

DER ÖSTROGENISIERUNG DER UMWELT AUF DER SPUR

WIRKPROFILE ÖSTROGEN-AKTIVER SUBSTANZEN IN KOMMUNALEM ABWASSER

Mikroverunreinigungen stellen eine Problematik im heutigen Gewässerschutz dar. Zu den Mikroverunreinigungen zählen auch östrogen-aktive Substanzen. Mit dem Testverfahren planar-YES wurden zwanzig Zürcher ARA auf östrogen-aktive Substanzen untersucht. Die Resultate der Studie werden nachfolgend vorgestellt.

Andreas Schönborn*, Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen, ZHAW

Tamara Mainetti; Andrea Grimmer, Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen, ZHAW

Edith Durisch-Kaiser; Dieter Sennhauser, Abteilung Gewässerschutz, Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL)

RÉSUMÉ

SUR LES TRACES DE L'ŒSTROGÉNISATION – PROFILS D'ACTION DES SUBSTANCES À ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE DANS LES EAUX USÉES

La qualité de l'eau dans les cours d'eaux suisses s'est fortement améliorée ces 50 dernières années, principalement en raison du haut niveau de technicité de l'assainissement et de la purification des eaux usées. Actuellement, la protection des eaux est entre autres confrontée avec la problématique des micropolluants. Parmi ces micropolluants, on compte également les substances à activité œstrogénique, p. ex. l'estrone (E1), l'œstradiol 17 β (E2) et l'éthinyl estradiol 17 (EE2), lesquelles sont déjà problématiques à de très faibles concentrations dans les cours d'eau. Le Centre Ecotox a ainsi proposé une valeur d'écotoxicité aiguë de 0,4 ng/l pour les perturbateurs endocriniens. Cette étude se base sur 20 différentes installations d'purification des eaux (ARA) du canton de Zurich par le biais du planar-Yeast Estrogen Screen (planar-YES), lequel combine chromatographie sur couche mince et biotest. Dans seulement quatre échantillons d'eaux usées, aucune substance à activité œstrogénique n'a été détectée; toutefois la moitié des 24 échantillons a détecté une activité œstrogénique supérieure à la valeur seuil de 0,4 ng/l lag. Le nombre maximal de substances à activité œstrogénique était de 8 et celles-ci ont été détectées dans l'effluent du traitement primaire. Dans l'effluent des traitements secondaires, le nombre de substances à activité œstrogénique était de 6 et dans l'affluent après filtration de 5.

EINLEITUNG

Östrogene sind äusserst wichtig für die Regulation der Fortpflanzung bei Wirbeltieren und Menschen. So haben beispielsweise Fische und Menschen, obschon sie seit 350 Millionen Jahre getrennte Wege in der Evolution gehen, fast dieselben Östrogenrezeptoren. Aufgrund dieser Ähnlichkeit können menschliche Östrogene auf Fische wirken (und wahrscheinlich auch umgekehrt). Es ist erwiesen, dass Fische auf erhöhte Konzentrationen von Östrogenen oder östrogen-wirksamen Stoffen in ihrer Umgebung reagieren, wie zum Beispiel im Bereich einer Abwassereinleitung. Männliche Fische bilden dort vermehrt Eierstockzellen aus [1]. Diese werden als «Intersex»-Formen bezeichnet und sind tendenziell unfruchtbar. Seit Beginn der 1990er-Jahre wird darüber diskutiert, welche Rolle dieses Phänomen – in der Fachsprache «endokrine Disruption» – für das Überleben anderer Tierarten und des Menschen spielt.

Heute gelangen Hunderte von östrogen-aktiven Stoffen durch uns Menschen in die Umwelt. Neben den natürlichen Östrogenen aus unserem Stoffwechsel und dem unserer Nutztiere gehören dazu die synthetischen Östrogene (Empfängnisverhütung) sowie eine Vielzahl sogenannter Xeno-, Phyto- und Mykoöstrogene (Box 1). Manche Mediziner bringen diese «Östrogenisierung» unserer Umwelt in Verbindung mit der abnehmenden Frucht-

* Kontakt: andreas.schoenborn@zhaw.ch

barkeit von Männern [2], mit Hoden- und Prostatakrebs [3] und der zunehmenden Brustkrebsrate von Frauen [4]. Wissenschaftlich bewiesen ist dies bisher nicht, aber die Diskussion hat dazu geführt, dass bei drei Östrogenen heute EU-weit über Grenzwerte diskutiert wird.

In der Schweiz sind Abwasserreinigungsanlagen (ARA) wichtige Punktquellen für den Eintrag östrogen-aktiver Stoffe in die Gewässer [5, 6]. Ihre Messung ist mit der heutigen ausgefeilten hochauflösenden chemischen Analytik zwar möglich, aber sehr teuer und aufwendig. Ausserdem hat diese «stoffliche» Analytik den Nachteil, dass man in der Regel nur die Substanzen identifiziert, nach denen man auch sucht. Für eine dauernde Überwachung, von z. B. ARA, ist diese Art der Analytik aus den genannten Gründen weniger gut geeignet. Ausserdem gelangen aufgrund der rasanten technischen Entwicklung ständig neue Substanzen in die Umwelt. Es wäre also sinnvoll, die stoffliche Analytik mit einem Verfahren zu ergänzen, das als Frühwarninstrument dienen kann, möglichst einfach und auch relativ günstig ist und auf Gefahrenpotenziale unbekannter Substanzen hinweist.

Ein potenzielles Frühwarninstrument für östrogen-aktive Verbindungen ist der planar-YES (*Yeast Estrogen Screen*), der seit einigen Jahren an der ZHAW [7] und an anderen Orten [8, 9] entwickelt wird. Das Herzstück dieses Biotests ist ein gentechnisch veränderter Hefestamm, dem ein menschlicher Östrogenrezeptor

eingepflanzt wurde [10]. Im vorliegenden Projekt wurde der planar-YES erstmalig systematisch zur wirkungsbasierten Analyse von 20 ARA im Kanton Zürich eingesetzt. Anhand dieser Messungen kann gezeigt werden, dass mit der planar-YES-Methode auf relativ einfache Weise Informationen zur Östrogenaktivität von Abwasserproben gewonnen werden können und dass erste Aussagen über die verursachenden Stoffe möglich sind.

PLANAR-YES-METHODE

Der planar-YES beruht auf einem Konzept, das Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (HPTLC) mit einem Biotest verbindet – in diesem Fall mit dem *Yeast Estrogen Screen*, kurz YES. Beide Technologien sind an sich nicht neu. Die HPTLC existiert seit den 1970er-Jahren [11], der YES wurde Anfang der 1990er-Jahre entwickelt [10, 12]. Ihre Verknüpfung für die wirkungsbasierte Analytik wurde bereits im Jahr 2004 vorgeschlagen [13]. Seit 2010 wurde an der ZHAW und in anderen Labors [z. B. 7, 8, 9, 14] der planar-YES jedoch stark vereinfacht und zur Anwendungsreife gebracht.

Durch die Kombination dieser beiden Methoden können die verschiedenen in der Probe enthaltenen östrogen-aktiven Substanzen getrennt und separat analysiert werden. Somit wird die Östrogenaktivität der verschiedenen Komponenten sichtbar. Die herkömmlichen Biotests dagegen resultieren nur in einem Signal zur gesamten Östrogenität. Diese Grund-

DEFINITIONEN

- **Natürliche Östrogene:**
Die wichtigsten weiblichen Sexualhormone aus der Klasse der Steroidhormone wie z. B. Östron (E1), Östradiol (E2), Östriol (E3), Östetrol (E4).
- **Synthetische Östrogene:**
Eingesetzt zur Empfängnisverhütung, z. B. Ethinylöstradiol, Mestranol.
- **Xenoöstrogene:**
Generelle Bezeichnung für Stoffe, die östrogen-wirksam sind, selbst aber keine Östrogene sind. Dazu gehören künstliche Substanzen (z. B. PCB, BPA und Phthalate) sowie natürliche Substanzen (Phyto- und Mykoöstrogene).
- **Phytoöstrogene:**
Sekundäre Pflanzenstoffe (wie Isoflavone), die östrogen-wirksam sind, z. B. Genistein, Daidzein, Coumestrol.
- **Mykoöstrogene:**
Stoffe aus Pilzen, die östrogen-wirksam sind, z. B. Zearalenon, Zearalenol.

lage, der geringere Zeitaufwand und die höhere Empfindlichkeit sind grosse Vorteile gegenüber dem klassischen YES [12] und dem LYES (YES unterstützt durch die Aktivität des Enzyms Lyticase, [15]), die oft für die Detektion von östrogen-aktiven Substanzen in wässrigen Proben genutzt werden.

Figur 1 zeigt schematisch den planar-YES-Verfahrensablauf, wie er in diesem Projekt eingesetzt wurde. Im Detail wird die Methodik in [14] beschrieben.

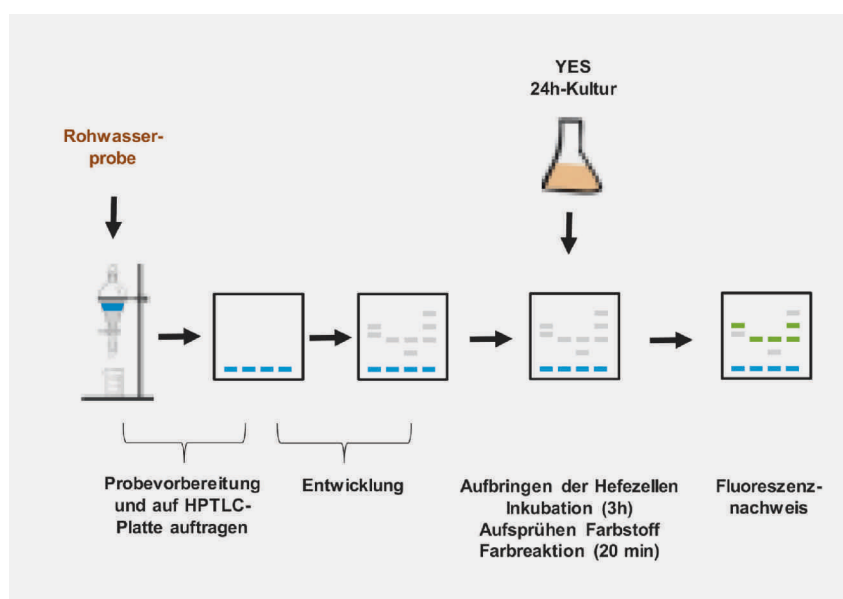


Fig. 1 Ablaufschema des planar-YES, wie er in diesem Projekt eingesetzt wurde.
Schéma opérationnel du planar-YES, tel qu'il a été utilisé dans ce projet.

PROBENVORBEREITUNG UND ENTWICKLUNG

Die 24-Stunden-Sammelproben (jeweils auf zwei aufeinanderfolgende Tage aufgeteilt) aus den ausgewählten ARA wurden gekühlt in das Labor transportiert. Die östrogen-aktiven Substanzen wurden aus der unfiltrierten Probe mittels Flüssigflüssig-Extraktion (nach [9], abgewandelt nach [16]) isoliert und um den Faktor 138 aufkonzentriert. Sie lagen danach als in Ethanol gelöste Extrakte vor. Von diesen wurden jeweils 30 µl mit einem Auftragegerät (*ATS-4, Camag*) in 8 mm breiten Banden auf 10 × 20 cm HPTLC-Platten (*Si60, Merck*) aufgetragen und getrocknet. Die Platten wurden anschliessend mit einer automatischen Entwicklungskammer (*ADC2, Camag*) mit dem Laufmittelmisch Chloroform:Aceton:Petrolether (55:20:25, v/v) auf 7,5 cm Höhe entwickelt und erneut getrocknet.

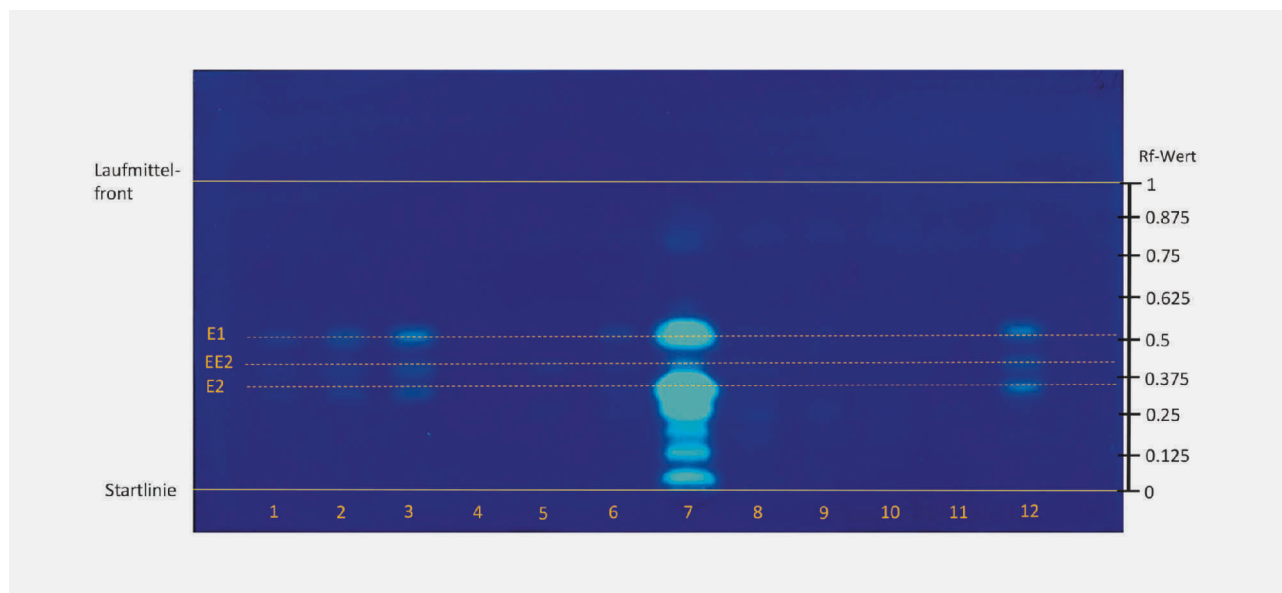


Fig. 2 Typische HPTLC-Platte nach planar-YES. Alle fluoreszierenden Banden (vertikal gestaffelte Fluoreszenzsignale) zeigen östrogene Aktivität an. Im Bereich unter der Startlinie sind die verschiedenen Bahnen eingetragen. Die Bahnen sind wie folgt zusammengesetzt: Bahnen 1-3: E2-, E1- und EE2-Standards in verschiedenen Konzentrationen; Bahn 4: Leerprobe; Bahnen 5-10: Abwasserproben; Bahn 7: Abwasserprobe, ARA BL Ablauf Vorklä rung; Bahnen 11 und 12: Verfahrenskontrolle der Extraktion.

Plaque HPTLC typique selon le Planar-YES. Toutes les bandes fluorescentes (signaux fluorescents échelonnés verticalement) montrent l'activité œstrogénique. Les trajets sont indiqués sous la ligne de départ et se présentent comme suit: trajet 1-3: standards E2-, E1- et EE2 dans différentes concentrations; trajet 4: échantillon témoin; trajets 5-10: échantillons des eaux usées; trajet 7: échantillon eaux usées STEP BL prétraitement d'évacuation; trajets 11 et 12: contrôle du procédé d'extraction.

HEFEN AUFTRAGEN, INKUBIEREN, FARBREAKTION

Die entwickelten HPTLC-Platten wurden mit einer YES-Hefesuspension (Stamm: McDonnel [10]) mit definierter Zelldichte besprüht, in eine Box gelegt und dicht verschlossen für drei Stunden bei 30 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert (Fig. 1). Nach Abschluss der Hefeinkubation wurden die Platten mit einem Föhn vorsichtig getrocknet und dann mit einem in lacZ-Puffer gelösten Indikatorfarbstoff besprüht. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei 37 °C fluoreszieren östrogen-aktive Banden unter UV-Licht.

AUSWERTUNG

Nach der Farbreaktion wurden die HPTLC-Platten in einem Reprügerät unter UV-Licht (366 nm) fotografiert (Visualizer, Camag) und mittels Bildauswertungssoftware ausgewertet (VideoScan, Camag). Die Figur 2 zeigt das typische Ergebnis einer entwickelten HPTLC-Platte nach Abschluss des planar-YES. Die mittels Dünnschicht-Chromatografie aufgetrennten Stoffe liegen als sog. «Banden» vor, die im Fall von östrogenen Aktivität fluoreszieren. Auf den Bahnen 1-3 wurden die drei Östrogene E1 (Östron), E2 (17 β -Östradiol) und EE2 (17 α -Ethinylöstradiol) in verschiedenen Konzentrationen als Referen-

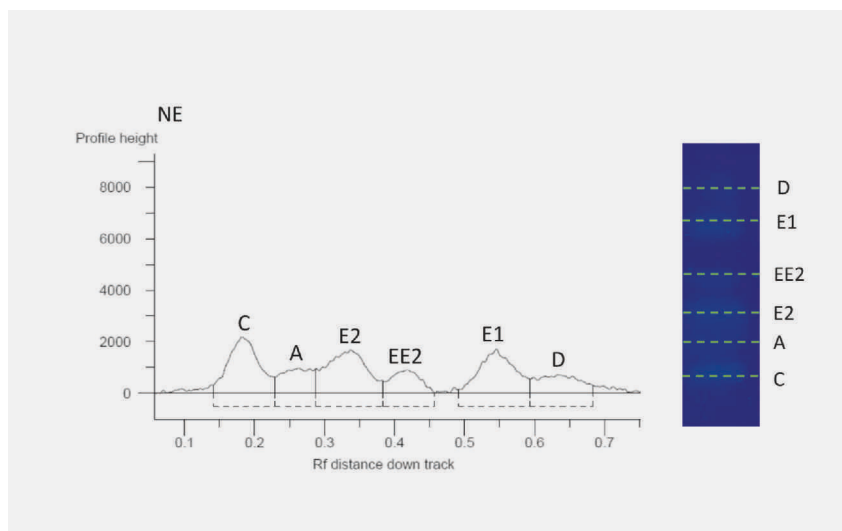


Fig. 3 Chromatogramm der ARA NE. Auf der x-Achse ist der Rf-Wert und auf der y-Achse die Peakhöhe aufgetragen. Sechs östrogen-aktive Substanzen konnten nachgewiesen werden. Durch den Rf-Wert konnten die Substanzen E1, E2 und EE2 zugeordnet werden. Die restlichen Peaks (A, C und D) konnten keiner bestimmten Substanz zugewiesen werden. Auf der rechten Seite ist die entwickelte Probe mit den fluoreszierenden Banden D, E1, EE2, E2, A und C angeführt.

Chromatogramme de la STEP NE. La valeur Rf est indiquée sur l'axe x et la hauteur de pic sur l'axe y. 6 substances à activité oestrogénique ont pu être démontrées. Les substance E1, E2 et EE2 ont pu être attribuées par la valeur Rf. Les autres pics (A, C et D) n'ont pas eu de substances attribuées. L'échantillon avec les trajets fluorescents D, E1, EE2, E2, A et C est indiqué sur la partie de droite.

zen aufgetragen. Der substanzspezifische Rf-Wert (Retentionsfaktor) der Standards lässt Rückschlüsse auf die stoffliche Zu-

sammensetzung von unbekanntem Proben zu. Pro Bahn wird das Wirkprofil in Form eines Chromatogramms erstellt.

Aus der Fluoreszenzintensität der drei E2-Standards wird eine Eichgerade ermittelt, mit deren Hilfe die östrogene Aktivität der Banden bestimmt werden kann.

QUANTIFIZIERUNG

Die Intensität der Fluoreszenz einer Bande entspricht der Fläche des entsprechenden Peaks im Chromatogramm (Fig. 3). Mithilfe der E2-Eichgerade lässt sich nun aus dem detektierten Peak ein Östrogenäquivalent (EEQ) berechnen, sofern die Peakfläche innerhalb des Messbereichs liegt. Die Peakfläche ist dabei proportional zur Intensität der Fluoreszenz, welche wiederum proportional zum EEQ-Wert ist. Aus dem EEQ-Wert lässt sich mittels Konzentrationsfaktor, Wiederfindung und eingesetztem Volumen die EEQ-Konzentration in der Probe berechnen (Tab. 1). Peakflächen, die ausserhalb der Eichgerade liegen, können nicht quantifiziert werden.

Beim EEQ handelt es sich um ein Wirkäquivalent, nicht um eine Stoffmenge. Die Stoffmenge kann nur ermittelt werden, wenn (i) der betrachtete Peak den Rf-Wert einer bekannten Substanz hat, und (ii) die relative östrogene Potenz (REP) dieser Substanz im planar-YES bekannt ist. Da die meisten Xenööstrogene eine sehr viel tiefere Affinität (mindestens 1000 × geringer) zum Östrogenrezeptor haben als E2, müssen ihre Konzentrationen entsprechend höher sein, um dasselbe Wirkungssignal zu erzeugen. Der häufig gefundene Weichmacher Bisphenol-A hat zum Beispiel im planar-YES eine REP von ungefähr 0,0001 (Erfahrungswert). Ein EEQ von 0,1 ng/l entspräche damit einer BPA-Konzentration von 1 µg/l.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den Ablaufwässern von 16 der 20 untersuchten Zürcher ARA wurde östrogene Aktivität detektiert. Die Summe der EEQ betrug bei diesen 16 Anlagen zwischen 0,1 und 2,6 ng/l (Fig. 4, Tab. 2). Bei 11 der 20 Anlagen lag der EEQ über 0,4 ng/l, dem Richtwert, den das Ökotoxzentrum der Schweiz als zulässige durchschnittliche Jahreskonzentration (AA-EQS) für 17β-Östradiol vorschlägt [17]. Die meisten östrogen-aktiven Banden (acht) wurden im Ablauf Vorklärung der ARA 20 (BL 1.1) gefunden. Im ARA-Ablauf war die ARA 13 (NE) mit sechs verschiedenen östrogen-aktiven Banden der Spitzenreiter. Die einzelnen Ergebnisse der 20 ARA sind

in Tabelle 2 zusammengefasst und in die EEQ-Werte in Fig. 4 dargestellt.

Die 20 untersuchten Zürcher ARA weisen sehr unterschiedliche Abwasserbelastungen und sehr verschiedene östrogene Aktivitäten auf (Fig. 4). Sehr deutlich ist die Abweichung bei den grössten Symbolen. Es ist zu beachten, dass bei einigen der untersuchten ARA die Probenahme nicht der finalen Reinigungsstufe entspricht (* in Fig. 4). Dies aufgrund von Ozonungsversuchen (ARA BL), die nicht

dem Normalbetrieb entsprechen. Bei einigen ARA mit einer Abwasserbelastung von 10 000–50 000 EW ist jedoch trotz Filtration eine höhere östrogene Aktivität im ARA-Ablauf messbar (z.B. FH in Fig. 5).

Die Fig. 5 zeigt die 20 Proben (von 16 ARA), die Östrogenaktivitäten aufweisen. Es ist ersichtlich, dass die Intensität der Fluoreszenz wie auch die Grösse der Bande stark variieren können. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Konzentration

Konzentration Probenwasser	0,06	ng/l E2*
Konzentrationsfaktor LLE	138	–
Wiederfindung	90	%
E2 Konzentration	7,0	ng/l E2
	7,0 E-09	g/l E2
Eingesetztes Volumen	30	µl
	0,00003	l
Entsprechende Masse E2	2E-13	g
LOQ _{min} (Masse/Bande)	0,2	pg

* vorgeschlagener AA-EQS für E2: 0,4 ng/l (Ökotoxzentrum)

Tab. 1 Empfindlichkeit des planar-YES / Sensibilité du planar-YES

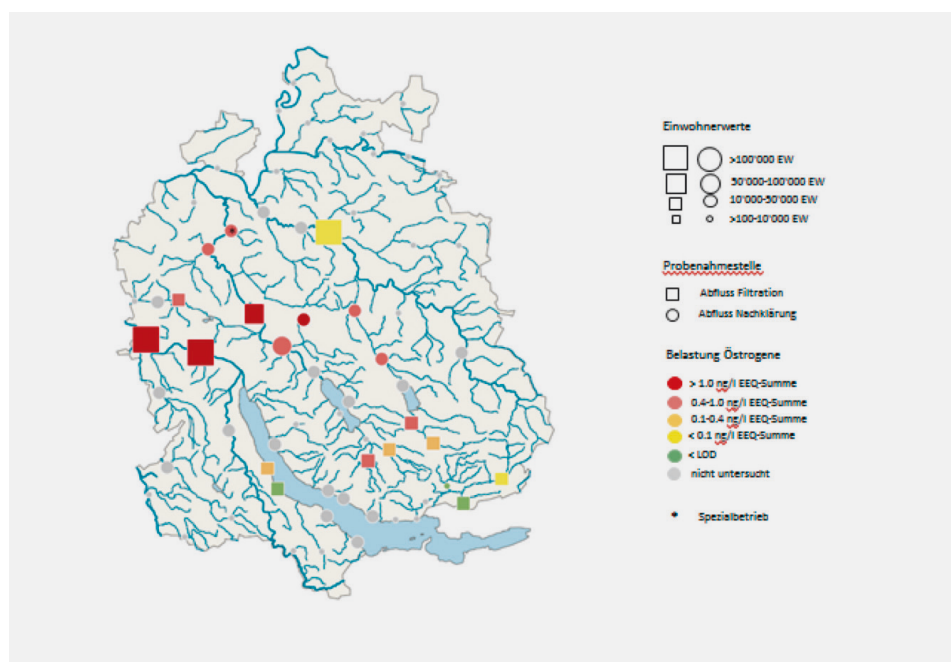


Fig. 4 Belastung des gereinigten Abwassers (aus entweder Ablauf Nachklärung oder Ablauf Filtration) von 20 untersuchten Zürcher ARA mit östrogen-aktiven Substanzen. Die Symbolgrösse entspricht der mittleren Abwasserbelastung der jeweiligen Zürcher ARA in Einwohnerwerten (EW) im Betriebsjahr 2015. Die ARA mit grauen Symbolen wurden nicht beprobt. Bei der ARA, die mit einem * versehen ist, stammen die Proben entweder nicht aus der finalen Reinigungsstufe oder die Probe stammt aus einem Testversuch (Ozonungsversuche), der vom Normalbetrieb abweicht.

Charge des eaux usées purifiées (effluent traitement secondaire ou traitement par filtration) de 20 STEP zurichoises avec substances à activité oestrogénique. La taille du symbole correspond à la charge moyenne des eaux usées de la STEP zurichoise en équivalent habitants durant l'exercice 2015. Les STEP avec des symboles gris n'ont pas été testées. Dans les STEP marquées d'un *, les échantillons ne provenaient pas de l'étape finale d'épuration ou provenaient d'un essai de test (tests à l'ozone), qui diffère de l'exploitation normale.

ARA Nr.	ARA	Ort Probenahme	Wetterlage ¹⁾	Probenanzahl	Anzahl ÖA-Banden	EEQ (ng/l) Summe
1	RT	AF	TW/TW/TW	1	–	< LOD
2	WL	AF	TW/TW/TW	1	1	< LOQ _{min}
3	DR	AF	TW/TW/TW	1	–	< LOD
4a	DB	NK	TW/RW/RW	2	3	0,7
4b	DB	AF	TW/RW/RW	2	1	0,9
5	BS	NK	TW/RW/RW	1	3	2,0
6	KO	AF	TW/RW/RW	1	3	2,6
7	WR	AF	TW/RW/RW	1	5	2,3
8	TA	AF	TW/TW/TW	1	4	0,8
9	HR	AF	TW/TW/TW	1	–	< LOD
10	IL	NK	RW/RW/RW	1	5	0,4
11	WN	AF	RW/RW/RW	1	4	0,1
12	RG	AF	RW/TW/TW	1	3	0,7
13	NE	NK	RW/TW/TW	1	6	0,7
14	DE	AF	RW/TW/TW	1	5	1,4
15	EG	AF	TW/TW/RW	1	1	0,4
16	GS	AF	TW/TW/RW	1	1	0,4
17	WT	AF	TW/TW/RW	1	2	0,4
18	HN	AF	TW/TW/TW	1	2	0,2
19	FH	NK	TW/TW/RW	1	4	0,6
20 a	BL 1	VK	TW/TW/TW	2	max. 8	>LOQ _{max}
20 b	BL 2	NK	TW/TW/TW	2	max. 5	0,7
20 c	BL 3*	O	TW/TW/TW	2	2	0,2
20 d	BL 4*	OF	TW/TW/TW	2	2	< LOQ _{min}

Tab. 2 Die EEQ-Summen im Ablauf von entweder Nachklärung (NK), Filtration (AF), Ozonung (O) oder Ozonung und Sandfilter (OF) der beprobten ARA; ÖA = Östrogene Aktivität; LOD = Nachweisgrenze (Level of detection); LOQ_{max} = obere Messgrenze (LOQ = Level of quantification); LOQ_{min} = untere Messgrenze; *Die Probenahme stammt aus einem speziellen Versuch, bei dem verschiedene zusätzliche Reinigungsstufen getestet wurde und entspricht nicht dem normalen Betrieb dieser ARA. 1) Niederschlag gemessen an der Station Kloten, Kt. Zürich, am Tag vor der Probenahme/am Tag 1 der Probenahme/am Tag 2 der Probenahme [19]. TW = Trockenwetter; RW= Regenwetter

Les sommes EEQ soit dans l'effluent du traitement secondaire (TS), de la filtration F), de l'ozonation (O) ou de l'ozonation et du filtre à sable (OF) des STEP analysées; AOe = activité œstrogénique; LOD = limite de détection (Level of detection); LOQ_{max} = limite de mesure supérieure (LOQ = Level of quantification); LOQ_{min} = limite de mesure inférieure; *L'échantillonnage provient d'un essai spécial où des étapes supplémentaires de purification ont été testées ne correspondant pas à l'exploitation normale de cette STEP. 1) Précipitations mesurées à la station de Kloten, canton de ZH, la veille de l'échantillonnage/au jour 1 de l'échantillonnage/au jour 2 de l'échantillonnage [19]. TW = temps sec; RW= temps de pluie

der östrogen-aktiven Substanzen (hohe Konzentration = starke Intensität und grosse Bande). Die untere Messgrenze (LOQ) des planar-YES liegt bei 0,2 pg E2 pro Bande, was bei der angewendeten Methodik (Tab. 1) einer Konzentration von 0,06 ng/l E2 entspricht. Der Messbereich liegt zwischen 0,2 pg und ca. 10 pg E2 pro Bande. Die für die Analyse auf HPTLC-Platten aufgetragenen Volumina lassen sich zwischen 1 µl und 100 µl variieren. Die in den ARA-Abläufen detektierten östrogenen Aktivitäten sind anhand ihres Rf-Werts auf mindestens sechs verschiedene Substanzen zurückzuführen (Fig. 3). Drei davon können den bekannten Östrogenen E1, E2 und EE2 zugeordnet werden. Die Ursache der restlichen drei Aktivitätsbanden sind unbekannt.

Um die Ursache dieser unbekanntenen Aktivitäten zu ermitteln, müssten Versuche mit weiteren Standardsubstanzen durchgeführt werden.

Mittels der Chromatogramme können die Aktivitätsprofile verglichen werden (Fig. 6). Somit ist es möglich, verschiedene ARA miteinander zu vergleichen und auch die zeitliche Veränderung der Östrogenaktivität innerhalb der gleichen ARA nachzuerfolgen. Dank dieser Eigenschaft konnten tägliche Schwankungen in der östrogenen Aktivität im Abwasser aufgelöst werden (Fig. 6). Die Ursache dieser Variationen ist bislang nicht bekannt. Häufig sind jedoch unterschiedliche Belastungen am Wochenende und an Werktagen auf ARA erkennbar [20]. Der Anteil an Gewerbe- und Industrieab-

wasser könnten zwischen diesen Tagen in der untersuchten ARA schwanken und die tieferen Konzentrationen in der Sonntagsprobe verursachen.

Die Aktivitätsprofile sind damit geeignet, die Leistungsfähigkeit verschiedener Reinigungsstufen von ARA bezüglich des Abbaus östrogenen Wirkstoffe zu untersuchen. Dies konnte am Beispiel der ARA BL gezeigt werden (Fig. 7). Sowohl die Massen (= Peakflächen) als auch die Anzahl an östrogen-aktiven Substanzen nahmen entlang der Abwasserreinigung ab. Durch die Ozonung konnte die Anzahl der östrogen-aktiven Substanzen von fünf (Ablauf NK) auf zwei (Ablauf OF) und die Summe der EEQ von 0,69 ng/l (Ablauf NK) auf 0,11 ng/l (Ablauf OF) verringert werden. Der finale Sandfilter nach der

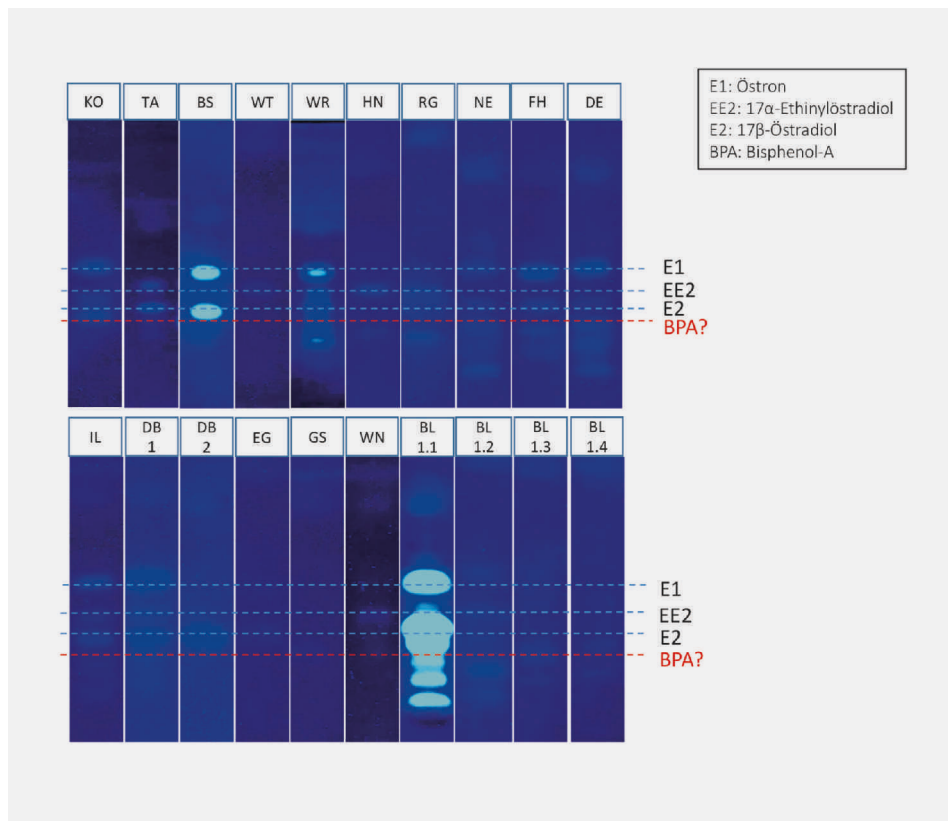


Fig. 5 Zusammenstellung der Aktivitätsprofile der untersuchten ARA, in deren Abläufen östrogene Aktivität gefunden wurde. Die gestrichelten Linien zeigen die Rf-Werte einiger bekannter Substanzen an, die wahrscheinlich (E2, EE2, E1) bzw. möglicherweise (BPA) für die messbaren Banden verantwortlich sind. Alle Fotos wurden mit identischer Kameraeinstellung fotografiert. Um die optische Sichtbarkeit der Banden zu erhöhen, wurde der Kontrast der Fotos für diesen Artikel mittels Bildbearbeitung erhöht.

Etablissement des profils d'activité des STEP analysées, dans les effluents desquelles a été détectée une activité œstrogénique. Les lignes pointillées montrent les valeurs Rf de quelques substances connues, lesquelles sont probablement responsables (E2, EE2, E1) soit éventuellement (BPA) pour les trajets mesurés. Toutes les photos ont été faites avec des réglages identiques de l'appareil. Afin d'augmenter la visibilité des trajets, le contraste des photos a été augmenté pour cet article.

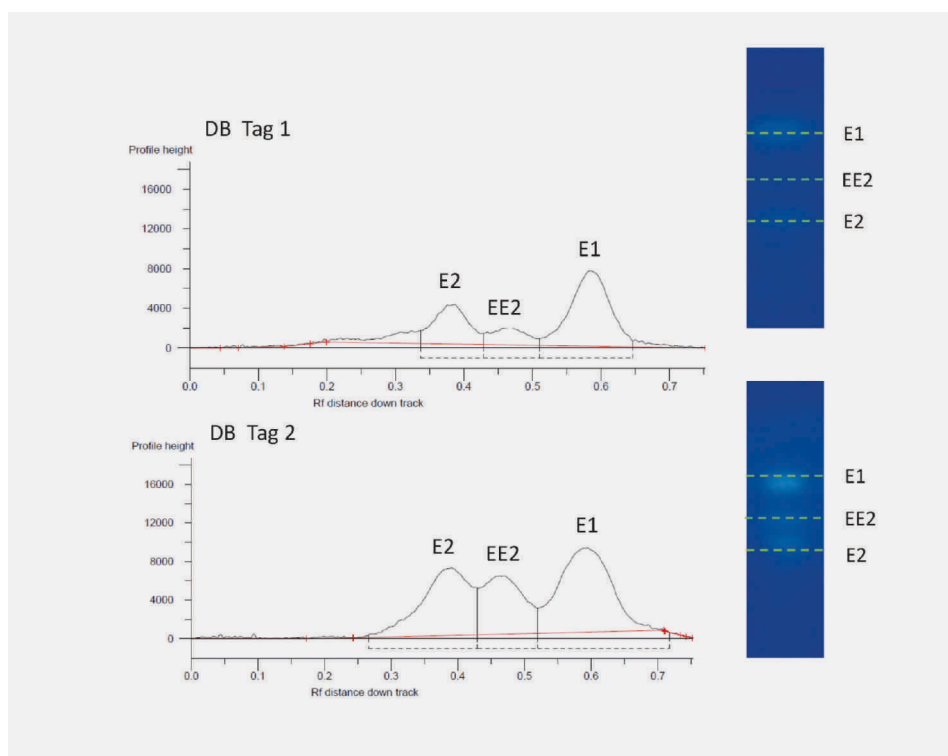


Fig. 6 Chromatogramme der ARA DB aus dem Ablauf Nachklärung. Das obere Chromatogramm stammt von einer 24-h-Mischprobe, die am Sonntag gezogen wurde. Das untere Chromatogramm repräsentiert eine Montagsprobe. Es ist zu erkennen, dass die Sonntagsprobe kleinere Konzentrationen aufweist als die Montagsprobe. Am rechten Rand sind die Ausschnitte der jeweiligen Probe auf der HPTLC-Platte nach dem planar-YES abgebildet.

Chromatogramme de la STEP DB pour l'effluent du traitement secondaire. Le chromatogramme supérieur provient d'un échantillon composite sur 24h prélevé le dimanche. Le chromatogramme inférieur représente un échantillon du lundi. L'échantillon du dimanche montre une plus faible concentration que celui du lundi. Sur le bord droit se trouvent les découpes de l'échantillon sur la plaque de HPTLC selon le planar-YES.

Ozonung verursachte keinen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration und Anzahl der detektierten östrogenaktiven Substanzen. Im Ablauf von «Ozonung und Sandfilter» (OF) war damit noch östrogene Aktivität zu finden, die keinen bisher bekannten Substanzen zugeordnet werden kann.

FAZIT UND AUSBLICK

In dieser Studie wurde mit dem planar-YES im Ablauf von 16 der 20 untersuchten Zürcher ARA mindestens je eine östrogenaktive Substanz nachgewiesen (Tab. 2, Fig. 4), in 14 der 20 ARA sogar zwei Substanzen oder mehr. Die EEQ-

Werte der einzelnen detektierten Substanzen lagen im Ablauf Nachklärung zwischen «knapp über der Nachweisgrenze» bis 1,6 ng/l EEQ (ARA KO). Die höchste Summe aller Aktivitäten lag bei 2,6 ng/l EEQ (ARA KO). Im Ablauf der ARA NE konnten die meisten östrogenaktiven Substanzen (sechs) detektiert

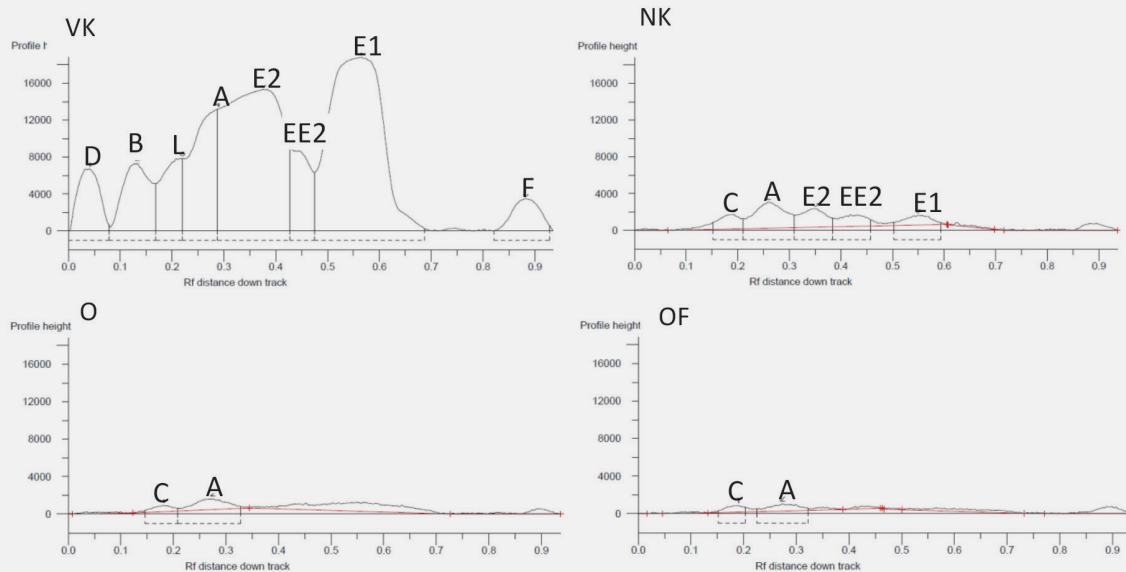


Fig. 7 Aktivitätsprofile nach verschiedenen Reinigungsstufen in der ARA BL. VK: Ablauf Vorklärung; NK: Ablauf Nachklärung; O: Ablauf Ozonung ohne Filtration; OF: Ablauf Ozonung und Sandfilter. A, C, D, F und L sind unbekannte östrogen-aktive Substanzen. Im Ablauf Vorklärung sind acht östrogen-aktive Substanzen detektiert worden, wovon drei den Substanzen E1, E2 und EE2 zugewiesen werden konnten. Im Ablauf Nachklärung wurden fünf östrogen-aktive Substanzen nachgewiesen. Zwei dieser Substanzen sind unbekannt (A und C). Im Ablauf Ozonung (O) wurden zwei unbekannte östrogen-aktive Substanzen gefunden (A und C), wobei die EEQ der Substanz C unter dem LOQ liegt. Der nachgeschaltete Sandfilter verringert die EEQ der Substanz A so weit, dass diese nun unter dem LOQ liegt.

Profils d'activité après différentes étapes de purification dans la STEP BL. VK: l'effluent du prétraitement; NK: effluent du traitement secondaire; O: effluent d'ozonation sans filtration; OF: effluent d'ozonation et filtre à sable. A, C, D, F et L sont des substances inconnues à activité oestrogénique. Dans l'effluent du prétraitement, 8 substances à activité oestrogénique ont été détectées, parmi lesquelles 3 ont pu être attribuées aux substances E1, E2 et EE2. Dans l'effluent du traitement secondaire, 5 substances à activité oestrogénique ont pu être prouvées. Deux de ces substances sont inconnues (A et C). Dans l'effluent d'ozonation (O) ont été trouvées deux substances à activité oestrogénique inconnues (A et C), où l'EEQ de la substance C se situe au-dessous du LOQ. Le filtre de sable diminue le EEQ de la substance A à tel point que celle-ci se situe désormais sous le LOQ.

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AF	Filtration
ARA	Abwasserreinigungsanlagen
BPA	Bisphenol A
E1	Östron
E2	17β-Östradiol
EE2	17α-Ethinylöstradiol
EEQ	Östrogenäquivalent
EW	Einwohnerwerte
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie
LOQ	Messgrenze
LYES	YES, unterstützt durch die Aktivität des Enzyms Lyticase
MS	Massenspektroskopie
NK	Nachklärung
O	Ozonung
OF	Ozonung und Sandfilter
planar-YES	planar-Yeast Estrogen Screen
REP	relative östrogene Potenz
Rf	Retentionsfaktor
RW	Regenwetter
TW	Trockenwetter

werden. Drei dieser sechs Substanzen wurden anhand ihres Rf-Wertes den Östrogenen E1, E2 und EE2 zugeordnet, die anderen drei sind unbekannt.

Der planar-YES erlaubt es, östrogene Aktivitätsprofile zu erstellen und anhand der Profilmuster zu verfolgen, wie sich diese bezüglich der Zusammensetzung von östrogen-aktiven Substanzen und deren Konzentration über einen bestimmten Zeitraum verändern (Fig. 6). Damit lässt sich unter Umständen die Ursache solcher Veränderungen herausfinden, z. B. wenn es sich um Xenooestrogene aus einer industriellen Aktivität handeln sollte. Die gewonnenen Aktivitätsprofile eignen sich auch, um die Leistung der verschiedenen Reinigungsstufen von ARA in Bezug auf östrogen-aktive Substanzen zu überprüfen. Dies wird insbesondere für die Überwachung der Ozonung interessant. Am Beispiel der ARA BL konnten wir zeigen, dass eine Ozonung nach der Nachklärung zur deutlichen Reduktion östrogen-aktiver Substanzen führt, dass aber trotz dieser Massnahme (Ozonung und nachgeschalteter Sandfilter) noch ein Rest östrogenen Aktivität im Ablauf verblieb. Es wäre interessant, dieses Phänomen in einem Folgeprojekt genauer anzusehen.

Um die exakte Ursache einer gefundenen östrogenen Aktivität zu bestimmen, ist eine Kopplung des planar-YES mit chemischer Spurenanalytik notwendig. Entsprechende Geräteschnittstellen zur Kopplung von Dünnschichtchromatografie mit Massen-

DANK

Wir danken *Urs Holliger* (AWEL) für das Erstellen der GIS-Grafik und *Dominik Refardt* (ZHAW) herzlich für die Unterstützung bei der Datenauswertung sowie *Sarah Bräm* und *Evelyn Wolfram* (ZHAW) für die inspirierende Zusammenarbeit in Laborfragen.

spektroskopie (MS) sind auf dem Markt verfügbar. Ihre grundlegende Einsetzbarkeit ist in der Literatur belegt [9] und wurde auch durch Untersuchungen an der ZHAW bestätigt (unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Schwierigkeit dabei ist aber, dass der planar-YES je nach Substanz bereits Massen detektieren kann, die bis zu 10 000-mal geringer sind als es mittels MS möglich ist. Die natürlichen Östrogene sowie jene, die in Verhütungsmitteln vorkommen, haben eine sehr hohe Bindungsfähigkeit an den im YES-Testsystem vorhandenen Östrogenrezeptor. Sie erzeugen deshalb schon in tiefsten Konzentrationen ein fluoreszierendes Signal. Andere Stoffe, wie z. B. gewisse Weichmacher aus Plastik, binden viel schwächer an den Östrogenrezeptor. Ein sichtbares Fluoreszenzsignal wird dort erst durch deutlich höhere Konzentrationen erzeugt, die im Messbereich der gängigen chemischen Analytik liegen. Für die Identifikation dieser Stoffe ist die erwähnte Kopplung also ein mögliches Werkzeug.

Der planar-YES ist ein Beispiel für eine neuartige Gruppe von ökotoxikologischen Tests. Er erlaubt im Unterschied zu den bestehenden etablierten YES-Varianten eine Differenzierung der gefundenen Wirkaktivitäten und bietet gleichzeitig eine Schnittstelle zur chemischen Analytik an. Das Testkonzept lässt sich ohne allzu grossen Aufwand auf weitere Steroid-Hormone ausweiten (z. B. Androgene). Wir sind überzeugt davon, dass sich die grosse Palette an Stoffen, die wir Menschen in die Umwelt entlassen, mit solchen Werkzeugen in Zukunft besser

und einfacher überwachen lässt, als allein mit der chemischen Analytik. Sie können auch wertvolle Beiträge zur weiteren Entwicklung der 4. Reinigungsstufe, z. B. zur Evaluation der Ozonung, leisten.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Jobling, S. et al. (1998): *Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. Environ. Sci. Technol.*, 32 (17), pp 2498–2506
- [2] Pflieger-Bruss, S.; Schuppe, H.-C.; Schill, W.-B. (2004): *The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. Andrologia*, 36: 337–345
doi:10.1111/j.1439-0272.2004.00641
- [3] Prins, G.S. (2008): *Endocrine disruptors and prostatecancer risk, Endocrine-Related Cancer* (2008) 15 649–656
- [4] Brisken, C. (2008): *Endocrine Disruptors and Breast Cancer, Chimia* 62, 406–409
- [5] SNF (2008), *Nationales Forschungsprogramm «Hormonaktive Stoffe», Öffentlicher Schlussbericht*, www.snf.ch/SiteCollectionDocuments/nfp/nfp50/nfp50_oeffentlicher_schlussbericht_d.pdf (21.4.17).
- [6] Schipper, O.; Suter, M.; Holm, P. (2004): *«Dem Fischrückgang auf der Spur». Projekt Fischnetz*
- [7] Schönborn, A.; Grimmer, A. A. (2013): *Coupling Sample Preparation with Effect-Directed Analysis of Estrogenic Activity – Proposal for a New Rapid Screening Concept for Water Samples. Journal of Planar Chromatography* 26. doi:10.1556/JPC.26.2013.5.3
- [8] Buchinger, S. et al. (2013): *Direct coupling of thin-layer chromatography with a bioassay for the detection of estrogenic compounds, Anal. Chem.* 85 7248–7256
- [9] Klingelhöfer, I.; Morlock, G. E. (2015): *Bioprototyping of Surface/Wastewater and Bioquantitation of Discovered Endocrine-Active Compounds by Streamlined Direct Bioautography, Anal. Chem.* 87, 11098–11104
- [10] McDonnell, D.P. et al. (1991): *High Level Expression of Biologically Active Estrogen Receptor in Saccharomyces Cerevisiae. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. Vol. 39, No. 3, pp. 291–297*
- [11] Zlatkis, A.; Kaiser, R.E. (1977): *HPTLC: High Performance Thin-Layer Chromatography, Journal of Chromatography Library, Vol. 9. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, S. 11*
- [12] Routledge, E.J.; Sumpter, J.P. (1996): *Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15, No. 3, pp. 241–248*
- [13] Müller, M.B. et al. (2004): *Chromatographia*, 60 (2004) 207–211
- [14] Schönborn, Schmid, Ohlig, Buchinger, *Unprecedented sensitivity of planar-YES on Si60 plates using a spray-on technology, in Vorbereitung*
- [15] Schultis, T.; Metzger, J. W. (2004): *Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management; Universität Stuttgart, Stuttgart*
- [16] Mainetti, T. (2016): *Erstellung von Abwasserprofilen in Bezug auf hormonaktive Substanzen mittels der planar-YES-Methode. Bachelorarbeit. Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Wädenswil (unveröffentlicht)*
- [17] Oekotoxzentrum (ohne Datum): *Qualitätskriterienvorschläge Oekotoxzentrum, www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/qualitaetskriterienvorschlaege-oekotoxzentrum/ (Besucht am 13.2.2017)*
- [18] *wetter.com* (2017): *Abgerufen am 13. März 2017: www.wetter.com/wetter_aktuell/rueckblick/?id=CHOCH4408*
- [19] *neugut.ch* (2016). *neugut.ch. Abgerufen am 5. September 2016: Aus Abwasser wird sauberes Wasser – 365 Tage im Jahr: www.neugut.ch/index.php/1/Home*

> SUITE DU RÉSUMÉ

L'étude montre clairement que planar-YES est approprié, en haute résolution, pour établir des profils d'activité œstrogénique et leur transformation dans le temps dans les STEP. C'est un biotest efficace et économique, qui permet une caractérisation détaillée de l'activité œstrogénique d'échantillons d'eaux usées.