

Charakterisierung von Industrieabwässer durch den Einsatz von Abbautests und Biotests (Abbaustest Biotest Industrieabwasser Screening ABIscreen)

Studie zur Toxizität im Industrieabwasser - Modul 4

Xenia Klaus & Miriam Langer

Muttenz, 09.12.2021

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

Impressum

Auftraggeber:

Bundesamt für Umwelt (BAFU)
Abteilung Wasser
CH-3003 Bern

Das BAFU ist ein Amt des Eidg. Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Auftragnehmer:

Institut für Ecopreneurship (IEC)
Hochschule für Life Sciences, Fachhochschule Nordwestschweiz, Muttenz

Autorinnen:

Xenia Klaus, Miriam Langer

Begleitung BAFU:

Saskia Zimmermann-Steffens (BAFU)

Hinweis:

Diese Studie/dieser Bericht wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU) verfasst. Für den Inhalt ist allein der Auftragnehmer verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Ausgangslage	4
2	ABIScreen-Methodik	4
2.1	Abbautests zur Abschätzung der Persistenz	7
2.1.1	Zahn-Wellens-Test (ZWT)	7
2.1.2	Alternativer Inhärenter Abbaustest (AIA)	8
2.2	Nitrifikations- und Respirationshemmtests zur Abschätzung der ARA-Toxizität	8
2.2.1	Nitrifikationshemmtest nach ISO 9509:2006	8
2.2.2	Respirationshemmtest nach OECD 209	9
2.3	Anpassung von abiotischen Parametern zur Vermeidung von Matrixeffekten in Biotests	9
2.3.1	Matrixeffekte	9
2.3.2	Verdünnung der Abwasserproben	11
2.4	Biotests zur Abschätzung der Ökotoxizität	12
2.4.1	Biologische Testmethoden in ABIScreen	13
2.5	Auswertung	14
2.6	Einordnung von erhobenen <i>Toxic Units</i> (TU)	15
2.6.1	Vorschlag Einordnung inkl. Salzkorrektur	15
2.6.2	Diskussion der Schwellenwerte	18
3	Anwendung von ABIScreen in der Praxis	19
3.1	Anwendungsprüfung der ABIScreen-Methodik an Industrieabwasserproben	19
3.2	Optimierungen bei ABIScreen	19
3.3	Toxizitätsvergleiche Abbaustest	25
3.4	Dienstleistungslabors für die Durchführung von ABIScreen-Untersuchungen	26
4	Outlook	28
5	Literaturverzeichnis	29

Abbautest-Biotest-Industrieabwasser – Screening (ABIScreen)

1 Ausgangslage

In der Schweiz fehlt es bisher an Erfahrungen bei der Untersuchung von industriellen Abwässern mit Biotests. Die «Übersichtsstudie zum Einsatz von Biotests für die Charakterisierung von Industrieabwasser in der Schweiz» der FHNW im Auftrag des Bundesamts für Umwelt (BAFU) ergab, dass nur wenige Betriebe Biotests zur Untersuchung ihrer Abwässer einsetzen. Der Austausch mit einzelnen Betrieben zeigte, dass in der Praxis Interesse und Bedürfnis für den Einsatz von Biotests besteht. Für den praktischen grossflächigeren Einsatz von Biotest ist es aber notwendig, eine anwendungsorientierte Vorgehensempfehlungen zur Verfügung zu haben.

Im Auftrag des BAFU entwickelte die FHNW die Methodik «Abbautest-Biotest-Industrieabwasser Screening (ABIScreen)» zur Untersuchung von Industrieabwasser mit Biotests.

2 ABIScreen-Methodik

Die Methodik «Abbautest-Biotest-Industrieabwasser Screening (ABIScreen)» wurde auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse aus der «Übersichtsstudie zum Einsatz von Biotests für die Charakterisierung von Industrieabwasser in der Schweiz» entwickelt. Die vorgeschlagene ABIScreen-Methodik enthält Vorgehensempfehlungen und Interpretationshilfen zu folgenden Untersuchungsschritten für eine ökotoxikologische Charakterisierung von Industrieabwässern:

1. Abbautests zur Abschätzung des Gehalts persistenter Substanzen nach biologischem Abbau
2. Nitrifikationshemmtests zur Abschätzung der ARA-Toxizität
3. Erfassung und Anpassung von abiotischen Parametern zur Vermeidung von Matrixeffekten
4. Biotests zur Abschätzung der Ökotoxizität

In ABIScreen wird die Abwasserprobe in einen Abbautest (1.) überführt, nachdem die Probe neutralisiert oder verdünnt wurde, um die abiotischen Faktoren wie pH, Leitfähigkeit und DOC (*Dissolved Organic Carbon*) an die Anforderungen des Abbautests anzupassen. Nach der Durchführung des Abbautests (z.B. Zahn-Wellens-Test ZWT oder Alternativer Inhärenter Abbautest AIA) wird der Anteil an persistenten Substanzen gemessen (refraktärer organischer Kohlenstoff ROC), die in den Abwasserproben verbleiben und die prozentuale Abbaurate bestimmt.

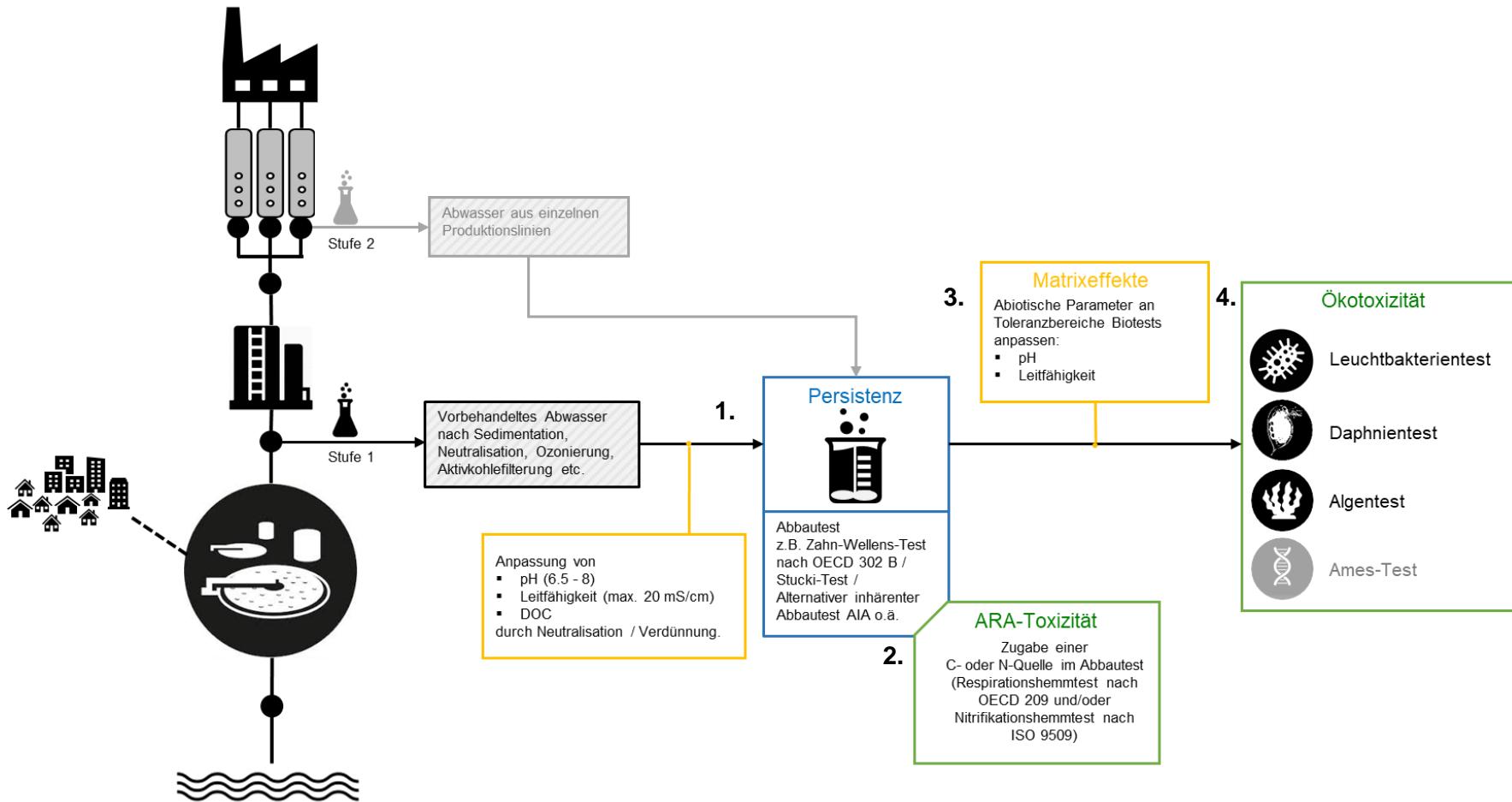
Unter Zugabe einer Stickstoff(N)- und/oder Kohlenstoff(C)quelle kann innerhalb des Abbaustests zusätzlich abgeschätzt werden, ob die Probe für die ARA-Biologie toxisch ist (2.). Werden die zugegebenen Substrate im Nitrifikations- und im Respirationshemmtest nicht genügend abgebaut, ist anzunehmen, dass nitrifikations- bzw. respirationshemmende Inhaltsstoffe in der Abwasserprobe enthalten sind, was Hinweise auf eine mögliche ARA-Toxizität gibt.

Die abgebaute Abwasserprobe wird erneut auf ihre chemisch-physikalische Parameter überprüft und durch Verdünnung oder Neutralisierung an die ermittelten Toleranzbereiche der Biotestorganismen angepasst, um Matrixeffekte in den Biotests zu vermindern (3.). Matrixeffekte können durch Abweichungen von abiotischen Parametern in einer Probe entstehen, beispielsweise durch erhöhte Salzkonzentrationen oder tiefe bzw. hohe pH-Werte. Im Biotest kann ohne eine Adaptation an die Toleranzbereiche nicht ausgeschlossen werden, dass gemessene Effekte durch die abiotischen Parameter und nicht durch die enthaltenen Abwasserinhaltsstoffe verursacht wurden.

Im letzten Schritt wird eine Verdünnungsreihe der Abwasserprobe mittels einer Biotestbatterie bestehend aus einem Leuchtbakterientest, einem Algентest und einem Daphnientest sowie nach Möglichkeit einem Mutagenitätstest (Ames-Test) untersucht und die *Toxic Units* (TU) ermittelt (4.).

Werden bei einer Abwasserprobe toxische Effekte ausgemacht (Stufe 1), können bei ABIScreen in Stufe 2 weitere Untersuchungen von einzelnen Produktionslinien erfolgen (z.B. Biotests oder chemische Analysen), um den Ursprung der Toxizität zurück an die Quelle zu verfolgen.

In Abbildung 1 ist das schrittweise Vorgehen bei ABIScreen dargestellt; dessen einzelne Bestandteile werden in den folgenden Kapiteln im Detail behandelt.



2.1 Abbautests zur Abschätzung der Persistenz

Industrielle Abwasserproben variieren in ihrer Zusammensetzung von organischen und anorganischen Stoffen erheblich und beinhalten sowohl biologisch gut abbaubare als auch persistente Substanzen. Letztere werden in einer ARA nicht abgebaut. Der Fokus in ABIScreen liegt darauf, zu identifizieren, ob das untersuchte Industrieabwasser persistente und toxische Substanzen beinhaltet. Für die Abschätzung der Persistenz und die anschliessende Durchführung von Biotests müssen die Abwasserproben in einem Abbaustest vorgängig abgebaut werden. Um die biologische Reinigung in der ARA zu simulieren, werden aktuell in ABIScreen zwei unterschiedliche Abbaustestmethoden eingesetzt: der standardisierte Zahn-Wellens-Test (ZWT nach OECD 302 B) und der neu entwickelte «Alternative Inhärente Abbaustest (AIA)» (nach Schäfer und Thomann 2021). In beiden Testansätzen wird das Erreichen eines Plateaus der DOC-Abbaubarkeit (mind. 70% Abbau) angestrebt. Eine gute Abbaubarkeit liegt bei mindestens 85% Reinigungseffekt (gemäß Anhang 3.1 GSchV).

2.1.1 Zahn-Wellens-Test (ZWT)

Der Zahn-Wellens-Test (nach OECD 302 B / EN ISO 9888-L25 1999-11) wurde ursprünglich entwickelt, um die Abbaubarkeit von Einzelsubstanzen zu untersuchen. In Ermangelung alternativer Testmethoden wird er seit Jahrzehnten auch häufig zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von unspezifischen Abwasserinhaltsstoffen durch aerobe Mikroorganismen eingesetzt. Der Zahn-Wellens-Test (im Folgenden ZWT genannt) ist daher die häufigste verwendete Methode, um zu prüfen, ob der Gehalt an löslichen organischen Substanzen in einer Probe (*Dissolved Organic Carbon* DOC) über einen definierten Zeitraum von 28 Tagen biologisch abgebaut wird. Das zu untersuchende Abwasser wird einem vorzugsweise an das spezifisch zu untersuchende Betriebsabwasser adaptierten Belebtschlamm ausgesetzt und über die gesamte Testdauer belüftet. Die biologische Abbaubarkeit wird über die Abnahme des DOC über die gesamte Testdauer ermittelt. Proben mit hohen DOC-Gehalten und/oder hoher Leitfähigkeit müssen für den Zahn-Wellens-Tests entsprechend verdünnt werden. Folgende Werte sind dabei einzuhalten (nach OECD 302 B):

- DOC-Gehalt \leq 400 mg/l
- pH 6.5 bis pH 8
- Leitfähigkeit \leq 32 mS/cm

2.1.2 Alternativer Inhärenter Abbaustest (AIA)

Aufgrund der langen Testdauer von 28 Tagen des Zahn-Wellens-Tests, wurde an der FHNW in der Arbeitsgruppe Umwelt- und Wassertechnologie von Michael Thomann im Auftrag des BAFU eine verkürzte Testmethodik zur Abschätzung der biologischen Abbaubarkeit entwickelt. Im Vergleich zum klassischen Zahn-Wellens-Test wird den Abwasserproben im verkürzten Alternativen Inhärenten Abbaustest (im Folgenden AIA genannt) eine grössere Menge Belebtschlamm (3 g bis 5 g TS Belebtschlamm) zugegeben, die einerseits den Abbau der organischen Substanzen durch die Belebtschlammkulturen beschleunigt und andererseits die Realität auf der ARA besser widerspiegelt. So kann eine biologische Abbaubarkeit von über 70% bereits ab einer Testdauer von 7 bis 14 Tagen erreicht werden (bis zur Erreichung eines «Abbauplateaus» bzw. einer Sättigung der Abbaukurve). Innerhalb des AIA werden aktuell die chemisch-physikalischen Parameter analog zum ZWT angepasst, um die beiden Testmethoden miteinander vergleichen zu können. Folgende Werte sind dabei einzuhalten (nach Schäfer und Thomann 2021):

- DOC-Gehalt \leq 400 mg/l
- pH 6.5 bis pH 8
- Leitfähigkeit \leq 20 mS/cm

Die Methodik für den AIA ist zurzeit noch in Entwicklung. Eine detaillierte Projekt- und Methodenbeschreibung ist im Bericht von Schäfer und Thomann festgehalten (Schäfer und Thomann 2021). Künftige Weiterentwicklungen der Testmethodik sehen Abweichungen in den Parametern vor (z.B. höhere DOC-Werte).

2.2 Nitrifikations- und Respirationshemmtests zur Abschätzung der ARA-Toxizität

2.2.1 Nitrifikationshemmtest nach ISO 9509:2006

Der Nitrifikationshemmtest mit Belebtschlamm nach ISO 9509:2006 untersucht die Auswirkung von Substanzen oder Proben auf die nitrifizierenden Bakterien. Die Nitrifikanten im Belebtschlamm sind aufgrund ihrer langen Generationszeit besonders anfällig auf toxische Substanzen. Der Nitrifikationshemmtest kann in Kombination mit dem Abbaustest durchgeführt werden (z.B. Zahn-Wellens- oder Stucki-Test, siehe Stucki 2000). Auch bei der Weiterentwicklung des AIA ist es geplant, den Nitrifikationshemmtest unter Zugabe einer N-Quelle in den Abbaustestansatz zu integrieren. Die zu überprüfende Substanz oder Abwasserprobe wird dabei mit einem Ammoniumsulfat-haltigem Nährmedium versetzt und während 4 Stunden inkubiert. Anschliessend wird die Konzentration von Ammonium, Nitrat und Nitrit in der filtrierten Probe bestimmt. Um

die Nitrifikationshemmung zu bestimmen, werden die Resultate mit den in einem Blindansatz ermittelten Konzentrationen von Ammonium Nitrat und Nitrit verglichen. Daraus ergibt sich die Hemmung in Prozent, welche sich als EC₅₀-Wert (siehe 2.5) ausdrücken lässt (siehe auch Schäfer und Thomann 2021).

2.2.2 Respirationshemmtest nach OECD 209

Der Respirationshemmtest nach OECD 209 untersucht die Auswirkung einer Testsubstanz oder eines Abwassers auf die Gesamtheit der Belebtschlamm-Mikroorganismen. Dabei wird Belebtschlamm mit einem gut abbaubaren Medium (Kohlenstoffsubstrat) versetzt, um den Anteil Sauerstoff zu untersuchen, der durch den Abbau verbraucht wird. Der Respirationshemmtest kann unter Zugabe der Kohlenstoffquelle in den Abbaustest integriert werden (z.B. nach Stucki, siehe Stucki 2000). Auch bei der Weiterentwicklung des AIA ist es geplant, den Respirationshemmtest unter Zugabe einer C-Quelle in den Abbaustestansatz zu integrieren.

2.3 Anpassung von abiotischen Parametern zur Vermeidung von Matrixeffekten in Biostests

2.3.1 Matrixeffekte

Matrixeffekte können durch Abweichungen der Grundanforderungen eines Biostests entstehen, z.B. wenn abiotische Parameter in einer Probe nicht im organismusspezifischen Toleranzbereich der Testorganismen liegen. Beispielsweise können das Auftreten einer hohen Salzkonzentration/Leitfähigkeit oder starke Abweichungen des pH möglicherweise die Ergebnisse der Biostests beeinflussen, da sie selbst Effekte in den Testorganismen auslösen können. Wenn ein Abwasser beispielsweise stark salzhaltig ist, kann im Biostest nicht unterschieden werden, ob gemessene Toxizitätseffekte durch das Salz und/oder durch toxische Stoffe in der Probe ausgelöst wurden. Deshalb wird in ABIScreen ein Ansatz vorgeschlagen, bei dem Abwässer so verdünnt werden, damit die jeweiligen organismusspezifischen Toleranzbereiche bei der Durchführung von Biostests eingehalten werden. Dadurch können falsch-positive Ergebnisse vermieden werden, allerdings wird es dadurch unvermeidlich, dass die Proben nur nach einer vorgenommenen Verdünnung untersucht werden können.

Um Matrixeffekte in den Biotests auszuschliessen, werden vor der Testdurchführung die chemischen und physikalischen Parameter der Abwasserproben bestimmt und mit Werten verglichen, die in experimentellen Voruntersuchungen zur Abschätzung der Toleranzbereiche für die Organismen aus der Biotestbatterie von ABIScreen an der FHNW ermittelt wurden (siehe Anhang). Folgende Parameter werden nach Durchführung der Abbautests in den abgebauten Proben spezifisch gemessen:

- DOC [mg/l]: In den durchgeföhrten Voruntersuchungen konnten Auswirkungen eines erhöhten DOC-Gehalts auf die Biotestorganismen in ABIScreen ausgeschlossen werden. Aufgrund der vorgenommenen Verdünnungen im Abbaustest zur Anpassung des DOC (≤ 400 mg/l) und/oder dem erfolgten biologischen Abbau, sind zudem keine hohen DOC-Werte mehr zu erwarten.
- pH: Der pH wird bei der Durchführung des Abbaustests eingestellt (pH 6.5 bis pH 8) und es sind keine bedeutenden Abweichungen in den abgebauten Proben zu erwarten. In den durchgeföhrten Voruntersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass bedeutende Abweichungen des pH von gesetzlichen Anforderungen gemäss GSchV (pH 6.5 bis pH 9) einen Einfluss auf Leuchtbakterien und Daphnien haben. Lediglich im Algentest konnten aufgrund von Abweichungen des pH > 7.5 Effekte beobachtet werden, weshalb basischere Proben für den Algentest auf pH 7.5 angepasst werden sollten.
- Leitfähigkeit [mS/cm]: Erhöhte Leitfähigkeitswerte können einen hemmenden Effekt auf alle Testorganismen ausüben. Die berücksichtigten maximalen akzeptable Leitfähigkeitswerte (LF) für die einzelnen Testorganismen wurden in Voruntersuchungen an der FHNW anhand des EC₂₀ experimentell bestimmt und wie folgt festgelegt:
 - Leuchtbakterientest: max. LF_L = 40 mS/cm
 - Daphnientest: max. LF_D = 6 mS/cm
 - Algenwachstumshemmtest: max. LF_A = 6 mS/cm

Eine Übersicht der organismusspezifischen Toleranzbereiche für die Leitfähigkeit und den pH der Testorganismen in ABIScreen ist in Tabelle 1 ersichtlich. Die tolerierten Bereiche für weitere experimentell ermittelte Parameter (DOC; NO₂, NH₄, SO₂) sind im Anhang zusammengefasst.

Tabelle 1 Übersicht der Toleranzbereiche und der daraus abgeleiteten Grenzwerte für die Leitfähigkeit und pH für die unterschiedlichen Testorganismen in ABIScreen.

TESTORGANISMUS	PARAMETER	EC _x	BEREICH EC _x	GRENZWERTE (BASIS)
<i>Daphnia magna</i>	Leitfähigkeit [mS/cm]	EC ₅₀	7.17 – 7.89	6 (EC ₂₀)
		EC ₂₀	6.20 – 6.23	
		EC ₁₀	5.38 – 5.74	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Leitfähigkeit [mS/cm]	EC ₅₀	8.50 – 10.47	6 (EC ₂₀)
		EC ₂₀	7.31 – 9.35	
		EC ₁₀	6.67 – 8.75	
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Leitfähigkeit [mS/cm]	EC ₅₀	54.26 – 87.00	40 (EC ₂₀)
		EC ₂₀	40.19 – 76.17	
		EC ₁₀	33.87 – 70.47	
<i>Daphnia magna</i>	pH (tief / hoch)	EC ₅₀	4.88 / 11.11	6.5 – 9 (GSchV)
		EC ₂₀	4.94 / 11.05	
		EC ₁₀	4.97 / 11.03	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	pH (tief / hoch)	EC ₅₀	3.89 / 9.38	6.5 – 7.5 (EC ₂₀)
		EC ₂₀	3.87 / 7.68	
		EC ₁₀	4.01 / 6.84	
<i>Aliivibrio fischeri</i>	pH (tief / hoch)	EC ₅₀	4.06 / 10.84	6.5 – 9 (GSchV)
		EC ₂₀	4.14 / 10.74	
		EC ₁₀	4.23 / 10.69	

2.3.2 Verdünnung der Abwasserproben

Die Grunderkenntnisse über Matrixeffekte (siehe 2.3.1) lassen sich auch für den Belebtschlamm in den Abbautests übertragen. Für die Durchführung der beiden Abbautests müssen die Parameter DOC, pH und Leitfähigkeit gemäss ABIScreen ebenfalls angepasst werden, wenn diese von folgenden Testanforderungen abweichen (nach OECD 302 B; Stucki 2000; Schäfer und Thomann 2021):

- DOC ≤ 400 mg/l
- pH 6.5 bis pH 8
- Leitfähigkeit ≤ 20 mS/cm

Die Verdünnungsschritte in ABIScreen, die für die Durchführung des Abbautests erfolgen, werden im Verdünnungsfaktor Y (VF Y) zusammengefasst.

Proben mit einer Leitfähigkeit oberhalb des organismusspezifischen Toleranzbereichs nach dem Abbaustest müssen zusätzlich verdünnt werden, bevor sie mittels Biotaests untersucht werden.

Eine Verdünnung erfolgt entweder innerhalb der Testdurchführung gemäss den Anforderungen in der Testguideline (betrifft den Algen- und Leuchtbakterientest, siehe auch 3.1 für weitere Erläuterungen) oder aber um die Toleranzbereiche der Testorganismen bezüglich Leitfähigkeit einzuhalten (v.a. im Algen- und Daphnientest, siehe dazu 2.3.1). Die Verdünnungsschritte, die für die Durchführung der Biotests erfolgen, werden im Verdünnungsfaktor X (VF X) zusammengefasst.

Alle Verdünnungsschritte (Verdünnungsfaktor VF XY), die zur Anpassung der Leitfähigkeit bzw. zur Einhaltung des DOC-Gehaltes im Abbaustest und/oder Biostest vorgenommen wurden, werden schliesslich bei der Ermittlung der erhobenen Toxizitätswerte (*Toxic Units TU*; siehe 2.5) berücksichtigt.

2.4 Biotests zur Abschätzung der Ökotoxizität

Ökotoxikologische Biotests werden verwendet, um Effekte von Substanzen und Stoffgemischen bzw. das toxische Potential von Abwässern abzuschätzen. In Biotests werden lebende Zellen, Organismen oder Gemeinschaften eingesetzt, um deren Reaktion auf eine Exposition zu messen (Fent 2013). Dazu werden Modellorganismen (wie z.B. einzellige Algen, Wasserflöhe, Bakterien usw.) der zu untersuchenden wässrigen Probe in unterschiedlichen Verdünnungsstufen ausgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wird jeweils ein festgelegter Endpunkt (z.B. Wachstum, Lebensfähigkeit, Schwimmfähigkeit, Entwicklung etc.) bestimmt und für jede Verdünnungsstufe in eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (siehe 2.5) aufgetragen. Durch den Einsatz verschiedener Biotests mit unterschiedlichen Testorganismen (Biostestbatterie), werden Auswirkungen auf verschiedenen biologischen Ebenen und mit unterschiedlichen Wirkungsweisen berücksichtigt.

Die ABIScreen-Methodik setzt auf eine Biostestbatterie bestehend aus bewährten Testsystemen zur Untersuchung von Abwasserproben (Algenteat, Daphnientest, Leuchtbakterientest) für die Abschätzung der Gesamttoxizität einer gereinigten Abwasserprobe. Die ausgewählten Testsysteme wurden bereits in mehrere Studien zur Untersuchung von Abwasserproben erfolgreich eingesetzt. Zur Abschätzung von mutagenen Effekten einer Abwasserprobe ist es künftig auch möglich, den Ames-Test in die Biostestbatterie von ABIScreen aufzunehmen. Die innerhalb ABIScreen vorgeschlagene Biostestbatterie wurde in der Übersichtsstudie als geeignet für die Untersuchung von Industrieabwasserproben identifiziert (Klaus und Langer 2021).

2.4.1 Biologische Testmethoden in ABI Screen

2.4.1.1 Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata* (Algenteest)

Der Algenwachstumshemmtest basiert auf der Guideline «*Water quality – Algal growth inhibition test on microplate with unicellular green fresh water algae – Draft Version*». Aufgrund von Adaptionen in der Testdurchführung für die Anwendung mit Abwasserproben, besteht die Testguideline aktuell noch als Entwurf (z.zt. in Prüfung für Standardisierung). Der Algenteest dient der Bestimmung der Wachstumshemmung der einzelligen Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* durch Abwasserproben. Dazu werden einzellige Algen im exponentiellen Wachstum über einen definierten Zeitraum (72 Stunden) verschiedenen Konzentrationen der Abwasserprobe in 24-Well-Mikroplatten ausgesetzt. Die Hemmung ergibt sich aus der Abnahme der Wachstumsrate der Algen in der Probe verglichen mit der Wachstumsrate der Algen in der Negativkontrolle unter gleichen Wachstumsbedingungen. Die Berechnung der Wachstumsrate erfolgt mittels der Bestimmung der Algen-Biomasse durch Messung der *in vivo* Chlorophyll-Fluoreszenz.

2.4.1.2 Akuter Toxizitätstest mit *Daphnia magna straus* (Daphnientest)

Der akute Toxizitätstest mit Wasserflöhen wird gemäss ISO-Standard «Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna straus* (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitäts-Test (EN ISO 6341:2012)» durchgeführt. Der akute Daphnientest beschreibt das Testverfahren, um die akute Toxizität von Chemikalien, Wässern und Abwässern auf den grossen Wasserfloh *D. magna* zu bestimmen. Dabei wird die Schwimmunfähigkeit resp. die Immobilisation von *D. magna* nach 24-stündiger und 48-stündiger Exposition in verschiedenen Probenverdünnungen der Probe ermittelt und mit einer Negativ-Kontrolle verglichen.

2.4.1.3 Microtox®-Assay mit *Aliivibrio fischeri* (Leuchtbakterientest)

Der Leuchtbakterientest bzw. das Microtox®-Assay wird gemäss der «Standard Operational Procedure of Microtox-Assay with the Kit from EBPI» durchgeführt. Diese basiert auf der ISO Standard EN ISO 11348-3:2008. Der Test beruht auf der Hemmung der natürlichen Biolumineszenz des marinen Bakteriums *A. fischeri* durch toxische Substanzen und Stoffgemische. Dazu wird die Biolumineszenz der Bakterien zu Beginn des Tests, d.h. unbehandelt, und nach 30-minütiger Inkubation mit der Abwasserprobe gemessen und miteinander verglichen.

2.4.1.4 Ames-Test auf der Mikroplatte mit *Salmonella typhimurium*

Der Ames-Test auf der Mikroplatte wird gemäss OECD 471 durchgeführt. Im Ames-Test werden meist modifizierte Stämme von *Salmonella typhimurium* zum Nachweis mutagener Verbindungen verwendet. Durch Mutationen im Histidin-Operon sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, die

entsprechende Aminosäure zu produzieren. Diese Mutationen führen zu Zellen, die nur wachsen können, wenn Histidin von extern zugeführt wird. Das mutagene Potenzial einer Testprobe wird ermittelt, indem man die Zellen verschiedenen Konzentrationen der Probe für 48 bis 72 Stunden aussetzt und danach mittels eines histidinfreien Mediums selektiert. In diesem Medium überleben und wachsen nur diejenigen Zellen, bei denen aufgrund eines mutagenen Reversionsereignisses Mutationen innerhalb des Gens verursacht und damit wieder befähigt wurden, Histidin zu produzieren. Die Anzahl rückmutierter Kolonien wird anschliessend mit der Anzahl der spontanen Revertantenkolonien einer Negativkontrolle verglichen. Es werden hierbei verschiedene *Salmonella* Stämme eingesetzt (z.B. TA 100/98) und bedarfsweise mit einer Ergänzung eines S9-Mix gemessen. Durch den S9-Mix werden zusätzlich metabolisierende Säuger-Enzyme zugefügt, wodurch die Stoffe auch nach Bioaktivierung untersucht werden können.

2.5 Auswertung

Die Datenbearbeitung der einzelnen Tests erfolgt in Microsoft Excel. Die Auswertung der Rohdaten und die daraus ermittelten *Toxic Units* werden in der Statistik Software «GraphPad Prism 9.02» von GraphPad Software Inc durchgeführt. Die Ermittlung der *Toxic Units* (TU) orientiert sich an folgendem Vorgehen:

- Konzentrations-Wirkungs-Beziehung: Die in den Biotests ermittelten Effekte in den unterschiedlichen Verdünnungen der Abwasserprobe werden in eine Konzentrations-Wirkungskurve überführt. Konzentrations-Wirkungskurven beschreiben die Abhängigkeit toxikologischer Wirkungen von der Konzentration einer Abwasserprobe. Dafür werden in einem Diagramm die Häufigkeit einer Wirkung (in Prozent) gegen den Logarithmus der Verdünnung der Abwasserprobe aufgetragen.
- Effektkonzentration EC_x: Die Effektkonzentration EC_x ist die Konzentration oder der Anteil der Probe in Prozent, bei der innerhalb eines definierten Zeitraums bei X% der untersuchten Organismen ein induzierbarer Effekt (= Endpunkt wie z.B. Letalität, Immobilisation oder Wachstumshemmung) auftritt. Häufig werden in der Ökotoxikologie für die Angabe der Toxizität die Effektkonzentrationen EC₅₀ und EC₁₀ angegeben. Bei akuten Tests kommt eher der EC₅₀ (= Konzentration oder Verdünnungsstufe, bei der bei 50% der Organismen der definierte Effekt auftritt), bei chronischen Tests der EC₁₀ oder EC₂₀ zu tragen. Je niedriger der EC_x-Wert ausfällt, d.h. je tiefer die gemessene Konzentration der Probe ist, bei der ein X% Effekt auftritt, desto toxischer ist die zu untersuchende Probe einzuordnen.

- Toxic Units (TU): Der EC₅₀-Wert wird in der Literatur alternativ als *Toxic Units (TU)* angegeben. *Toxic Units* werden häufig als Einheit für die Toxizität von Abwasserproben eingesetzt. Bei ABIScreen werden daher die erhobenen EC₅₀-Werte in TU umgerechnet. Die *Toxic Units* werden mit der Formel berechnet: $TU = \frac{100}{EC50}$. Je höher der TU-Wert ist, desto toxischer ist das Abwasser zu bewerten, da dieses noch in tiefen Konzentrationen Effekte in den Biotests auslöst.

2.6 Einordnung von erhobenen *Toxic Units (TU)*

Für die Einordnung der in den Biotests erhobenen *Toxic Units* werden in der praktischen Anwendung Schwellenwerte oder Richtwerte wichtig werden, die aufzeigen, ab wann eine Abwasserprobe als problematisch eingestuft wird. Da Industrieabwasserproben zudem aufgrund von erhöhten Salzkonzentrationen häufig verdünnt werden müssen, ist die vorgenommene «Salzkorrektur» (durch Probenverdünnung, repräsentiert durch den Verdünnungsfaktor VF XY, siehe 2.3.2) in der Interpretation der Toxizitätswerte zu berücksichtigen.

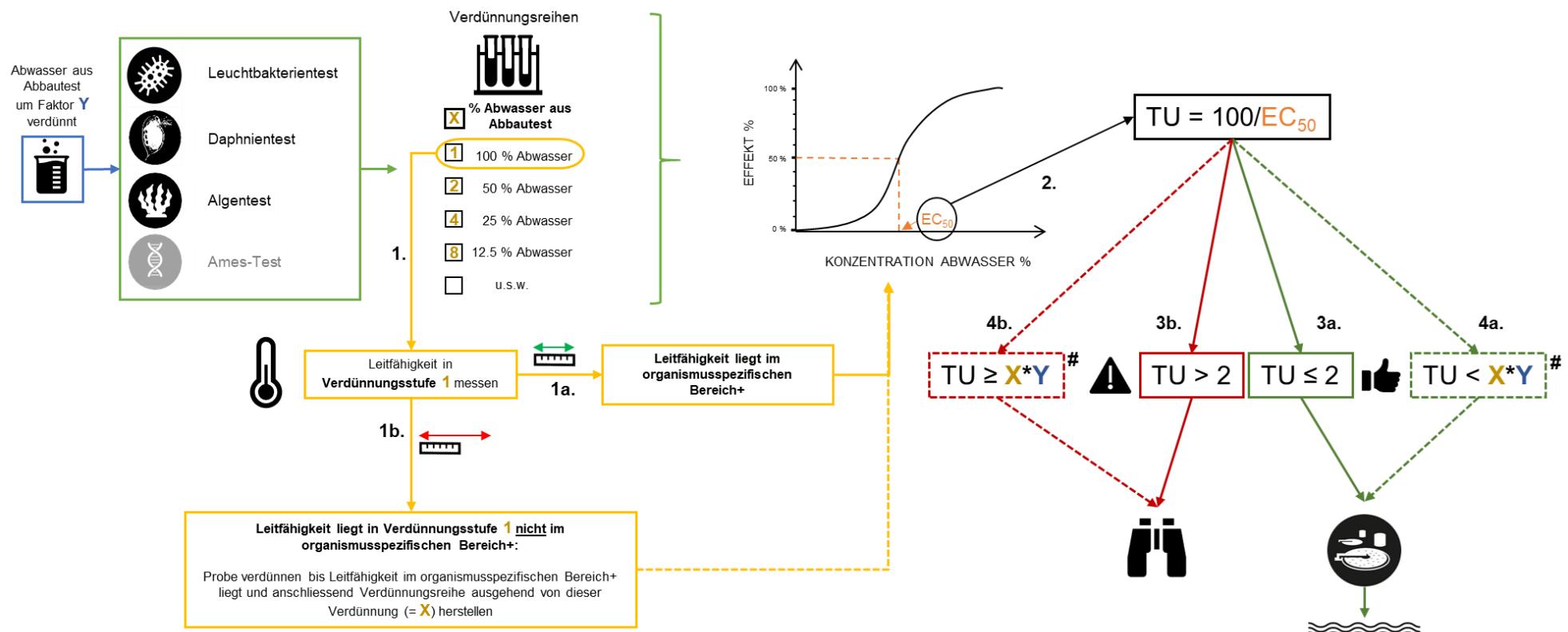
2.6.1 Vorschlag Einordnung inkl. Salzkorrektur

Bei der Entwicklung von ABIScreen wurde exemplarisch ein Vorschlag für die Einordnung der *Toxic Units* und die Berücksichtigung der Salzkorrektur erarbeitet (siehe Abbildung 2). Die in Abbildung 2 vorgeschlagenen Schwellenwerte sind lediglich als *Default* zu verstehen und müssen zu gegebenem Zeitpunkt, unter Einbeziehung diverser Faktoren festgelegt werden (siehe auch 2.6.2). Der Vorschlag gemäss Abbildung 2 sieht folgendes Vorgehen vor:

1. Die abgebaute Abwasserprobe aus dem Abbaustest, um den Verdünnungsfaktor VF Y verdünnt, wird vor der Durchführung der einzelnen Biotests auf ihre Leitfähigkeit überprüft.
 - a. Liegt die gemessene Leitfähigkeit im vorgegebenen organismusspezifischen Toleranzbereich des jeweiligen Biotests, wird eine Konzentrations-Wirkungskurve ausgehend von der höchsten Konzentration der Abwasserprobe erstellt. Der Verdünnungsfaktor VF Y wird dabei in die Verdünnungsreihe einberechnet (d.h. die höchste Probenkonzentration wird mit dem VF Y verrechnet und die Verdünnungsreihe ausgehend von dieser angepassten Probenkonzentration erstellt).
 - b. Liegt die gemessene Leitfähigkeit über dem organismusspezifischen Toleranzwert für die Leitfähigkeit, wird die Abwasserprobe um den Verdünnungsfaktor VF X verdünnt, bis sie im organismusspezifischen Bereich liegt. Die Verdünnungsreihe in der Konzentrations-Wirkungskurve wird anschliessend ausgehend von der höchsten Abwasserkonzentration basierend auf den Verdünnungsfaktor VF XY erstellt (d.h. die

höchste Probenkonzentration wird mit dem VF XY verrechnet und die Verdünnungsreihe ausgehend von dieser angepassten Probenkonzentration erstellt).

2. Durch Auftragen der gemessenen Effekte in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen in eine Konzentrations-Wirkungskurve wird der EC₅₀-Wert bestimmt und mittels der Formel $TU = \frac{100}{EC_{50}}$ in *Toxic Units* (TU) umgerechnet.
3. Wurden für die Proben weder im Abbaustest noch in den Biotests Verdünnungen vorgenommen, wird folgende Einordnung für unverdünnte Proben vorgeschlagen:
 - a. Es wird kein Effekt (= EC₅₀) im Biostest gemessen oder die erhobenen *Toxic Units* (TU) liegen unter dem definierten Schwellenwert (im vorliegenden Beispiel: TU < 2). In diesem Fall wird das Abwasser als nicht problematisch eingestuft.
 - b. Es werden Effekte (= EC₅₀) im Biostest gemessen und die erhobenen *Toxic Units* (TU) liegen oberhalb des definierten Schwellenwerts (im vorliegenden Beispiel: TU > 2). Das Abwasser wird als problematisch eingestuft, weshalb eine Einleitung in die ARA überdacht und eine Ursachensuche in Erwägung gezogen werden sollte.
4. Wurden die Proben im Abbaustest und/oder in den Biotests (aufgrund der vorgegebenen Testverdünnungen und/oder zur Einhaltung der organismusspezifischen Toleranzbereiche) verdünnt, ist folgende Einordnung für verdünnte Proben (um Verdünnungsfaktor VF XY) zu berücksichtigen:
 - a. Es wird kein Effekt (= EC₅₀) im Biostest gemessen. In diesem Fall wird das Abwasser als nicht problematisch eingestuft (im vorliegenden Beispiel: auch wenn TU > 2).
 - b. Es werden Effekte (= EC₅₀) im Biostest gemessen und die erhobenen *Toxic Units* liegen oberhalb des Verdünnungsfaktors XY (TU ≥ XY). Das Abwasser wird als problematisch eingestuft, weshalb eine Einleitung überdacht und eine Ursachensuche in Erwägung gezogen werden sollte.



+Maximalwerte der geduldeten Leitfähigkeit (LF) für Daphnien (D), Algen (A) und Leuchtbakterien (L):

$LF_D = 6 \text{ mS/cm}$ $LF_A = 6 \text{ mS/cm}$ $LF_L = 40 \text{ mS/cm}$

(Die Maximalwerte basieren auf experimentell ermittelten EC_{20} -Werten)

#Die für eine Einleitung maximal zugelassenen TU berechnen sich aus dem Verdünnungsfaktor Y für die Durchführung des Abbaustests und der Verdünnungsstufe X zur Durchführung des Biotests (inkl. der durchgeführten Testverdünnungen gemäss Guideline)

- Effekt (=EC₅₀) messbar → problematisches Abwasser, deshalb Ursachensuche in Erwägung ziehen
- Effekt (=EC₅₀) messbar oder nicht → wenn TU ≤ 2, kein problematisches Abwasser
- Effekt (=EC₅₀) messbar → wenn TU ≥ XY, problematisches Abwasser, deshalb Ursachensuche in Erwägung ziehen
- kein Effekt (=EC₅₀) messbar → Abwasser unproblematisch, auch wenn XY > 2

Abbildung 2 Beispielhaftes Vorgehen für die Interpretation und Einordnung der in den Biotests erhobenen Toxic Units (TU) und die vorgenommenen Verdünnungen aufgrund der Salzkorrektur. Die einzelnen Schritte (1. - 4.) sind im Text beschrieben.

2.6.2 Diskussion der Schwellenwerte

Im Austausch mit Industriebetrieben (z.B. innerhalb des Workshops von Science Industries zwischen Industrie und Forschung vom 15. November 2021) bestätigte sich, dass eine Einordnung der erhobenen Biotestergebnisse für die Betriebe wichtig ist. Eine Einordnung eröffnet den Betriebsverantwortlichen die Möglichkeit, geeignete Massnahmen innerhalb des Betriebs aufgrund von Toxizitätsindikatoren zu rechtfertigen und dadurch Handlungsoptionen umzusetzen.

Seitens der Industrie besteht grösstenteils die Erwartungshaltung, dass eine Festlegung von Schwellenwerten oder spezifische Vorgaben zur Anwendung von Biostests von den Behörden erfolgt. Die Anforderung durch die Behörden stehen bei vielen Betrieben im Vordergrund. Einzelne Betriebe äusserten, dass v.a. die Wasserqualität des Gesamtabwassers nach der ARA bei der Einleitung in den Vorfluter von Interesse sei. Es wurde angemerkt, dass freiwillige regelmässige Untersuchungen mit Biostests von einzelnen Abwasserströmen unrealistisch wären, sofern dies nicht von den Behörden gefordert würde.

Betriebe, die bereits Erkenntnisse mit Biostest gesammelt haben, nutzen aktuell für die Einordnung eigene Erfahrungswerte. Hier wurde die Meinung geäussert, dass die Freiheiten bei den Betrieben liegen sollten, die Untersuchungen nach ihren Bedürfnissen einzuordnen und anzuwenden. Dazu müssten jedoch genügend eigene Daten im Betrieb vorliegen, um die Untersuchungen einschätzen zu können und geeignete Massnahmen umzusetzen.

Zur Festlegung von Schwellenwerten wurde seitens Betriebe vorgeschlagen, sich an der deutschen Abwasserverordnung zu orientieren. Gegen die Übernahme der Grenzwerte aus der deutschen Abwasserverordnung spricht jedoch, dass diese den Stand der Technik aus den 70er Jahren widerspiegeln, für direkteinleitende Betriebe gelten und unterschiedliche Grenzwerte je nach Branche aufweisen. Bestehende Vorgaben zum Einsatz von Biostests wie z.B. der *Guide pour l'Utilisation des Tests Ecotoxicologiques* (Santiago 2002) oder die ehemalige Altlasten-Vollzugs-hilfe zur Anwendung von ökotoxikologischen Tests bei Sickerwasser von belasteten Standorten (BUWAL 1999) kamen ebenfalls als Orientierungshilfe zur Sprache.

Für eine definitive Festlegung der Schwellenwerte wird seitens FHNW vorgeschlagen, eine Expertengruppe mit Vertretern und Vertreterinnen aus Industrie, Behörden, Forschung und Dienstleistungslaboren zu gründen. Innerhalb dieser Expertengruppe sollte zu einem späteren Zeitpunkt

beispielsweise auch diskutiert werden, wie unterschiedliche Volumina von anfallenden Abwässern in den Schwellenwerten berücksichtigt werden könnten (siehe 3.2). Hierzu wird es notwendig sein, eine gute Datengrundlage aus verschiedenen Branchen zur Verfügung zu haben.

3 Anwendung von ABIScreen in der Praxis

3.1 Anwendungsprüfung der ABIScreen-Methodik an Industrieabwasserproben

Die ABIScreen-Methodik wurde bereits für die Untersuchung von insgesamt 19 Industrieabwasserproben erfolgreich eingesetzt, um die Anwendung für die Praxis zu prüfen und zu optimieren. Die Abwasserproben stammten aus einem Sonderabfallentsorgungsbetrieb und aus 4 verschiedenen chemisch-pharmazeutischen Unternehmen. Die Ergebnisse der Untersuchungen und deren Einordnung wurden in den zwei separaten Kurzberichten «Stoffe im gereinigten Abwasser der chemisch-physikalischen Sonderabfallverwertung» und «Ökotoxikologische Charakterisierung von abgebauten Abwässern aus der chemisch-pharmazeutischen Industrie» festgehalten.

3.2 Optimierungen bei ABIScreen

Der erste Vorschlag für ein Untersuchungskonzept zum Einsatz von Biotests für die Charakterisierung von Industrieabwasser wurde innerhalb der «Übersichtsstudie zum Einsatz von Biotest für die Charakterisierung von Industrieabwasser» entwickelt (siehe Klaus und Langer 2021). Basierend auf diesem Vorschlag wurde das Untersuchungskonzept für verschiedene Industrieabwasserproben geprüft (siehe 3.1). Bei der Anwendung wurden einzelne Lücken in der Methodik identifiziert, die analysiert und in der Folge stetig angepasst wurden. Auf diese Weise wurde das Untersuchungskonzept zu der hier vorgeschlagenen ABIScreen-Methodik weiterentwickelt. Folgendes Verbesserungspotential wurde bei der Anwendung von ABIScreen identifiziert und führte zu bereits durchgeführten Optimierungen und Empfehlungen (siehe 1. – 3.) Weitere Lücken sollen in weiterführenden Untersuchungen analysiert und durch geeignete Lösungsansätze geschlossen werden (siehe 4. – 9.):

1. Anpassung Verdünnungsreihen zur Verbesserung der Aussagekraft

Bei der Anwendung der verschiedenen Testsysteme wurden zu Beginn der Untersuchungen Verdünnungsreihen von 1:2 eingesetzt. Dabei werden die Abwasserproben jeweils um die Hälfte bis zur Erreichung der gängigen Anzahl Verdünnungen je Testsystem verdünnt. Beim Daphnientest werden üblicherweise 5 Verdünnungsstufen, beim Algertest und beim Leuchtbakterientest 8 Verdünnungsstufen vorgeschlagen.

Bei der Durchführung des Daphnientests mit industriellen Abwasserproben wurde identifiziert, dass eine zusätzliche Verdünnung bei 75% Abwasserprobe zu deutlich aussagekräftigeren Konzentrations-Wirkungskurven führen kann und somit bei der Auswertung der Tests hilfreich ist. Bei den einzelnen Testsystemen wird daher empfohlen die Verdünnungsreihen gemäss Tabelle 2 vorzunehmen. Werden in den Biotests unklare Daten generiert, können die einzelnen Tests mit angepassten Verdünnungsstufen wiederholt werden. Bei den vorgeschlagenen Verdünnungsreihen handelt es sich um exemplarische Testverdünnungen ohne Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnungsfaktoren VF XY.

Tabelle 2 Vorgeschlagene Verdünnungsreihen für den Leuchtbakterien-, den Daphnien- und den Algertest mit Abwasserproben in ABIScreen (exemplarische Verdünnungen der Abwasserproben ohne Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren VF XY)

LEUCHTBakterientest	Daphnientest	Algertest
100%	100%	100%
50%	75%	50%
25%	50%	25%
12.5%	25%	12%
6.25%	12.5%	6.25%
3.125%		3.125%
1.5625%		1.5625%
0.78125%		0.7813%

2. Erhöhung der Schwellenwerte im Algertest

Im Algertest wurden teilweise sehr stark hemmende Effekte detektiert. Insbesondere Abwasserproben aus der Sonderabfallentsorgungsbranche generierten trotz vorhergehendem Abbaustest und vorgenommenen Verdünnungen aufgrund eines hohen Salzgehalts hohe Toxizitätswerte. Auch stark verdünnte Mischproben aus der ARA wiesen messbare hemmende Effekte im Algertest auf. Dass es sich beim Algertest um ein sehr sensitives Testsystem handelt, deckt sich auch mit Erfahrungen aus anderen Untersuchungen (z.B. in der Screeningstudie von Otto et al. 2020).

Der Algertest bildet chronische Effekte ab (Wachstum von Algenzellen mit mehreren Generationszeiten), daher empfiehlt es sich, den künftigen Schwellenwert für den Algertest im Vergleich zu den anderen akuten Biotests auf einem höheren Niveau festzulegen. Der vorgeschlagene *Default*-Schwellenwert für den Algertest sollte in ABIScreen auf mindestens TU > 6 festgelegt werden (im Vergleich zum vorgeschlagenen *Default*-Schwellenwert von TU > 2 in den anderen Biotests).

3. Berücksichtigung der Testverdünnungen gemäss Guideline

Bei der Auswertung und Einordnung der Tests in ABIScreen werden die vorgenommenen Verdünnungen für die Durchführung des Abbautests (um Verdünnungsfaktor VF Y) und die vorgenommenen Verdünnungen für die Durchführung der Biotests (um Verdünnungsfaktor VF X) eingerechnet (siehe 2.3.2).

Im Algen- und im Leuchtbakterientest werden gemäss Guidelines zusätzliche Testverdünnungen vorgenommen. Im Algentest wird demnach in der höchsten Konzentration nur 80% der (abgebauten und bereits verdünnten) Abwasserprobe, im Leuchtbakterientest lediglich 45% der Abwasserprobe eingesetzt und mit Medium aufgefüllt. Die Testverdünnung mit dem jeweiligen Medium ist wichtig, um die benötigten Salze und Nährstoffe für die Testorganismen zur Verfügung zu stellen. Die vorgenommenen Testverdünnungen sind in ABIScreen in den Verdünnungsfaktor XY gemäss Tabelle 3 nachträglich einzurechnen, um in der Auswertung der Biotests berücksichtigt zu werden.

Tabelle 3 Vorgehen für das Einrechnen der vorgenommenen Testverdünnungen gemäss Guideline in den Verdünnungsfaktor XY

LEUCHTBAKTERIENTEST		DAPHNIENTEST		ALGENTEST		
Verdünnungsfaktor XY	Faktor aufgrund Testverdünnung (45%)	Verdünnungsfaktor XY (neu)	Faktor aufgrund Testverdünnung (100%)	Verdünnungsfaktor XY (neu)	Faktor aufgrund Testverdünnung (80%)	Verdünnungsfaktor XY (neu)
1		2.22		1		1.25
2		4.44		2		2.5
4		8.88		4		5
8	2.22	17.76	1	8	1.25	10
16		35.52		16		20
...	

4. Identifikation Messvarianz bei Algentest und Leuchtbakterientest (ongoing)

Die Effekte auf das Wachstum (Algentest) bzw. auf die Biolumineszenz (Leuchtbakterientest) der Zellen werden über die Messung der Fluoreszenz/Lumineszenz erhoben. Die Messung erfolgt über einen handelsüblichen *Platereader*. Bei der Messung der Algen- und Leuchtbakterienplatten wurden jedoch zum Teil Abweichungen innerhalb der unterschiedlichen Testreplikate und/oder innerhalb von wiederholten Messungen ausgemacht. Eine hohe Messvarianz beeinflusst die Aussagekraft der Testergebnisse und sollte wenn möglich verhindert werden.

In weiterführenden Versuchen wird zurzeit an der FHNW untersucht, welche Faktoren (Einstellungen Gerät, Plattenanordnung, etc.) die Messung beeinflussen und durch welche Methoden die Messvarianz verringert werden kann.

5. Identifikation Farbproblem bei Algентest und Leuchtbakterientest (ongoing)

Die Effekte auf das Wachstum (Algентest) bzw. auf die Biolumineszenz (Leuchtbakterientest) der Zellen werden über die Messung der Fluoreszenz/Lumineszenz erhoben. Wenn die getesteten Abwasserproben Färbungen aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese die Messung beeinflussen und dadurch zu verfälschten und unplausiblen Ergebnissen führen.

Das Problem ist hier, dass bei der Messung der Proben nicht unterschieden werden kann, ob die gemessene Fluoreszenz/Lumineszenz von den Algen bzw. den Leuchtbakterien oder von der Farbe in der Probe emittiert wird. Um auch bei gefärbten Proben aussagekräftige Daten im Algентest zu erzeugen, wird gemäss Guideline-Entwurf (siehe 2.4.1.1) vorgeschlagen, die Eigenfluoreszenz der Probe zum Startzeitpunkt zu messen und in die Auswertung der Daten miteinzurechnen.

Bei der Testung gefärbter Abwasserproben mit ABIScreen hat sich jedoch gezeigt, dass die Messung der Eigenfluoreszenz zu Testbeginn gemäss Guideline-Entwurf nicht ausreichend ist. Denn über die Testdauer kann sich die Fluoreszenz/Lumineszenz der Probe verändern, was wiederum Einflüsse auf die Messung bei Testende und somit auf die Testergebnisse hat. Der Aspekt der Testdauer betrifft v.a. den Algентest, da die Inkubation der Algenzellen insgesamt über 72 h dauert, während die Leuchtbakterien nur während 30 min inkubiert werden.

Um ein *Bias* bei der Testung von gefärbten Abwasserproben zu vermindern, schlägt ABIScreen deshalb vor, bei gefärbten Abwasserproben eine separate Probenplatte ohne Algenzellen unter Berücksichtigung derselben Probenverdünnungsreihen zu erstellen und über die gesamte Testdauer unter denselben Testbedingungen mitlaufen zu lassen. Auf diese Weise kann die Eigenfluoreszenz der Probe zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten gemessen und für jedes Platten-Well einzeln von der Gesamtfluoreszenz rechnerisch abgezogen werden.

Die Plausibilität und Praktikabilität des vorgeschlagenen Vorgehens sowie die Relevanz einer separaten Probenfarbplatte werden zurzeit in weiterführenden Versuchen an der FHNW tiefergehend geprüft und optimiert.

6. Reproduzierbarkeit von Biotestdaten (ongoing)

Um dem ABIScreen Tool bzw. den darin vorgeschlagenen Biotests für die Praxis eine hohe Vertrauenswürdigkeit auf den Weg zu geben, ist eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (Biotests) wichtig. Da es sich um biologische Testmethoden handelt, sind Abweichungen in den erhobenen Daten zwar möglich (z.B. aufgrund von Qualitätsunterschieden in den kultivierten Organismen), jedoch sollten dieselben Abwasserproben in unterschiedlichen Testwiederholungen optimalerweise zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Reproduzierbare Ergebnisse sind auch eine wichtige Voraussetzung für die Festlegung von Schwellenwerten (siehe 2.6.2).

Für einzelne Abwasserproben wurden an der FHWN bereits Testwiederholungen vorgenommen. Für diese Einzeltests liegen Daten vor, welche grösstenteils vergleichbare Ergebnisse ($\pm 2\%$ in 60% der doppelt untersuchten Proben, bei 40% der doppelt untersuchten Proben war aufgrund technischer Probleme kein Vergleich möglich) produzierten. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um einen breiten und verlässlichen Datensatz zu generieren. Ein mögliches Testschema wird derzeit geplant und soll im Jahr 2022 an der FHNW durchgeführt werden.

Für die Validierung der in ABIScreen vorgeschlagenen Biotests mit Abwasserproben ist zudem ein Ringtest im Jahr 2022 mit mehreren Laboren geplant, um die Variabilität zwischen diversen Labors zu evaluieren. Im Ringtest können Dienstleistungslabore (siehe 3.4) teilnehmen, die die ganze Biotestbatterie (oder einzelne Biotests) bereits anbieten oder planen diese in ihren Leistungskatalog aufzunehmen (z.B. Algентest auf Mikroplatte). Dies hat den Vorteil, dass Erfahrungen mit dem ABIScreen Tool bereits frühzeitig in möglichen Dienstleistungslaboren etabliert wird. Die teilnehmenden Labore sind dann bereits in das Tool eingearbeitet, bevor dieses grossflächiger eingesetzt wird. Für die Reproduzierbarkeit des neuen AIA ist ein Ringtest im Frühling 2022 bereits geplant. Dieser könnte allenfalls mit Biotests begleitet werden und zur Reproduzierbarkeit der einzelnen Testsysteme beitragen.

7. Ausweitung Untersuchungen auf weitere Industriebranchen (in Planung)

Bei der Anwendung von ABIScreen wurden zum aktuellen Zeitpunkt zwei Industriebranchen vertieft untersucht (Sonderabfallentsorger- und Pharma/Chemiebranche). Für die breite Anwendbarkeit in der Praxis ist eine Ausweitung auf weitere Industriebranchen (u.a. Metall/Galvanik-, Biotech-, Textilbranche) und der Einbezug weiterer Betriebe (z.B. unterschiedliche Entsorgerbetriebe) erforderlich.

Auch für die Festlegung der Schwellenwerte ist es wichtig, dass die ABIScreen-Methodik in unterschiedlichen Branchen eingehend geprüft wurde und genügend Daten als Grundlage vorliegen. Die Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Branchen und unter Einbezug von verschiedenen Betrieben ist zurzeit Gegenstand weiterer Planungen.

8. Festlegung der Schwellenwerte (in Planung)

Die Festlegung von Schwellenwerten in ABIScreen muss breit abgestützt sein. Diese steht noch aus und sollte im Rahmen einer Expertengruppe diskutiert werden (siehe 2.6.2 für Erläuterungen).

9. Einberechnung Abwasservolumina bei Einordnung von Toxizitätswerten (in Planung)

Das Abwassermanagement in den unterschiedlichen Branchen sowie bei verschiedenen Betrieben innerhalb einer Branche unterscheidet sich zum Teil erheblich. Dies führt wiederum zu qualitativ und quantitativ anderen Betriebsabwässern, die in die ARA eingeleitet werden. In manchen Betrieben wird darauf Wert gelegt, ein möglichst geringes Volumen an Abwasser zu generieren (z.B. durch Verdampfen, Membranfilter). In diesen Betrieben ist davon auszugehen, dass kleinere Mengen Abwasser aus den Produktionsprozessen anfallen, diese aber vermutlich eine höhere Belastung aufweisen. Aufgrund der Vorgaben in der Gewässerschutzverordnung (GSchV) darf eine Verdünnung dieser Abwässer nicht vorgenommen werden, um die Anforderungen an die Einleitung einzuhalten («Verdünnungsverbot» gemäss GSchV Anhang 3.2).

Aus diesem Grund ist es wichtig, dass ein gutes und effizientes Abwassermanagement nach Stand der Technik in den Betrieben nicht negativ belegt wird, wenn dadurch kleinere aber stärker konzentrierte Abwasservolumina generiert werden, die wiederum stärkere hemmende Effekte in den Biotaests auslösen können. An dieser Stelle muss aber darauf hingewiesen werden, dass hoch konzentrierte Abwasserproben aufgrund von höheren DOC- und Leitfähigkeitswerten in ABIScreen meist verdünnt, weshalb die Berücksichtigung der Volumina wiederum weniger relevant sein könnte.

Derzeit wird evaluiert, ob es eine Lösung darstellen könnte, die unterschiedlichen Volumina bei den noch festzulegenden Schwellenwerten in ABIScreen einzurechnen. Die FHNW wird sich im Jahr 2022 damit beschäftigen, welche Relevanz unterschiedliche Abwasservolumina auf die Toxizitätserhebung ausüben und ein geeignetes Vorgehen zur Einberechnung der Abwasservolumina bei der Einordnung der *Toxic Units* vorschlagen.

3.3 Toxizitätsvergleiche Abbaustest

Zur Abschätzung der Abbaubarkeit ist in der Praxis der Zahn-Wellens-Test ZWT (nach OECD 302b; siehe 2.1.1) weit verbreitet. Dieser ist ursprünglich entwickelt worden, um das Abbaupotential von Einzelsubstanzen zu testen und dauert 28 Tage. Der an der FHNW neu entwickelte Alternative Inhärente Abbaustest AIA (siehe 2.1.2) fährt jedoch einen anderen Ansatz und versucht, die Bedingungen auf der ARA innerhalb einer kürzeren Testdauer realistischer abzubilden (siehe Schäfer und Thomann 2021).

Bei der Anwendung von ABIScreen mit unterschiedlichen Abwasserproben eines Sonderabfallentsorgers bzw. von diversen chemisch-pharmazeutischen Betrieben konnte aufgezeigt werden, dass die abgebauten Proben aus den beiden Abbaustests zum Teil zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in den Biotests führten. Steigende Toxizitätswerte konnten dabei grundsätzlich nicht mit einem erhöhten Anteil organischer Rückstände (ROC) korreliert werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass spezifische Substanzen oder Substanzmischungen mehr als der ROC-Gehalt für die Unterschiede in der Toxizität verantwortlich sind. Eine fehlende Korrelation zwischen steigendem DOC und Toxizität wurde auch in der ersten industriellen Biostest Screeningstudie von Otto et al. beobachtet (Otto et al. 2020). Als Erklärungsansatz für die gemessenen Toxizitätsunterschiede könnten sowohl Abweichungen in der Testdauer und der Belebtschlammmenge zwischen den beiden Testansätzen herangezogen werden.

Die längere Testdauer über 28 Tage im ZWT ermöglicht verbesserte Adaptationsbedingungen der Biologie des Belebtschlamms an die Abwasserinhaltsstoffe, was die Zersetzung von komplexen Substanzzusammensetzungen begünstigen könnte. Im AIA dagegen wird durch die grössere Belebtschlammmenge eine verbesserte Sorption von Stoffrückständen an den Schlamm erwartet, weshalb folglich weniger Stoffe in der Probe zurückbleiben würden. Theoretisch müssen diese beiden Faktoren dazu führen, dass unterschiedliche Zusammensetzungen von Stoffrückständen in den abgebauten Abwasserproben zurückbleiben. Die gemessenen Unterschiede in den Toxizitätstests sind dann der Beweis dafür, dass die stoffliche Zusammensetzung auch in der Realität unterschiedlich ist.

Es ist sehr interessant zu sehen, dass je nach Branche (Sonderabfallentsorgung vs. chemisch/pharmazeutische Industrie) entweder Proben nach dem ZWT oder dem AIA eine höhere Toxizität induzierten, weshalb keine abschliessende Präferenz ausgesprochen werden kann.

Letztendlich ist für die Anwendung von ABIScreen relevant abzuschätzen, welcher Abbaustest die Prozesse und Abbaueffizienz auf der ARA realistischer abbildet. Für die künftige Implementierung in ABIScreen müssen demnach vergleichende Untersuchungen vorliegen, die aufzeigen, welcher Abbaustest realistischer an die Bedingungen auf der ARA kommt. An der FHNW sind Versuche zum Vergleich der beiden Abbaustestansätze mit den Abbauprozessen einer Pilotkläranlage geplant, die mit Biotestuntersuchungen begleitet werden. Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen stehen aktuell durch technische Probleme in der Versuchskläranlage der FHNW noch aus. Erste Ergebnisse zu den vergleichenden Untersuchungen werden zu Beginn des Jahres 2022 erwartet.

3.4 Dienstleistungslabors für die Durchführung von ABIScreen-Untersuchungen

In der Schweiz (und Umgebung) führen nur wenige Labors im Auftrag Biotests durch. Eine Auswahl an Dienstleistungslabors, die bereits Abbaustests (vornehmlich den ZWT) durchführen und/oder die Biotestbatterie nach ABIScreen anwenden, findet sich in Tabelle 4. Der Algentest mit Abwasser auf der Mikroplatte (siehe 2.4.1.1) ist in den meisten Laboren noch nicht etabliert. Hintergrund ist hier, dass es sich bei der Testguideline erst um eine Draftversion handelt, die von Auftragslabors meist erst etabliert wird, wenn die finale Version (vrs. im Frühling 2022) veröffentlicht wird.

Tabelle 4 Übersicht von Dienstleistungslaboren in der Schweiz und Umgebung, die Abbautests und/oder Biotests gemäss ABIScreen anbieten oder diese planen.

DIENSTLEISTUNGSLABOR	STANDORT	ANGEBOTENE TESTS	KOSTEN (VRS.)	KONTAKT
ARCADIS SCHWEIZ AG	Schlieren, ZH	<p>Abbautests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ZWT OECD 302B+C - OECD 301A+B+D+E+F - 21d Abwassertest - Kurzzeittest gemäss ISO 9888 - AIA (Bereitschaft zur Etablierung wurde angedeutet) <p>Biotests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daphnientest (ISO 6341) - Leuchtbakterientest (ISO 11348-3) - Algentretest (auf Mikroplatte noch nicht etabliert, aber bereit diesen aufzunehmen) 	Noch keine Angaben möglich, da definitiver Aufwand nicht feststeht	www.arcadis.com/ Ansprechpersonen: Anja Liedtke (anja.liedtke@arcadis.com), Philippe Matter (philippe.matter@arcadis.com)
HYDROTOX GMBH	Freiburg, DE	<p>Abbautests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zahn-Wellens-Test (ISO 29888 / OECD 302 B) - Weitere auf Anfrage <p>Biotests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daphnientest (ISO 6341:2012) - Leuchtbakterientest (ISO 11348-2) - Algentretest (mit <i>D. subspicatus</i>, auch auf Mikroplatte) 	Noch keine Angaben möglich, da definitiver Aufwand nicht feststeht	info@hydrotox.de www.hydrotox.de/
SOLUVAL SANTIAGO	Couvet, NE	<p>Biotests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daphnientest (ISO 6341) - Leuchtbakterientest (ISO 11348-3) - Algentretest (auf Mikroplatte etabliert) 	Noch keine Angaben möglich, da definitiver Aufwand nicht feststeht	Ansprechperson: Serge Santiago (ssantiago@bluewin.ch; Tel 032 863 43 60)
XENOMETRIX	Allschwil, BL	<p>Biotests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ames-Test (mit Extraktprobe) 	Ca. CHF 1200.- / Probe mit bereits extrahierten Proben	www.xenometrix.ch info@xenometrix.ch

4 Outlook

Die Anwendung des ABIScreen Tools bei Proben aus zwei Industriebranchen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Durchführung wurden aber neue Herausforderungen und Notwendigkeiten identifiziert. Im weiteren Projektverlauf sind deshalb noch einzelne Optimierungen für die Anwendung der ABIScreen-Methodik geplant. Verbesserungspotential gibt es vor allem bei der Durchführung des Algentests sowie allenfalls des Leuchtbakterientest (aufgrund der starken Messvarianz und der Farbproblematik) (3.2).

Für alle drei Biotestsysteme ist es für die Akzeptanz des ABIScreening Tools relevant, aufzuzeigen, wie gut die Ergebnisse der Test reproduzierbar sind. Die Reproduzierbarkeit der Biotestdaten wird voraussichtlich im Frühling 2022 durch wiederholende Untersuchungen von Proben an der FHNW und wenn möglich auch innerhalb eines Ringtests mit weiteren Dienstleistungslabors (siehe 3.4) angegangen.

Ein weiterführendes Ziel ist es, die Untersuchungen auf weitere Branchen und Betriebe auszuweiten, welche gemäss Situationsanalyse des VSA (Wunderlin und Gulde 2021) als relevant für den Eintrag von Schadstoffen in die Gewässer identifiziert wurden. Nachdem weitere Daten generiert wurden, ist eine breit abgestützte Festlegung von Schwellenwerten zu Einordnung der Toxizitätswerte mit einer Berücksichtigung der anfallenden Abwasservolumina möglich und sinnvoll. Für die Anwendungsmöglichkeiten von ABIScreen und insbesondere für die Festlegung der Schwellenwerte soll eine Expertengruppe gebildet werden, in deren Austausch letzte offene Fragen identifiziert werden sollen. Der Austausch mit der Expertengruppe wird im Jahr 2022 angezielt.

Abschliessend werden Ende 2022/Anfang 2023 zwei Aqua&Gas-Artikel über die Übersichtsstudie und über die Anwendung von ABIScreen mit Ergebnissen der untersuchten Proben publiziert. Diese Artikel werden gemeinsam mit einer Publikation über den neu-entwickelten Alternativen Inhärenzen Abbaustest AIA von Schäfer und Thomann erscheinen.

5 Literaturverzeichnis

BUWAL (1999): Sites contaminés - Estimation de la mise en danger. Application de tests éco-toxicologiques à des lixiviats de sites pollués. Hg. v. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft. Bern.

Fent, Karl (2013): Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie ; 63 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Klaus, Xenia; Langer, Miriam (2021): Einsatz von Biotests für die Charakterisierung von Industrieabwasser in der Schweiz. Übersichtsstudie. unveröffentlicht.

Otto, Johanna; Matter, Philippe; Jost, Livia; Langer, Miriam; Götz, Christian; Gulde, Rebekka; Zimmermann-Steffens, Saskia (2020): Abbau- und Biotests in Industrieabwässern. Erste Schweizer Screeningstudie zur Erfassung der Toxizität und stofflichen Belastung. In: *Aqua & Gas* 10 (58–65).

Santiago, Sergio (2002): Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Groupe de travail Tests écotoxicologiques de la Commission internationale pour la protection des eaux du Léman (CIPEL).

Schäfer, Roman; Thomann, Michael (2021): Entwicklung eines reproduzierbaren und zeiteffizienten Abbautests für Industrieabwasser. Projektbericht unveröffentlicht. Hg. v. Fachhochschule Nordwestschweiz FHNW. Muttenz.

Stucki, Gerhard (2000): Zur Aussagekraft des biologischen Abbautests nach Zahn-Wellens zum Schicksal von chemischen Abwässern in Industriekläranlagen. Erfahrungen aus der chemischen Industrie. In: *gwf-Wasser/Abwasser* 141 (10), S. 662–669.

Wunderlin, Pascal; Gulde, Rebekka (2021): Stoffeinträge aus Industrie und Gewerbe in Gewässer. Situationsanalyse. Bericht unveröffentlicht. Hg. v. Verband Schweizer Abwasser- und Gewässerschutzfachleute (VSA). Glattbrugg.

Anhang

TESTORGANISMUS	PARAMETER	EFFEKTKONZENTRATION EC _x	EC _x	GRENZWERTE
DAPHNIA MAGNA	DOC [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	2488 2472 2442	400 mg/l (Zahn-Wellens-Test)
	NH ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	2 mg/l (GSchV)
	NO ₂ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	12.26 7.16 5.07	0.3 mg/l (GSchV)
	SO ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	1482 1366 1302	Deutsche AbwV (§ 6) sieht 2 g/l als organismusspezifische Wirkchwelle für Gehalt an Sulfat+Chlorid vor.
	DOC [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	400 mg/l (Zahn-Wellens-Test)
	NH ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	2 mg/l (GSchV)
	NO ₂ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	0.3 mg/l (GSchV)
	SO ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	Deutsche AbwV (§ 6) sieht 0.7 g/l als organismusspezifische Wirkchwelle für Gehalt an Sulfat+Chlorid vor.
	DOC [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- 4500 1877	400 mg/l (Zahn-Wellens-Test)

NH ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	218.8 128.5 94.17	2 mg/l (GSchV)
NO ₂ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	0.3 mg/l (GSchV)
SO ₄ [mg/l]	EC ₅₀ EC ₂₀ EC ₁₀	- - -	Deutsche AbwV (§ 6) sieht 15 g/l als organ- musspezifische Wirkchwelle für Gehalt an Sul- fat+Chlorid vor.