilung der Mutagenität wurde der Stamm TA98 verwendet, welcher eine Rasterschubmutation nachweist, sowie der Stamm TA100, welcher eine Basenpaarsubstitution nachweist. Diese Mangelmутanten zeigen in Anwesenheit mutagen wirkender Substanzen gehäuft Rückmutationen, welche über einen Farbumschlag von lila zu gelb und die Messung der optischen Dichte bei 420 nm nach 48 Stunden Inkubation angezeigt wird.

Entsprechend der Anreicherungsfaktoren in **Tab. 2** wurde generell eine 40-fach und bei Bedarf eine 20-fach und 10-fach angereicherte Gewässerprobe (Verdünnungsstufe 1, 2 und 3; VS1, VS2 und VS3) analysiert und bewertet.

Zudem wurden die Extrakte mithilfe des Umu-Tests auf ihr erbgutveränderndes Potential untersucht. Dieser Test wird mit dem Stamm TA 1535/pSK 1002 des Bakteriums *Salmonella typhimurium* durchgeführt. Bei diesem Stamm ist die Induktionsrate des umuC-Gens (Teil des Reparaturmechanismus der Zelle) mit dem lacZ-Gen für die β -Galactosidase gekoppelt, sodass durch einen Farbumschlag indirekt die Induktion des umuC-Gens und somit eine DNA-Schädigung angezeigt wird.

3.2.1 Mutagenität durch Rasterschubmutationen (Ames TA98)

Die Extrakte wurden generell bei 40-facher Anreicherung getestet und auf Mutagenität geprüft. Für den Stamm TA98 wurde als Positivkontrolle

4-Nitro-Phenylenediamine (4-NOPD, CAS 99-56-9, Reinheit 98%, Sigma Aldrich) verwendet.

Sowohl für die Probenahme im Sommer 2020 als auch für die Probenahme im Frühjahr 2021 konnte im Ames mit dem Stamm TA98 keine Mutagenität in den untersuchten Gewässerproben der verschiedenen Standorte festgestellt werden.

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

3.2.2 Mutagenität durch Basenpaarsubstitutionen (Ames TA100)

Die Extrakte für den Ames-Test mit dem Stamm TA100 wurden ebenfalls generell bei 40-facher Anreicherung getestet und auf Mutagenität geprüft. Im Ames-Test mit dem Stamm TA100 wurde die Positivkontrolle Nitrofurantoin (NF; Antibiotikum; CAS 67-20-9; Sigma Aldrich PHR1191) verwendet.

Die untersuchten Gewässerproben der Probenahme Sommer 2020 der verschiedenen Standorte waren in den höchsten Anreicherungsstufen nicht mutagen. Die Gewässerproben Exter (Rinteln), Leine (Neustadt) und Leine (Poppenburg) zeigten eine erhöhte Anzahl an Revertanten und wurden deshalb nochmals in 10-facher und 5-facher Verdünnungsstufe wiederholt gemessen. Hier zeigte sich wiederum eine erhöhte Anzahl an Revertanten für die Gewässerproben Exter (Rinteln) und Leine (Poppenburg), welche laut der

OECD 471 jedoch noch nicht als mutagen eingestuft wird (Tab. 3). Dennoch wurden beide Proben im Ames TA100 als kritisch eingeschätzt.

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

3.2.3 Erbgutveränderndes Potential im Umu-Test (TA 1535/pSK1002)

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

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

Tab. 3: Mutagenität entsprechend den Resultaten der Ames-Tests mit den *Salmonella*-Stämmen TA98 und TA100 für die je 40 Gewässerproben der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 bei 40-facher Anreicherung. *Validitätskriterium der Positivkontrolle mit mind. 25 von 48 Wells mit Revertantenwachstum nicht erfüllt

Gewässer, Messstelle	Mutagenität					
	Sommer 2020			Frühjahr 2021		
	Ames TA98	Ames TA100	Mutagenität	Ames TA98	Ames TA100	Mutagenität
Auter, Basse	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Brevörder Bach, unterhalb Glesse	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Bruchgraben, Borsumer Paß	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Bückeburger Aue, Evesen	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Burgdorfer Aue, Burgdorf	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Emmer, Emmern	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Exter, Rinteln	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch	nein*	nein	nein
Fluthamel, Afferde II	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Forstbach, Forst	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Fuhse, Wathlingen	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Haller, Hallerburg	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Hasselbach, Holzminden	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Hollenbach, unterhalb Zerse	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Hülse, Lauenhagen	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Ihme, Oberricklingen	nein	nein	nein	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch
Innerste, Heinde	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Innerste, Sarstedt	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Kalte Beuster, Hammersteins Hütte	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Lamme, Wesseln	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Leine, Alfeld	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Leine, Herrenhausen	nein	nein	nein	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch
Leine, Neustadt	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Leine, Poppenburg	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch
Leine, Schloss Ricklingen	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Gewässer, Messstelle	Mutagenität					
	Sommer 2020			Frühjahr 2021		
	Ames TA98	Ames TA100	Mutagenität	Ames TA98	Ames TA100	Mutagenität
Lenne, Bodenwerder	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Mittellandkanal, Lohnde	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Nette, Derneburg	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Neue Aue, Ehlershausen	nein	nein	nein	nein	kritisch	nein, TA100 kritisch
Rodenberger Aue, Rehren	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Saale, Elze	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Steinhuder Meer, Seemitte	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Südaue, Düendorf	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Waltershagener Bach, Klein Amerika	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Weser, Boffzen	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Weser, Hajen	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Weser, Hessisch Oldendorf	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Westaue, Lieth	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Westaue, Wunstorf	nein	nein	nein	nein*	nein	nein
Wietze, Meitze/Mohmühle	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Wispe, Wispenstein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

3.3 Mikrokern-Test zur Erfassung gentoxischer Substanzen

Zur Erfassung gentoxischer Substanzen werden die in der Festphasenextraktion 10.000-fach angereicherten Extrakte der Oberflächengewässerproben in den Mikrokern-Test eingesetzt. Der Mikrokern-Test wurde mit Hep-G2 Zellen (humane Leberkarzinomzellen; ACC-180 DSMZ) durchgeführt und erfasst Chromosomenschäden und andere Störungen während der Mitose der Zellen, die durch Substanzen wie Benzo(a)pyren oder Zytostatika wie Mitomycin C ausgelöst werden können. Diese Substanzen bewirken, dass Chromosomenbruchstücke bei der Zellteilung nicht in die entstehenden Tochterzellkerne verteilt werden und einzeln im Chromatin verbleiben. Als Positivkontrolle wurde Ethylmethansulfonat (EMS, CAS 62-50-0 Merck) verwendet.

Die Zellen werden bei diesem Test auf Objektträger eingesät und für 24 Stunden mit drei verschiedenen Verdünnungsstufen (VS1, VS2, VS3) des Probenextrakts in Einfach- bis Doppelbestimmung exponiert. Nach anschließender Fixierung und Färbung werden die Anzahl der Mikrokern pro 1.000 Zellen sowie die Anzahl der Zellklone pro 1.000 Zellen (Mitoseindex) mikroskopisch ausgewertet. Mit steigender Konzentration gentoxischer Substanzen in der Probe steigt die Anzahl an Mikrokernen.

Entsprechend der Anreicherungsfaktoren in **Tab. 2** wurden die Gewässerproben 10-fach, 5-fach und 2,5-fach angereichert analysiert und bewertet. Die Anzahl an Mikrokernen/1000 Zellen wurde als erhöht eingestuft, wenn der Mittelwert pro Verdünnungsstufe signifikant höher im Vergleich zur Negativkontrolle (Fisher-Test, $p < 0,05$) war und der Mittelwert größer als die Spannweite der instituts-

internen historischen Negativkontrollen war. Proben wurden als gentoxisch eingestuft, wenn sich auch in der höchsten Verdünnungsstufe noch eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Mikrokernen feststellen ließ. Proben wurden als kritisch eingestuft, wenn in den Verdünnungsstufen VS1 und VS2 eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen festzustellen war, nicht aber in der höchsten Verdünnungsstufe VS3 oder eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen festgestellt wurde, die Bewertung aber schwierig war (z.B. aufgrund eines zu niedrigen Mitoseindex).

Der Mitoseindex bzw. die Zellteilung kann als Qualitätsparameter für die Durchführung des Tests herangezogen werden. Wenn die Ergebnisse des Tests nicht auswertbar waren (zu wenig zählbare Zellen) oder die Validitätskriterien bei positiven Befunden nicht erfüllt wurden, wurde dies entsprechend kenntlich gemacht.

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

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

Gewässer, Messstelle	Sommer 2020				Frühjahr 2021			
	Anzahl Mikrokern / 1.000 Zellen			GT	Anzahl Mikrokern / 1.000 Zellen			GT
	VS1	VS2	VS3		VS1	VS2	VS3	
Auter, Basse	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	n.a.	nicht erhöht	
Brevörder Bach, unterhalb Glesse	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Bruchgraben, Borsumer Paß	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Bückeburger Aue, Evesen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.	
Burgdorfer Aue, Burgdorf	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	erhöht	erhöht	
Emmer, Emmern	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Exter, Rinteln	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Fluthamel, Afferde II	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.	
Forstbach, Forst	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	erhöht*	
Fuhse, Wathlingen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Haller, Hallerburg	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Hasselbach, Holzminden	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Hollenbach, unterhalb Zerse	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.	
Hülse, Lauenhagen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.	
Ihme, Oberricklingen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	nicht erhöht*	erhöht*	
Innerste, Heinde	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		cytotoxisch	cytotoxisch	cytotoxisch	
Innerste, Sarstedt	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht	erhöht	nicht erhöht	
Kalte Beuster, Hammersteins Hütte	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht	nicht erhöht	erhöht	
Lamme, Wesseln	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Leine, Alfeld	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	nicht erhöht	n.a.	
Leine, Herrenhausen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	erhöht*	erhöht*	
Leine, Neustadt	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Leine, Poppenburg	erhöht	erhöht	erhöht		nicht erhöht*	erhöht	erhöht	
Leine, Schloss Ricklingen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	nicht erhöht*	nicht erhöht*	
Lenne, Bodenwerder	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Mittellandkanal, Lohnde	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	erhöht*	erhöht*	
Nette, Derneburg	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Neue Aue, Ehlershausen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Rodenberger Aue, Rehren	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.	
Saale, Elze	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Steinhuder Meer, Seemitte	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	
Südaue, Düendorf	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht	

Gewässer, Messstelle	Sommer 2020				GT	Frühjahr 2021			GT
	Anzahl Mikrokerne / 1.000 Zellen			GT		Anzahl Mikrokerne / 1.000 Zellen			
	VS1	VS2	VS3			VS1	VS2	VS3	
Waltershagener Bach, Klein Amerika	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		
Weser, Boffzen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		
Weser, Hajen	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	erhöht*	erhöht*		
Weser, Hessisch Oldendorf	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		
Westaue, Liethe	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		
Westaue, Wunstorf	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		
Wietze, Meitze/Mohmühle	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		erhöht*	erhöht	nicht erhöht		
Wispe, Wispenstein	nicht erhöht	nicht erhöht	nicht erhöht		n.a.	n.a.	n.a.		

	Gentoxizität nicht nachweisbar		gentoxisch
	kritisch		cytotoxisch

4 Identifizierung von Oberflächengewässer für ein fokussiertes Monitoring

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Gewässerproben der 40 Messstellen der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 ist in **Tab. 5** dargestellt. Die Auswahl der für ein fokussiertes (chemisches) Monitoring identifizierter Gewässerproben wurde wie folgt vorgenommen:

- a) Proben mit hohen, seltenen oder zytotoxischen Nachweisen hormonaktiver Potentiale:
 - Östrogenes Potential (YES):
 - Bückeburger Aue (Evesen)
 - Hülse (Lauenhagen)
 - Ihme (Oberricklingen)
 - Wietze (Meitze/Mohmühle)
 - Anti-östrogenes Potential (YAES):
 - Burgdorfer Aue (Burgdorf)
 - Rodenberger Aue (Rehren)
 - Androgenes Potential (YAS, seltene Nachweise)
 - Fuhse (Wathlingen)
 - Kalte Beuster (Hammersteins Hütte)
 - Westaue (Liethe)
 - Dioxin-ähnliches Potential (YDS):
 - Auter (Basse)
 - Bruchgraben (Borsumer Paß)
 - Bückenburger Aue (Evesen)
 - Burgdorfer Aue (Burgdorf)
 - Fuhse (Wathlingen)
 - Haller (Hallerburg)
 - Hülse (Lauenhagen)
 - Ihme (Oberricklingen)
 - Innerste (Heinde)
 - Innerste (Sarstedt)
 - Leine (Neustadt)
 - Leine (Schloss Ricklingen)
 - Neue Aue (Ehlershausen)
 - Rodenberger Aue (Rehren)
 - Saale (Elze)
 - Südaue (Düendorf)
 - Westaue (Liethe)
 - Westaue (Wunstdorf)
 - Wietze (Meitze/Mohmühle)
- b) Proben mit mutagenen bzw. kritischen Ergebnissen in den Ames-Tests:
 - Exter (Rinteln)
 - Ihme (Oberricklingen)
 - Leine (Herrenhausen)
 - Leine (Poppenburg)
 - Neue Aue, Ehlershausen
- c) Proben mit gentoxischen bzw. kritischen Ergebnissen im Mikrokern-Test
 - Burgdorfer Aue (Burgdorf)
 - Ihme (Oberricklingen)
 - Innerste (Heinde)
 - Innerste (Sarstedt)
 - Kalte Beuster (Hammersteins Hütte)
 - Leine (Herrenhausen)
 - Leine (Poppenburg)
 - Leine (Schloss Ricklingen)
 - Mittellandkanal (Lohnde)
 - Weser (Hajen)
 - Wietze (Meitze/Mohmühle)
- d) häufige Nachweise (≥ 6 Nachweise):
 - Fuhse (Wathlingen)
 - Hülse (Lauenhagen)
 - Ihme (Oberricklingen)
 - Leine (Herrenhausen)
 - Leine (Poppenburg)
 - Neue Aue (Ehlershausen)
 - Wietze (Meitze/Mohmühle)

Auf Grundlage dieser Auswahl wurden 23 Probenahmestellen ausgewählt, für die eine weitere fokussierte Untersuchung empfohlen wird (**Tab. 5**, farbig hervorgehoben).

Insgesamt zeigt sich, dass östrogenes sowie dioxinähnliches Potential für fast alle Messstellen nachgewiesen wurde. Anti-östrogenes Potential wurde für Sommer 2020 für 8 Messstellen und für Frühjahr 2021 für 6 Messstellen nachgewiesen. Androgenes Potential wurde lediglich für 3 verschiedenen Messstellen nachgewiesen, während anti-androgenes Potential in keiner Probe nachgewiesen wurde.

Hinweise auf mutagenes Potential zeigten sich für die Probenahme 2020 nur im Test mit den Stamm TA100 für die Proben von Exter (Rinteln) und Leine (Poppenburg). Für die Probenahme 2021

gab der Ames-Test mit TA100 ebenfalls Hinweise auf mutagenes Potential für die Probenahmestelle Leine (Poppenburg), sowie für die Probenahmestellen Hülse (Lauenhagen), Leine (Herrenhausen) und Neue Aue (Ehlershausen). Im umu-Test mit TA 1535/pSK1002 wurden keine erbgutverändernden Potentiale identifiziert.

Hinweise auf gentoxisches Potential wurde mit dem Mikrokern-Test für 2020 und für 2021 in der Probe Leine (Poppenburg) nachgewiesen, sowie 2021 für die Proben der Messstellen Burgdorfer Aue (Burgdorf), Ihme (Oberricklingen), Innerste (Heinde), Innerste (Sarstedt), Kalte Beuster (Hammersteins Hütte), Leine (Herrenhausen), Mittelkanal (Lohnde), Weser (Hajen) und Wietze (Meitze/Mohmühle). Auf die Messstelle Leine (Poppenburg) ist dabei besonderes Augenmerk zu legen, da hier sowohl für die Proben vom Sommer 2020 als auch für die Probe vom Frühjahr 2021 mutagenes (Ames-Test) und gentoxisches (Mikrokern-Test) Potential festgestellt wurde.

Positiv hervorzuheben ist die Messstellen Hasselbach (Holzminden). Hier wurde weder in der Probe vom Sommer 2020 noch in der Probe vom Frühjahr 2021 endokrines, mutagenes oder gentoxisches Potential nachgewiesen. Dies ist vermutlich auf die Lage und geringe anthropogene Beeinflussung im fast ausschließlich forstlich geprägten Einzugsgebiet im Naturpark Solling-Vogler zurückzuführen. Auch die Messstellen Hollenbach (unterhalb Zerse) zeigte, mit Ausnahme eines leicht erhöhten dioxinähnlichen Potentials bei der Probe vom Frühjahr 2021, keine auffälligen Befunde. In den Proben der Probenahmestellen Brevörder Bach (unterhalb Glesse) und Waltershagener Bach (Klein Amerika) wurde zwar für beide Probenahmekampagnen ein moderates dioxinähnliches Potential festgestellt. In den weiteren Tests konnte aber auch hier kein endokrines, mutagenes oder gentoxisches Potential nachgewiesen werden.

4.2 Vergleich der Ergebnisse der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021

Neben der Identifizierung von Messstellen mit endokrinem, mutagenem und gentoxischem Potential sind bei der Ergebnisbetrachtung auch eventuelle saisonale Unterschiede von Interesse. So können vor allem klimatischen Bedingung wie er-

höhter Niederschlag (erhöhter Eintrag von landwirtschaftlichen Flächen, Siedlungsflächen etc.) oder Trockenperioden (verminderte Verdünnung von Abwässern) einen Einfluss auf den Stoffeintrag und die Konzentration von Schadstoffen haben. In den Sommermonaten können höhere Temperaturen zu einem stärkeren biologischen Abbau von Substanzen, durch schnellere Metabolisierungsraten der abbauenden Gemeinschaften, führen (Jürgens et al., 2002) und eine intensivere Sonneneinstrahlung den photolytischen Abbau beschleunigen (Leech et al., 2009).

Beim Vergleich der Ergebnisse hinsichtlich saisonaler Unterschiede ist zunächst anzumerken, dass die Proben der Probenahmen vom Sommer 2020 und Frühjahr 2021 auch in zwei verschiedenen Testdurchläufe analysiert wurden. Dabei ist zu beachten dass die Vergleichbarkeit der Äquivalentkonzentrationen der Hefereportergergen-Tests zwischen zwei verschiedenen Testdurchläufen (hier: Vergleich der zwei verschiedenen Probenahmen) trotz Standardisierung des Testdurchlaufs weniger belastbar ist als der Vergleich der Äquivalentkonzentrationen innerhalb eines Testdurchlaufes (hier Vergleich der Messstellen). Daher wird beim Vergleich der Ergebnisse der zwei Probenahmen im Hefereportergergen-Tests auf relative Unterschiede im Vergleich zum testspezifischen LOQ eingegangen und keine absoluten Äquivalentkonzentrationen verglichen.

Ein eindeutiger saisonaler Trend, der für alle der durchgeführten Tests beobachtet werden kann, konnte bei der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Bei den Hefetests für östrogenes Potential (YES), anti-androgenes Potential (YAAS) und dioxinähnliches Potential (YDS) sowie beim Ames-Test zur Überprüfung auf mutagenes Potential mit dem Stamm TA98 bestätigen die Ergebnisse der Proben des Frühjahrs 2021 die Ergebnisse der Proben vom Sommer 2020 größtenteils. Bei YES und YAS wurde für den überwiegenden Teil der Proben (YES: 28/40, YDS: 32/40), für die 2020 ein östrogenes/dioxin-ähnliches Potential festgestellt wurde auch für 2021 ein östrogenes/dioxin-ähnliches Potential festgestellt. Für 5/40 (YES) bzw. 1/40 (YDS) Proben für die 2020 kein östrogenes/dioxin-ähnliches Potential festgestellt wurde, wurde auch 2021 kein östrogenes/dioxin-ähnliches Potential festgestellt. Für den geringeren Anteil der Probenahmestellen unterschieden sich die Ergebnisse von YES (7/40) bzw.

YDS (6/40) zwischen den im Sommer 2020 und Frühjahr 2021 genommenen Wasserproben. Diese Unterschiede unterliegen aber keinem eindeutigen saisonalen Trend. Für den Test auf antiandrogenes Potential (YAAS) konnte weder für 2020 noch für 2021 Potentiale in den Proben nachgewiesen werden.

Für die Tests auf anti-östrogenes Potential und androgenes Potential unterscheiden sich 13/40 bzw. 3/40 Messstellen zwischen 2020 und 2021, ein saisonaler Trend kann aber auch hier nicht eindeutig identifiziert werden.

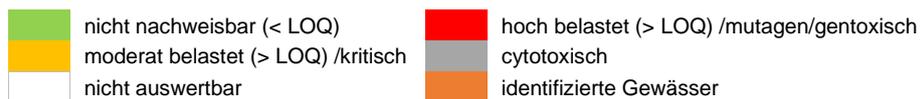
Für die Tests auf mutagenes Potential mit dem Stamm TA100 sowie den Mikrokern-Test konnten für 2021 deutlich mehr Befunde mit Hinweis auf mutagenes/genotoxisches Potential festgestellt werden als für 2020.

Zusammenfassend konnten keine eindeutigen Trends zwischen 2020 und 2021 festgestellt werden. Anzumerken ist dabei, dass weder Kenntnisse über die Nutzung im Einzugsgebiet des Gewässers oberhalb der Messstelle sowie der unmittelbaren Umgebung der Messstellen, sowie die vorherrschende Witterung im Untersuchungszeitraum sowie das Wetter unmittelbar vor der Probenahme, mit in die Betrachtung einbezogen wurden. Diese Faktoren können im Jahresverlauf einen entscheidenden Einfluss auf den Eintrag von Stoffen in Gewässer und den Abbau im Gewässer haben und sollten für die weitergehende Auswertung, vor allem der Proben mit auffälligen Befunden, hinzugezogen werden.

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

Gewässer, Messstelle	Hefereportergergen-Tests										Ames-Tests				MN-Test	
	YES		YAES		YAS		YAAS		YDS		TA98		TA100		20	21
	20	21	20	21	20	21	20	21	20	21	20	21				
Auter, Basse	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
Brevörder Bach, unterhalb Glesse	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
Bruchgraben, Borsumer Paß	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
Bückeburger Aue, Evesen	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
Burgdorfer Aue, Burgdorf	Yellow	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Grey	Green	Green	Green	Green	Green	Red
Emmer, Emmern	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Exter, Rinteln	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
Fluthamel, Afferde	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Forstbach, Forst	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Fuhse, Wathlingen	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Haller, Hallerburg	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Hasselbach, Holzminden	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Hollenbach, unterhalb Zerse	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Hülse, Lauenhagen	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green
Ihme, Oberricklingen	Yellow	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
Innerste, Heinde	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Grey

Gewässer, Messstelle	Hefereportergergen-Tests										Ames-Tests				MN-Test	
	YES		YAES		YAS		YAAS		YDS		TA98		TA100		20	21
	20	21	20	21	20	21	20	21	20	21	20	21	20	21		
Innerste, Sarstedt																
Kalte Beuster, Hammersteins Hütte																
Lamme, Wesseln																
Leine, Alfeld																
Leine, Herrenhausen																
Leine, Neustadt																
Leine, Poppenburg																
Leine, Schloss Ricklingen																
Lenne, Bodenwerder																
Mittellandkanal, Lohnde																
Nette, Derneburg																
Neue Aue, Ehlershausen																
Rodenberger Aue, Rehren																
Saale, Elze																
Steinhuder Meer, Seemitte																
Südaue, Düendorf																
Waltershagener Bach, Klein Amerika																
Weser, Boffzen																
Weser, Hajen																
Weser, Hessisch Oldendorf																
Westaue, Liethe																
Westaue, Wunstorf																
Wietze, Meitze/Mohmühle																
Wispe, Wispenstein																



4.3 Schlussfolgerungen

Die Durchführung der Probenahmekampagne an 40 Gewässern und die anschließende Extraktion sowie Durchführung der Biotests mit den Gewässerproben war erfolgreich. Die Proben konnten in Hinblick auf endokrine, mutagene und größtenteils auch genotoxische Potentiale untersucht und eingeschätzt werden.

Insgesamt wurden die folgenden 23 Probenahmestellen identifiziert, auf welche sich weitere Untersuchungen fokussieren sollten:

Bruchgraben (Borsumer Paß), Bückeburger Aue (Evesen), Burgdorfer Aue (Burgdorf), Exter (Rinteln), Fuhse (Wathlingen), Hülse (Lauenhagen), Ihme (Oberricklingen), Innerste (Heinde), Innerste (Sarstedt), Kalte Beuster (Hammersteins Hütte), Leine (Herrenhausen), Leine (Poppenburg), Leine (Schloss Ricklingen), Mittellandkanal (Lohnde), Neue Aue (Ehlershausen), Rodenberger Aue (Rehren), Saale (Elze), Steinhuder Meer (See mitte), Südaue (Düendorf), Weser (Hajen), Westaue (Lieth), Westaue (Wunstorf), Wietze (Meitze/Mohmühle).

Anzumerken ist, dass es sich im vorliegenden Bericht um das Ergebnis von lediglich zwei Stichproben je Probenahmestelle handelt. Diese Ergebnisse können zwar einen ersten Eindruck der möglichen Belastungen geben, aber nicht die tatsächliche Belastungssituation abbilden. So können kleinräumige Wetterereignisse wie Starkniederschlagsereignisse, einen erheblichen Einfluss auf die Belastungssituation im Gewässer haben. Neben Kenntnis der Wetter- und Witterungsbedingungen ist die Einbeziehung detaillierter Kenntnis über die Landnutzung im Einzugsgebiet des Gewässers oberhalb der Probenahmestellen für ein fokussiertes Monitoring von großer Bedeutung.

Nach dem Abgleich der Ergebnisse des effektbasierten Monitorings durch die chemische Analytik sollten für Probestellen mit Befunden daher mögliche Punktquellen sowie diffuse Eintragspfade für Substanzen mit endokrinem, mutagenen und genotoxischen Potential abgeklärt werden. Eine abschließende Bewertung der Eignung der in dieser Studie durchgeführten Biotests für ein effektbasiertes Monitoring kann erst nach den Ergebnissen der chemischen Analyse getroffen werden. Derzeit werden die Proben aller Messstellen chemisch untersucht, wobei der Fokus auf Stoffen bzw. Stoffgruppen mit einer endokrinen Wirkung

liegt (Hormone, Weichmacher, Alkylphenole und Organozinnverbindungen). Die Ergebnisse werden separat veröffentlicht.

Danksagung

Die Autoren möchten Lea Hilbert, Maren van Riel und Shari Reckmann für die Unterstützung der mikroskopischen Bewertung der Mikrokerntests, sowie Annika Stoll, Alina Treffenfeld und Juliane

Isler für die Unterstützung bei der Durchführung der Biotests danken.

Literatur

- Andreeva-Gateva, P., Bakalov, D., Sabit, Z., & Tafradjiiska-Hadjiolova, R. (2020). Aryl hydrocarbon receptors as potential therapeutic targets. *Pharmacia*, 67, 311.
- Brack, W., Aissa, S. A., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B. I., Faust, M., ... & Altenburger, R. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-6.
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 309-334.
- ISO 11350:2012 Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water - Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test).
<https://iso.org/standard/50393.html>
- ISO 19040-1:2018 Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*).
<https://iso.org/standard/64450.html>
- ISO 21427-2:2006 Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei (Micronucleus test).
<https://iso.org/standard/39681.html>
- Jürgens, M. D., Holthaus, K. I., Johnson, A. C., Smith, J. J., Hetheridge, M., & Williams, R. J. (2002). The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(3), 480-488.
- Könemann, S., Kase, R., Simon, E., Swart, K., Buchinger, S., Schlüsener, M., ... & Carere, M. (2018). Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 225-235.
- Kunz, P. Y., Simon, E., Creusot, N., Jayasinghe, B. S., Kienle, C., Maletz, S., ... & Vermeirssen, E. L. (2017). Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: evaluation of five in vitro bioassays. *Water research*, 110, 378-388.
- Leech, Dina M., Matthew T. Snyder, and Robert G. Wetzel. "Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17 β -estradiol in water." *Science of the Total Environment* 407.6 (2009): 2087-2092.
- OECD Test No. 471 (2020). Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
<https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- OECD Test No. 487 (2016). In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
<https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>

Schubert, S., Rosolowski, J.M., Jungmann, D., (2019). Schadstoffe - Ermittlung von Belastungspfaden Teil: Biotests für ein effektbasiertes Monitoring. Abschlussbericht. Auftraggeber: Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie LfULG, über GWT TUD GmbH

Vermeirssen, E. (2018). Vortrag "Standardisierung der Datenanalyse von *in vitro* Biotests - Beispiel Östrogene Wirkung YES", Ökotoxzentrum, Dübendorf.

Vermeirssen, E. (2021): Biotests in der aquatischen Ökotoxikologie - Fallbeispiele aus der Schweiz. Vortrag im Hydrobiologischen Seminar, TU Dresden

Völker, J., Castronovo, S., Wick, A., Ternes, T. A., Joss, A., Oehlmann, J., & Wagner, M. (2016). Advancing biological wastewater treatment: extended anaerobic conditions enhance the removal of endocrine and dioxin-like activities. *Environmental science & technology*, 50(19), 10606-10615.

Anhang

Tab. A-1: Übersicht der 40 Probenahmestellen der Routineprobenahmen des NLWKN im Sommer 2020 und Frühjahr 2021

Gewässer	Messstelle	Probenahme-Daten	
		Sommer 2020	Frühjahr 2021
Auter	Basse	19.08.2020	10.03.2021
Brevörder Bach (Glesse)	unterhalb Glesse	25.08.2020	08.03.2021
Bruchgraben	Borsumer Paß	27.08.2020	09.03.2021
Bückeburger Aue	Evesen	19.08.2020	09.03.2021
Burgdorfer Aue	Burgdorf	01.09.2020	04.03.2021
Emmer	Emmern	25.08.2020	15.03.2021
Exter	Rinteln	19.08.2020	10.03.2021
Fluthamel	Afferde II	25.08.2020	15.03.2021
Forstbach	Forst	25.08.2020	08.03.2021
Fuhse	Wathlingen	26.08.2020	23.03.2021
Haller	Hallerburg	27.08.2020	09.03.2021
Hasselbach	Holzminden	25.08.2020	08.03.2021
Hollenbach	unterhalb Zerse	19.08.2020	09.03.2021
Hülse	Lauenhagen	19.08.2020	09.03.2021
Ihme	Oberblicklingen	06.08.2020	08.03.2021
Innerste	Sarstedt	01.09.2020	04.03.2021
Innerste	Heinde	20.08.2020	04.03.2021
Kalte Beuster	Hammersteins Hütte	20.08.2020	04.03.2021
Lamme	Wesseln	20.08.2020	04.03.2021
Leine	Alfeld	27.08.2020	09.03.2021
Leine	Schloss Ricklingen	06.08.2020	08.03.2021
Leine	Herrenhausen	06.08.2020	08.03.2021
Leine	Neustadt	06.08.2020	08.03.2021
Leine	Poppenburg	06.08.2020	08.03.2021
Lenne	Bodenwerder	25.08.2020	08.03.2021
Mittellandkanal	Lohnde	06.08.2020	08.03.2021
Nette	Derneburg	27.08.2020	09.03.2021
Neue Aue	Ehlershausen	01.09.2020	04.03.2021
Rodenberger Aue	Rehren	19.08.2020	09.03.2021
Saale	Elze	27.08.2020	09.03.2021
Steinhuder Meer	Seemitte	10.08.2020	30.03.2021
Südaue	Düendorf	06.08.2020	08.03.2021
Waltershagener Bach	Klein Amerika	10.08.2020	15.03.2021

Gewässer	Messstelle	Probenahme-Daten	
		Sommer 2020	Frühjahr 2021
Weser	Hessisch Oldendorf	19.08.2020	10.03.2021
Weser	Boffzen	25.08.2020	08.03.2021
Weser	Hajen	25.08.2020	15.03.2021
Westaue	Liethe	06.08.2020	08.03.2021
Westaue	Wunstorf	19.08.2020	10.03.2021
Wietze	Meitze/Mohmühle	01.09.2020	04.03.2021
Wispe	Wispenstein	27.08.2020	09.03.2021