

Organische Beschichtungen im Schweizer Stahlbau und deren Ökotoxizität

Laborversuche zur Auswaschung und biologischen Wirkung



13. August 2015

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)
Sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV)
Su mandato dell'Ufficio federale dell'ambiente (UFAM)
Commissioned by the Federal Office for the Environment (FOEN)

Auftraggeber

Bundesamt für Umwelt BAFU
Abteilung Luftreinhaltung und Chemikalien
3003 Bern
Schweiz

Referenz-Nr. REF-11000 1584
Kreditnummer: A 2111.0239 Umweltforschung + Bildung

Auftragnehmer

- HSR Hochschule für Technik Rapperswil,
Institut für Umwelt- und Verfahrenstechnik (UMTEC)
8640 Rapperswil, Schweiz
- Oekotoxzentrum Eawag-EPFL
Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
8600 Dübendorf, Schweiz

Autoren

- Michael Burkhardt, Conrad Dietschweiler
HSR Hochschule für Technik Rapperswil,
E-Mail: michael.burkhardt@hsr.ch
- Etienne Vermeirssen, Barbara Ganzer, Andrea Schifferli, Inge Werner
Oekotoxzentrum Eawag-EPFL,
E-Mail: etienne.vermeirssen@oekotoxzentrum.ch

Zitiervorschlag: Burkhardt, M, Dietschweiler, C, Ganzer, B, Schifferli, A, Werner, I, Vermeirssen, E (2015): Organische Beschichtungen im Schweizer Stahlwasserbau und deren Ökotoxizität.

Hinweis

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

Fotonachweis Titelblatt: R. Baier, Bundesanstalt für Wasserbau (BAW), Karlsruhe, Deutschland

Zusammenfassung

Ohne langlebigen und funktionsfähigen Korrosionsschutz würden viele Stahlbauteile für den Hoch- und Wasserbau nach wenigen Jahren ihre Festigkeit verlieren. Dafür eingesetzte organische Schutzbeschichtungen bestehen vor allem aus Kunstharzen (Epoxydharz, Polyurethan), Gummierungen und Kunststoffen (PVC), die als Systemaufbauten angeboten und flüssig appliziert werden. Für das Schweizer Bundesamt für Umwelt (BAFU) wurden eine Marktrecherche zu organischen Beschichtungsprodukten im Stahlhochbau und Stahlwasserbau, Laboruntersuchungen zur Auswaschung und Biotests zur Abschätzung der Ökotoxizität mit vier Marktprodukten durchgeführt. Die Biotests umfassten den L-YES und CALUX-Tests zur Bestimmung der hormonellen Aktivität, und Leuchtakterien-, Ceriodaphnien- und Algen-Tests, um unspezifische Wirkmechanismen abzuleiten.

Ein Jahresverbrauch von 315 bis 490 Tonnen Korrosionsschutzmittel wurde ermittelt. Mit 40 bis 60 % Marktanteil sind Epoxydharze die wichtigsten organischen Korrosionsschutzmittel, gefolgt von 2K-Polyurethane und 1K-Polyurethane (Polyharnstoffe) bzw. Kunstharz-Kombinationen. Bei den Epoxydharzen bestehen die Polymerharze oft aus Gemischen von Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) und Bisphenol-F-diglycidylether (BFDGE). Wird Bisphenol A (BPA) dem Härter zur Modifikation zugesetzt, sollte es im Sicherheitsdatenblatt angegeben sein.

Bei Produkt 1 und 2 wurden unabhängig von der Trocknungsdauer der Prüfkörper (1 Tag oder 7 Tage) nur 1 µg/L (Bestimmungsgrenze) bis 2 µg/L BPA und Bisphenol F (BPF) sowie BADGE und deren hydrolysierten Varianten im Eluat nachgewiesen. Bei Produkt 3 betrug die BPA-Konzentration 6'890 µg/L bzw. 10'400 µg/L (0.69 mg/m² bzw. 1.04 mg/m²), jedoch liessen sich keine BADGE-Varianten bestimmen. In diesem Falle ist der fehlende Nachweis auch beeinflusst durch die hohe Bestimmungsgrenze von 100 µg/L. Der BPA-Gehalt in Probe 3 erklärt fast 25 % vom gemessenen TOC. Die BPA-Konzentrationen liegen bis zu 7000fach über dem vom Oekotoxzentrum Eawag-EPFL vorgeschlagenen Grenzwert von 1.5 µg/L. Bei Produkt 4 lagen die BPA- und BPF-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 1 µg/L, jedoch wurden vergleichsweise hohe Konzentrationen der drei BADGE-Varianten ermittelt.

Sehr auffällig ist die hohe Toxizität im Biolumineszenz-Test von Produkt 1. Diese Toxizität liess sich nicht direkt einer Substanz zuordnen. Die hormonelle Wirkung im Eluat von Produkt 1 ist nicht über BPA erklärbar, sodass die Ursache ebenfalls ungeklärt bleibt. Produkt 2 zeigte nur im Ceriodaphnien-Test einen geringen toxischen Effekt. Produkt 4 war in allen Biotests unauffällig. Produkte 2 und 4 waren insgesamt deutlich weniger toxisch als Produkte 1 und 3. Bei Produkt 3 dürfte sich der Effekt im L-YES und ER α -CALUX (östrogene Wirkungstests) und anti-AR-CALUX (anti-androgene Wirkungstest) durch die hohe BPA-Konzentration erklären lassen. BPA erklärt jedoch nur teilweise die hohe Toxizität von Produkt 3 im Ceriodaphnien-Test. Gemäss Schweizer Modulstufen-Konzept werden 0.4 ng/L als 17 β -Estradiol Äquivalent-Grenzwert für endokrine Stoffe vorgeschlagen. Dafür müsste das Eluat von Produkt 1 um das 60fache und das von Produkt 3 um das 1400fache verdünnt werden.

Das DIBt-Schema zur Bewertung von Eluaten aus Baumaterialien erweist sich als vielversprechender Ansatz für die Einordnung der Biotest-Resultate für organische Beschichtungen im Stahlhochbau und Stahlwasserbau. Der Abschätzung liegen Elutionsversuche zugrunde, die mit 10 L/m² eine geringe Wassermenge und daher ein Worst-Case-Szenario bezogen auf die Praxis darstellen. In der Realität sind starke Verdünnungen in vielen Anwendungsbereichen des Stahlwasserbaus zu erwarten, wofür eine Übertragungsfunktion für die untersuchte Produktkategorie erforderlich ist. Dennoch ist das Vorgehen geeignet, eine erste Orientierung zur Auswaschung und Ökotoxizität zu geben.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	ZIEL	2
3	GRUNDLAGEN ZUM KORROSIONSSCHUTZ	2
4	MARKTRECHERCHE ORGANISCHE KORROSIONSSCHUTZMITTEL	5
4.1	VORGEHEN.....	5
4.2	RESULTATE UND DISKUSSION.....	5
4.2.1	Marktanteile	5
4.2.2	Verbrauchsmengen	6
4.2.3	Applikationsarten	7
5	ELUTIONSVERSUCHE	8
5.1	VORGEHEN.....	8
5.2	RESULTATE UND DISKUSSION.....	10
5.2.1	Gewichtsänderung	10
5.2.2	Chemische Analysen der Wasserproben	10
6	BIOTESTS.....	12
6.1	VORGEHEN.....	13
6.1.1	L-YES – Lyticase-basierender Yeast Estrogen Screen	13
6.1.2	CALUX-Tests – Chemical Activated LUCiferase gene eXpression	14
6.1.3	Kombinierter Algentest mit einzelligen Grünalgen	15
6.1.4	Leuchtbakterientest mit Aliivibrio fischeri	15
6.1.5	Chronischer Reproduktionstest mit Wasserflöhen	16
6.1.6	Mittlere effektive Konzentrationen für Bisphenol A und Bisphenol F	17
6.2	RESULTATE UND DISKUSSION.....	18
6.2.1	L-YES	18
6.2.2	CALUX-Test	20
6.2.3	Leuchtbakterientest.....	22
6.2.4	Chronischer Reproduktionstest mit Wasserflöhen	23
6.2.5	Kombinierter Algentest mit einzelligen Grünalgen	24
7	BEWERTUNG DER BIOTESTS FÜR LEUCHTBAKTERIEN, WASSERFLÖHE UND ALGEN	25
8	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	28
9	LITERATUR	30
10	ANHANG	32

1 Einleitung

Unter Korrosion versteht man die elektrochemische Reaktion eines metallischen Werkstoffs mit seiner Umgebung (Wasser, Sauerstoff, Chloride), die eine Veränderung des Werkstoffs bewirkt und zu einer Beeinträchtigung der Funktion führen kann. Zweck des Korrosionsschutzes ist deshalb der Schutz des Werkstoffs zur Erhaltung der ursprünglichen Oberflächeneigenschaften und des Aussehens. Der Korrosionsschutz soll insbesondere die Oxidation verhindern und gegen den Witterungseinfluss, aber auch zusätzliche Belastungsfaktoren wie Salz und Kondenswasser, schützen. Neben den klimatischen Bedingungen kommen im Stahlwasserbau auch Wasserwechsel- oder Dauerwasserbelastungen hinzu. Die Dauerhaftigkeit ist deshalb von grosser Bedeutung. Ohne langlebigen und funktionsfähigen Korrosionsschutz würden viele Stahlbauteile bereits nach wenigen Jahren ihre Festigkeit verlieren, dagegen ist ein korrosionsgeschützter Werkstoff bis zu 25 Jahren beanspruchbar (Bartels, 2014).

Die Korrosion von Stahlbauteilen wird durch verschiedene Verfahren unterbunden. Dazu zählen neben konstruktiven Massnahmen der kathodische Korrosionsschutz, anorganische Überzüge und organische Beschichtungssysteme (Abbildung 1). Zu den anorganischen Überzügen gehören Beschichtungen aus Zink, Kupfer, Nickel, Chrom oder Aluminium, die ihrerseits eine schützende Passivierungsschicht ausbilden und das darunterliegende Werkstück schützen. Organische Beschichtungen bestehen vor allem aus Kunstharzen (Epoxidharz, Polyurethan), Gummierungen und Kunststoffen (PVC), die flüssig appliziert werden. Zusätzlich existieren noch Duplex-Systeme, die aus einem anorganischen Überzug und einer organischen Beschichtung bestehen. Dadurch wird eine grössere Schutzdauer erzielt, als es die Summe der einzelnen Verfahren erwarten lässt (BVK, 2010).

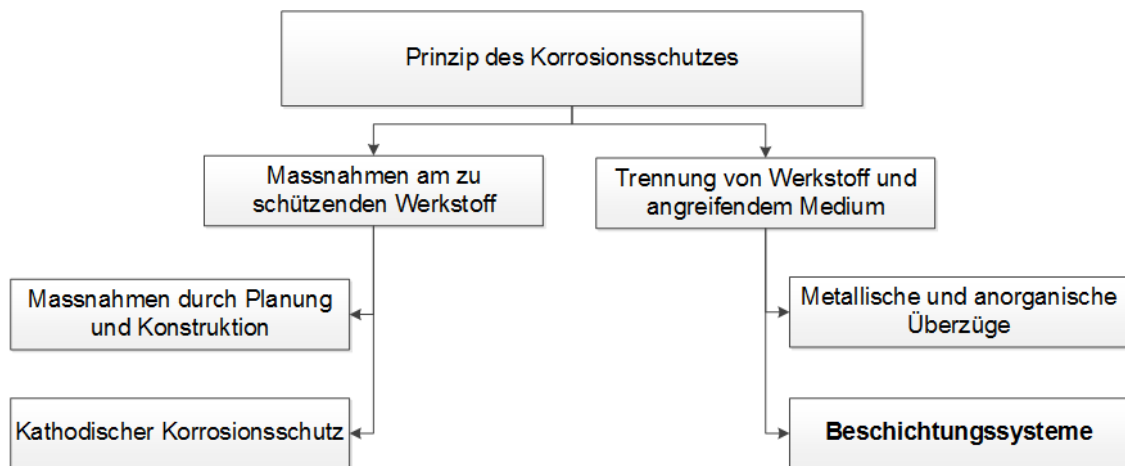


Abbildung 1: Verfahren zur Verhinderung von Korrosion an Stahlbauten (BVK, 2010).

Herkömmliche Prüfungen von Beschichtungsstoffen für den Korrosionsschutz im Stahlwasserbau fokussieren in erster Linie auf die Korrosionsschutzwirkung, Abriebbeständigkeit, Wasseraufnahme, Langzeitbeständigkeit und Verträglichkeit mit dem kathodischen Korrosionsschutz (Baier, 2013). Für den Stahlwasserbau werden auch Bewuchsstudien unter realen Anwendungsbedingungen durchgeführt. Der stofflichen Zusammensetzung und der Auswaschbarkeit von Inhaltsstoffen sowie deren Wirkung auf aquatische Organismen wurde bis anhin eher wenig Beachtung geschenkt.

2 Ziel

Für das Schweizer Bundesamt für Umwelt (BAFU) wurde eine Marktrecherche zu organischen Beschichtungsprodukten im Schweizer Stahlhochbau und Stahlwasserbau, Laboruntersuchungen zur Auswaschung und Biotests zu Abschätzung der Ökotoxizität durchgeführt. Der Bericht gliedert sich deshalb in drei Teile.

1. Marktrecherche organische Korrosionsschutzmittel: Mittels Befragung und Interviews wurden z. B. Korrosionsschutzsysteme, Verbrauchsmengen, Applikationsverfahren, Inhaltsstoffe erhoben.
2. Elutionsversuche: Ausgewählte Produkte wurden in einem Auswaschtest eluiert und die Wasserproben chemisch analysiert.
3. Biotests: Mit den L-YES und CALUX-Tests wurden hormonelle Aktivitäten und mit den Leuchtbakterien-, Ceriodaphnien- und Algen-Tests unspezifischen Wirkmechanismen einzelner Wirkstoffe wie auch Beschichtungsprodukten untersucht und als Dosiswirkungskurven aufgenommen.

3 Grundlagen zum Korrosionsschutz

Für die Langlebigkeit korrosionsgeschützter Werkstoffe sind die Vorbehandlung und die richtige Auswahl der Beschichtungssysteme essentiell. Die geeignete Vorbehandlung der Oberfläche, das Entfernen von Verunreinigungen von der zu beschichtenden Stahloberfläche, die Auswahl der Beschichtungsprodukte sowie die Qualitätskontrolle sind in folgenden Normenwerken hinterlegt:

- EN ISO 8501: Visuelle Beurteilung der Oberflächenreinheit
- EN ISO 8502: Prüfung zur Beurteilung der Oberflächenreinheit
- EN ISO 8503: Rauheitskenngrößen von gestrahlten Oberflächen
- EN ISO 8504: Verfahren für die Oberflächenvorbereitung (Strahlen oder Abbeizen)
- EN ISO 12944: Korrosionsschutz von Stahlbauten durch Beschichtungsstoffe.

Die Anwendungsbereiche von Korrosionsschutzmitteln im Stahlbau werden durch Korrosivitätskategorien gemäss EN ISO 12944-2 festgelegt. Die zwei Hauptkategorien, „C“ für atmosphärische und „Im“ für wässrige und erdige Umgebungsbedingungen, lassen sich in neun Unterkategorien aufteilen (Tabelle 1). Die Auswahl eines Beschichtungssystems wird durch Exposition (z. B. durch Luft, Wasser, Erdreich), Belastungsintensität (z. B. durch Industrieabgase, Salz, Spritzwasser), Nutzungsdauer und optischen Eindruck des Bauwerks bestimmt (BVK, 2013). Basierend auf den Tabellen der EN ISO 12944-5 lässt sich das optimale Beschichtungssystem in Bezug auf Umgebungsbedingungen und geforderte Schutzdauer auswählen.

Organische Korrosionsschutzbeschichtungen werden als Ein- und Mehrschichtsysteme eingesetzt, die je nach System zwischen 450 bis 2000 µm Schichtdicke aufweisen. Mehrschichtsysteme bestehen in der Regel aus einer Grund-, Zwischen- und Deckbeschichtung. Die organische Grundbeschichtung ist mit Zinkstaub, Aluminiumstaub, Eisenglimmer u.a. ausgerüstet, und ca. 50 bis 150 µm dick. Die Zwischenbeschichtung unterstützt die Korrosionsschutzwirkung durch Schichtdicke und funktionelle Füllstoffe. Die

Deckbeschichtung kann zusätzlich mit Additiven oder Farbpigmenten ausgerüstet sein, da die äussere Schicht die optischen Eigenschaften, z. B. Farbgebung, Glanz- und Reflexionsverhalten, beeinflusst (BVK, 2013; Bartels, 2014). Eine zu geringe Schichtdicke kann sich negativ auf die Schutzwirkung auswirken, eine zu hohe Schichtdicke zu Problemen bei der Aushärtung und der Haftfestigkeit führen (insbesondere bei lösemittelhaltigen Systemen). Die empfohlene Schichtdicke der Einzelschichten und des Gesamtsystems lässt sich aus den technischen Datenblättern der Hersteller entnehmen.

Tabelle 1: Übersicht zu den Korrosivitätskategorien und möglichen Anwendungsbereichen im Korrosionsschutz (BVK, 2013).

Korrosivitätskategorie		Beispiele
C1	unbedeutend	Nur innen: Geheizte Gebäude mit neutraler Atmosphäre
C2	gering	Ländliche Bereiche, ungeheizte Gebäude, in denen Kondensation auftreten kann, z. B. Lager, Sporthallen
C3	mässig	Stadt- und Industriatmosphäre mit mässiger Luftverunreinigung, Küstenbereiche mit geringer Salzbelastung, Produktionsräume mit hoher Luftfeuchte und geringer Luftverunreinigung (z. B. Lebensmittelherstellung, Wäschereien, Brauereien)
C4	stark	Industrielle Bereiche, Küstenbereiche mit mässiger Salzbelastung, Chemieanlagen, Schwimmbäder
C5-I	sehr stark (Industrie)	Industrielle Bereiche mit hoher Luftfeuchte und aggressiver Atmosphäre
C5-M	sehr stark (Meer)	Küsten- und Offshore-Bereiche mit hoher Salzbelastung, Gebäude mit nahezu ständiger Kondensation und starker Luftverunreinigung
Im1	Süsswasser	Flussbauten, Wasserkraftwerke
Im2	Meer- / Brackwasser	Hafenbereiche mit Stahlbauten, Schleusentoren, Molen, Offshore-Anlagen
Im3	Erdreich	Behälter im Erdbereich, Stahlspundwände, Stahlrohre

Der Beschichtungstyp wird durch das Bindemittel festgelegt. Als Bindemittel kommen Epoxydharze, 2K-Polyurethan, Kunstharz-Kombinationen, 1K-Polyurethane (Polyharnstoffe), Phenolharz und Poly(Vinyl)esterharze zum Einsatz.

Das Bindemittel von Reaktionsharzen besteht aus einem Harz und Härter, sofern sie nicht zu den 1K-Polyurethanen zählen. Als Härter werden verschiedene Amine, Amidoamine und Aminaddukte verwendet, die mit den Epoxyd-Gruppen des Harzes reagieren. Des Weiteren werden Säuren und sonstige H-aktive Verbindungen als Härter eingesetzt (UBA, 2010). Das Bindemittel bei Polyurethanbeschichtungen besteht aus Isocyanaten und Verbindungen mit Hydroxylgruppen (Polyole). Die Isocyanate reagieren mit Amino-Verbindungen unter Bildung von Polyharnstoff (Polyurea). Bei Polyesterbeschichtungen besteht das Bindemittel aus Polyesterverbindungen, die aus der Veresterung von mehrwertigen Alkoholen und Polycarbonsäuren entstehen. Die Vernetzung kann zum Beispiel mit Isocyanaten erzielt werden. Das Bindemittel von Poly(Vinyl)esterharzen besteht aus einem Epoxydharz, dass durch die Veresterung mit Acrylsäure oder Methacrylsäure hergestellt wird.

Bei den Epoxydharzen bestehen die Polymerharze aus Bisphenol A-diglycidylether (BADGE), Bisphenol F-diglycidylether (BFDGE) und anderen Glycidylethern mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Beide Rohstoffe sollten im Normalfall keine relevante Menge an Bisphenol A (BPA) bzw. Bisphenol (BPF) enthalten, sonst wird es im Sicherheitsdatenblatt angegeben. Eine solche Deklaration erfolgt, wenn BPA dem Härter zusätzlich als Additiv (wird nicht

chemisch eingebunden) beigegeben werden, um die Produkteigenschaften zu verbessern (z.B. lange Verarbeitbarkeit bei gleichzeitig beschleunigter Aushärtung des Produkts, verbesserte Oberflächeneigenschaften / Glanzeffekt auf der Oberfläche).

Die meisten Produkte haben gemeinsam, dass beim Anmischen das stöchiometrische Verhältnis zwischen Harz und Härter eingehalten werden muss (Ausnahme sind 1K-Polyurethane). Beim Verarbeiten wird dann BPA, welches bereits beim Herstellungsprozess der Rohstoffe bis maximal 10 ppm (gewöhnlich < 1 ppm) enthalten ist, chemisch so umgesetzt, dass BPA in die Polymerstruktur überwiegend chemisch fest gebunden ist. Wird das Mischungsverhältnis nicht beachtet, können Teile vom Harz bzw. Härter ohne Reaktionspartner verbleiben und somit freie funktionelle Gruppen vorliegen. Es ist auch möglich, dass die Vernetzung bei tiefen Temperaturen oder mangelhafter Durchmischung unvollständig abläuft. Ein Beispiel dafür liefern oligomere Epoxydharze. In der Regel reagieren die Amine als Vernetzer (BPADGE, BPFDE) sowie die Epoxy-Reaktivverdünner zusammen mit dem Aminhärter fast vollständig ab.

Wie bei allen chemischen Prozessen können technische Spuren von "freiem" BPA im endgültigen Polymer nachweisbar bleiben¹. Ausgangsstoff bei der Synthese von BADGE ist BPA und Epichlorhydrin – Die resultierenden Epoxidharze enthalten maximal ca. 10 ppm (gewöhnlich < 1ppm) an BPA. Bei der Synthese von BFDGE reagiert Formaldehyd mit Epichlorhydrin und Phenol – „BPF“ ist kein Ausgangsstoff, die Produktstruktur leitet sich aber davon ab (daher die Namensgebung)! Solche geringe Anteile an BPA und BPF migrieren mit der Zeit an die Oberfläche, weil sie nicht chemisch eingebunden sind. Freies BPA wiederum steht im Verdacht, hormonelle Effekte bei Lebewesen zu verursachen.

Neben dem Bindemittel (Harze und ggf. Härter) bestehen organische Beschichtungsstoffe hauptsächlich aus den folgenden Komponenten:

- Pigmente und Füllstoffe
- Organische Modifizierungsmittel
- Lösemittel bzw. Verdünnungsmittel
- Additive und Hilfsstoffe.

Berichtet wird gelegentlich, dass bei Stahlwasserbaubeschichtungen Biozide wie Chloracetamid, Diuron, Isothiazolinone oder Radikalfänger wie Hydrochinone den Produkten als Algenschutz hinzugesetzt werden. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Sämtliche Hersteller antworteten auf die Frage, ob sie Biozide in organischen Korrosionsschutzmitteln für den Stahlwasserbau oder -hochbau einsetzen, durchgehend mit NEIN.

Des Weiteren werden Füllstoffe wie Hohlkugeln aus Glas, Keramik, Talkum-Hohlkugeln oder Kunststoffen für die mechanische Stabilisierung und zur Verringerung der Dichte des Harzes hinzugegeben. Um die Abrasionsbeständigkeit der Oberfläche zu erhöhen, wird Quarzsand beziehungsweise keramisches Pulver hinzugefügt. Um die Viskosität zu erniedrigen sowie die Filmbildung und die Trocknungseigenschaften zu verbessern, werden Lösungsmittel (z. B. Xylol, Isobutanol, Lösungsmittelnaphtha) und organische Modifizierungsmittel (z. B. Benzylalkohol) zugesetzt (Baier, 2013).

¹ www.bisphenol-a-europe.org/de_DE/science-3

4 Marktrecherche organische Korrosionsschutzmittel

4.1 Vorgehen

Die Erfassung der relevanten Marktprodukte, deren Marktanteile, Verbrauchsmengen und Applikationsart für organische Korrosionsschutzmittel erfolgte durch Umfragen und Interviews. In der Befragung wurde das Jahr 2013 als Referenz gewählt.

Befragt wurden die zehn wichtigsten Hersteller in der Schweiz, Deutschland und Österreich, sowie der Verband der Schweizerischen Lack- und Farbenindustrie (VSLF). Zwei Hersteller sind auf dem Schweizer Markt kaum tätig, sodass diese keine Informationen zum Korrosionsschutzmarkt in der Schweiz liefern konnten. Sechs Firmen und der VSLF haben den Fragebogen beantwortet, sodass der Rücklauf erfreulich hoch war. Expertengespräche sind mit den wichtigsten Herstellern durchgeführt worden. Durch den direkten Austausch konnten offene Fragen zu den Verbrauchsmengen oder zur Verarbeitung geklärt werden. Weitere Informationen wurden bei der BG Bau gefunden (www.bgbau.de/gisbau/fachthemen/epoxi).

4.2 Resultate und Diskussion

4.2.1 Marktanteile

Die ermittelten Marktanteile von organischen Korrosionsschutzmitteln im Stahlwasserbau bzw. Stahlhochbau für das Jahr 2013 in der Schweiz bezogen auf den Gesamtverbrauch aller Korrosionsschutzmittel sind in Abbildung 2 dargestellt. Zu den wichtigsten organischen Korrosionsschutzmitteln, die im Stahlhochbau bzw. -wasserbau in der Schweiz eingesetzt werden, zählen mit 40 bis 60 % Marktanteil Epoxydharze (Abbildung 2).

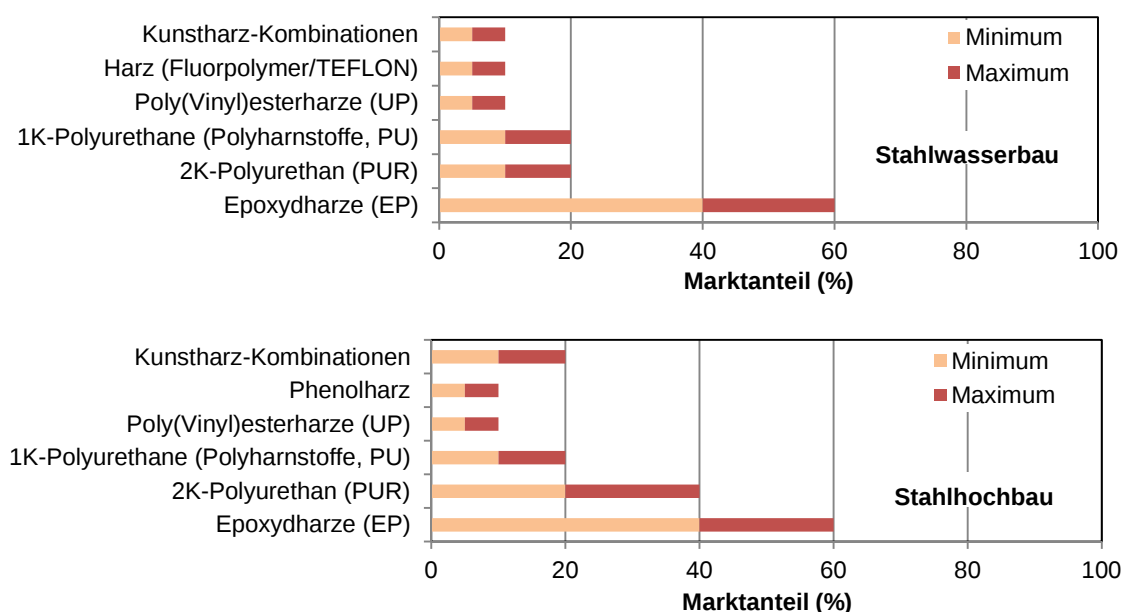


Abbildung 2: Marktanteil von organischen Korrosionsschutzmitteln im Stahlwasserbau (oben) und Stahlhochbau (unten) im Jahr 2013 in der Schweiz bezogen auf den Gesamtverbrauch.

Mit Abstand folgen im Stahlwasserbau 2K-Polyurethane und 1K-Polyurethane (Polyharnstoffe) mit je 15 bis 20 % Marktanteil. Im Stahlhochbau decken die 2K-Polyurethane 20 bis 40 % ab, gefolgt von 1K-Polyurethane und Kunstharz-Kombinationen mit je 15 bis 20 % Marktanteil. Die übrigen Beschichtungsmittel, wie Poly(Vinyl)esterharze, Harz (Fluorpolymer/TEFLON), Phenolharze und Polysiloxane, sind vergleichsweise unbedeutend.

4.2.2 Verbrauchsmengen

Im Stahlwasserbau werden die Epoxydharze mit einer Verbrauchsmenge von 60 bis 80 Tonnen pro Jahr mengenmässig am meisten eingesetzt (Abbildung 3, oben). Darauf folgen 2K-Polyurethane und 1K-Polyurethane (Polyharnstoffe) mit einer jährlichen Verbrauchsmenge von 10 bis 20 Tonnen. Bei den übrigen Korrosionsschutzmitteln Poly(Vinyl)esterharze, Phenolharze und Kunstharz-Kombinationen wurde ein Verbrauch von 5 bis 10 Tonnen pro Jahr ermittelt. Für die Beschichtungssysteme Harz (Fluorpolymer/TEFLON) und Polysiloxane konnten keine Mengenangaben ermittelt werden.

Die Verbrauchsmengen von Korrosionsschutzmitteln im Stahlhochbau sind in Abbildung 3 (unten) dargestellt. Im Stahlhochbau werden 80 bis 100 Tonnen Epoxydharze pro Jahr eingesetzt, sodass diese wie im Stahlwasserbau mengenmässig am wichtigsten sind. Die 2K-Polyurethane und Kunstharz-Kombinationen mit einem jährlichen Verbrauch von 40 bis 60 Tonnen folgen mit Abstand. Die anderen vier Korrosionsschutzmittel spielen mit je 5 bis 10 Tonnen pro Jahr eine untergeordnete Rolle.

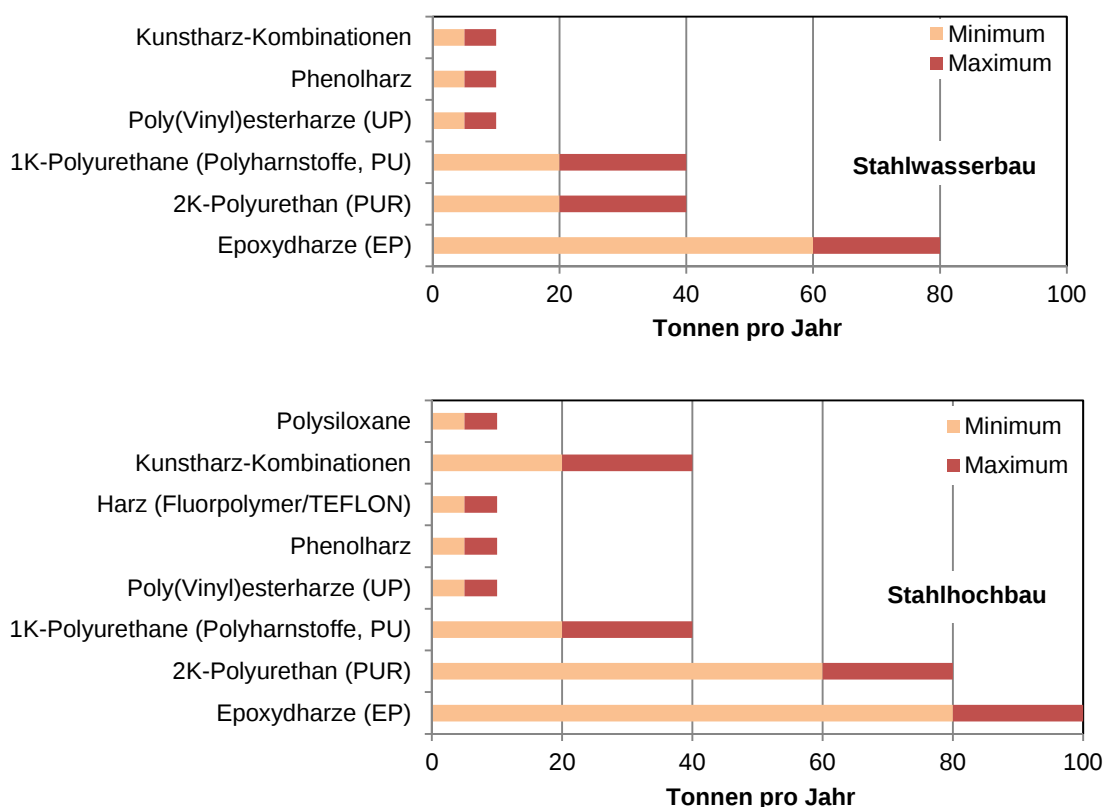


Abbildung 3: Verbrauchsmenge (Tonnen pro Jahr) von Korrosionsschutzmitteln im Stahlwasserbau (oben) und Stahlhochbau (unten) in der Schweiz im Jahr 2013.

In der Umfrage wurde ein Jahresverbrauch von 315 bis 490 Tonnen Korrosionsschutzmittel für den Stahlhochbau und Stahlwasserbau ermittelt. Davon decken Epoxydharze 140 bis 180 Tonnen pro Jahr ab, d.h. rund die Hälfte der gesamten Verbrauchsmenge. Unter der Annahme, dass durchschnittlich 0.5 kg/m² verarbeitet werden, wurde eine Fläche von 63'000 bis 98'000 m² mit organischen Beschichtungssystemen behandelt.

Der VSLF ermittelte für die drei dominanten Beschichtungssysteme Epoxidharze, 2-K-Polyurethane und 1-K-Polyurethane über sämtliche Anwendungsbereiche, von denen der Stahlwasserbau und Stahlhoch nur einen Teil umfasst, eine Verbrauchsmenge von 2600 Tonnen für das Jahr 2013. Demnach gelangen nur 10 bis 20 % der organischen Beschichtungsmittel in den Stahlhochbau und Stahlwasserbau, während die restlichen Mengen in andere Anwendungen wie Maschinenbau, Bodenbeschichtungen und Innenausbau (Mobiliar) gelangen.

Die Gesamtproduktion von BPA in der EU summiert sich auf ca. 1.15 Mio. Tonnen im Bezugsjahr 2005/2006, wobei die bis zu 16 verschiedenen Verunreinigungen mit Phenolstruktur ca. 10'000 Tonnen ausmachen (UBA, 2014). Von der BPA-Gesamtmenge wurden 192'000 Tonnen (ca. 17 %) für Epoxydharze eingesetzt. Andere Quellen berichten, dass 30 % vom europaweit eingesetzten BPA in Epoxylde gelangt².

Die Verbrauchsmenge von Korrosionsschutzmitteln im Stahlhochbau über die letzten 5 Jahre wurde von nahezu allen Befragten mit „stagnierend“ bezeichnet. Die Veränderung der Verbrauchsmenge im Stahlwasserbau dagegen wurde unterschiedlicher eingeschätzt. Ein Hersteller beurteilte die Mengenveränderung als „abnehmend“, zwei den Markt als „stagnierend“ und zwei als „wachsend“.

4.2.3 Applikationsarten

Das Applikationsverfahren von Korrosionsschutzmitteln hat Einfluss auf die Emissionen. Wie im Emissionsszenario für die Biozidprodukte der Produktart PA 8 (Holzschutzmittel) beschrieben ist, kann bei einer Sprüh-Anwendung von flüssigen Produkten mit einer Abdrift bis 6.9 m vom Gebäude gerechnet werden³. In einem anderen Szenario für die Roll-Anwendung werden Tropfverluste bis zu einer Entfernung von 10 cm vom Haus beschrieben.

In Abbildung 4 sind die Applikationsverfahren für Korrosionsschutzmittel im Stahlhochbau und Stahlwasserbau, welche durch Hersteller empfohlen werden, dargestellt. Die häufigste angewandte Applikationsart ist Airless-Spritzen, gefolgt von Streichen und Rollen. Ein Hersteller weist darauf hin, dass Airless-Spritzen mit grossem Abstand die wichtigste Applikationsart sei und Rollen und Streichen eher nur für sehr kleine Flächen oder Reparaturen eingesetzt werde. Nach Auskunft sämtlicher Hersteller wird Hochdruckspritzen nicht empfohlen.

² www.bisphenol-a-europe.org/de_DE

³ Das Modellhaus ist 2.5 m hoch, 17.5 m lang und 7.5 m breit. Für die Abschätzung der Emission wurde eine mittlere Windgeschwindigkeit von 4 m/s mit einer Sinkgeschwindigkeit der Tröpfchen von 2.5 m/s angenommen.

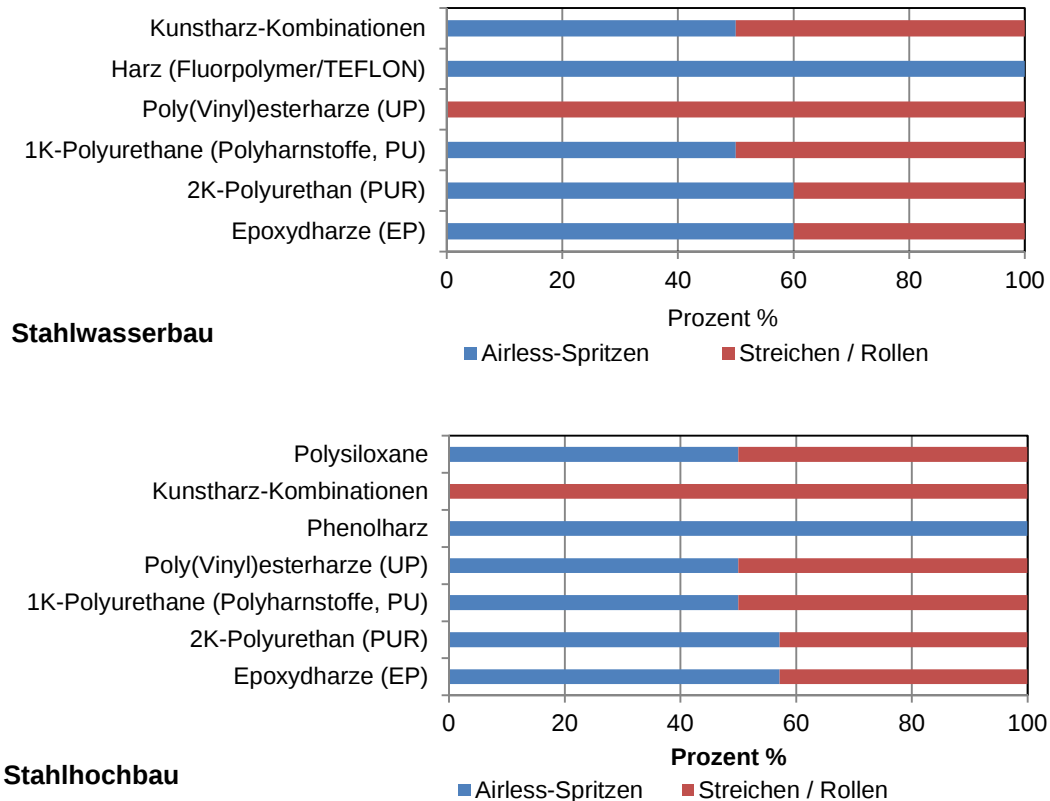


Abbildung 4: Applikationsverfahren für Korrosionsschutzmittel im Stahlwasserbau (oben) und Stahlhochbau (unten), welche den Kunden empfohlen werden.

5 Elutionsversuche

5.1 Vorgehen

Unter den von den Herstellern bereitgestellten Produkten wurde eine kleinere Auswahl getestet. Die Priorisierung erfolgte nach chemischen und mengenrelevanten Aspekten. Für die Stoffpriorisierung wurden die Stoffdatenblätter ausgewertet und bestimmte Hinweise, beispielsweise zu BPA (Verdacht, hormonelle Effekte bei Lebewesen), beachtet. Durch diese Recherche wurde die Vorauswahl von rund zehn Produkten auf vier Produkte (Produkt 1 - 4) verengt. Alle vier Produkte gehören zu den Epoxydharzen, sind auf dem Schweizer Markt im Einsatz und gehören auf der Zulassungsliste I (Binnengewässer) und II (Meerwasser und Boden) der Bundesanstalt für Wasserbau (BAW, Karlsruhe) als Deckbeschichtung zu System 5.

Die ausgewählten Beschichtungsprodukte wurden gemäss den technischen Datenblättern verarbeitet. Das Trägermaterial (Substrat) bestand aber aus Glasplatten mit 8 x 12.5 cm Grösse. In Vorversuchen zur Handhabung und Verarbeitbarkeit hat sich Glas als äusserst haftfähiges Trägermaterial herausgestellt (Anhang: Abbildung 15). Zwei Hersteller bestätigten, dass bei genügender Haftfähigkeit auch Glas geeignet sei. Im Gegensatz zu Metall ist Glas inert und setzt keine potentiell toxischen Bestandteile frei.

Da die ökotoxikologischen Effekte nur für die oberste Deckbeschichtungen ermittelt werden sollten, wurde nicht der gesamte Systemaufbau (z. B. 50 - 80 µm Zink-Grundierung und 400 - 450 µm Deckbeschichtung), sondern nur die Deckbeschichtung appliziert und eluiert. Ausserdem war die Glasplatte nur auf einer Seite beschichtet, entsprechend 100 cm² Fläche. Die benötigte Menge an Korrosionsschutzmittel (Harz und Härter) pro Trägermaterial wurde über die Dichte der einzelnen Komponenten berechnet, in den empfohlenen Massenverhältnissen gemischt und auf das Trägermaterial mit einem Pinsel aufgetragen. Als Kontrolle wurde die aufgetragene Masse während der Applikation gravimetrisch erfasst und über die Fläche und Dichte die Schichthöhe berechnet sowie mit den Soll-Schichtdicken verglichen. Für jede Probenserie wurde das Feucht- und Trockengewicht erfasst.

Die beschichteten Prüfkörper wurden über zwei verschiedene Zeitspannen getrocknet. Die eine Variante trocknete 24 h (doppelte Zeit für Begehbarkeit), diese Zeit entspricht der rund doppelten minimalen Trocknungszeit, und die andere Variante 7 Tage, womit die maximale Trocknungszeit abgedeckt ist. Mit den zwei Trocknungszeiten sollte geprüft werden, ob die Trocknungsdauer Einfluss auf die Ökotoxizität ausübt, d.h. bestimmte Produkte erst mit zunehmender Zeitdauer abreagiert sind und damit im Eluat nicht auftauchen.

Die beschichteten Prüfkörper wurden in abgedeckten Glasschalen in deionisiertem Wasser (Leitfähigkeit < 5 µS/cm, Temperatur 19 bis 25°C) während 7 Tagen auf einem horizontalen Schütteltisch bei 30 rpm im Dunkeln bewegt. Das Verhältnis des Wasservolumens zur Probenfläche betrug 10 L/m² (10 mm). Pro Auswaschversuch wurden somit 100 mL Eluat gewonnen. Um die für die Biotests benötigten Wasservolumina bereitzustellen, wurden von jedem Produkt 11 Ansätze durchgeführt. Nach Versuchsdurchführung wurden die hergestellten Wassereluate vereint und für die verschiedenen Analysen Teilproben in Glasflaschen abgefüllt. Die Endgewichte der Prüfkörper wurden gravimetrisch ermittelt, um Hinweise zur aufgenommenen Wassermenge zu erhalten.

In den Eluaten wurden der pH-Wert, die elektrische Leitfähigkeit und der totale organische Kohlenstoff (TOC) bestimmt. Das Ökotoxzentrum Eawag-EPFL setzte den L-YES (Östrogene) sowie die unspezifischen Tests mit Leuchtbakterien und Algen ein. Der unspezifische Test mit Ceriodaphnien wurde vom Labor Soluval Santiago und der CALUX-Test vom Labor BDS in den Niederlanden durchgeführt. Zusätzlich wurde eine chemische Analyse der Eluate auf BPA und BPF, sowie BADGE und dessen Hydrolyseprodukte BADGE x H₂O und BADGE x 2H₂O vom Labor Bachema durchgeführt. Die Proben wurden nach Direktinjektion mittels Flüssigchromatographie getrennt. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) simultan im positiven und im negativen Modus, die Detektion über Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die Konzentrationen wurden über eine externe Kalibration berechnet, wobei pro Analyt zwei Massenübergänge ausgewertet wurden. Zur Qualitätssicherung sind Blindwerte, Positivkontrollen und Aufstockungen von Proben mitgeführt worden.

5.2 Resultate und Diskussion

5.2.1 Gewichtsänderung

In Tabelle 2 sind die Gewichtsänderungen von den jeweils 11 Prüfkörpern pro Produkt (in Gramm) nach 1-tägiger und 7-tägiger Trocknungszeit aufgeführt. Die Massenunterschiede zwischen Trocken- und Feuchtgewicht sind minimal für alle vier Produkte und unabhängig von der Trocknungsdauer.

Tabelle 2: Feucht- und Trockengewichte (in Gramm) von den vier Produkten für die Varianten mit 1 Tag und 7 Tagen Trocknungszeit. Von jeder Trocknungsvariante wurden 11 Messwerte erhoben. Mittel: Mittelwert der 11 Messwerte; Std: Standardabweichung der 11 Messwerte.

Produkt	1 Tag Trocknung				7 Tage Trocknung			
	Feucht, Mittel (g)	Std (g)	Trocken, Mittel (g)	Std (g)	Feucht, Mittel (g)	Std (g)	Trocken, Mittel (g)	Std (g)
Produkt 1	9.6	0.3	9.5	0.3	9.5	0.2	9.5	0.2
Produkt 2	12.3	0.4	12.2	0.4	12.7	0.4	12.6	0.4
Produkt 3	5.9	0.2	5.8	0.2	6.0	0.1	6.0	0.1
Produkt 4	4.5	0.2	4.4	0.2	4.6	0.2	4.5	0.2

In Abbildung 5 sind die berechneten Schichtdicken der vier Produkte als Boxplots dargestellt. Die Schichtdicken von Produkt 1, 2 und 4 lagen im vom Hersteller empfohlenen Bereich. Die Schichtdicke von Produkt 3 übertraf zwar die empfohlene Dicke um 5 %, jedoch wurde die Abweichung als innerhalb der üblichen Toleranzen liegend eingestuft. Sämtliche Produkte nahmen über die 7-tägige Elutionsdauer nur 1 Gewichtsprozent zu.

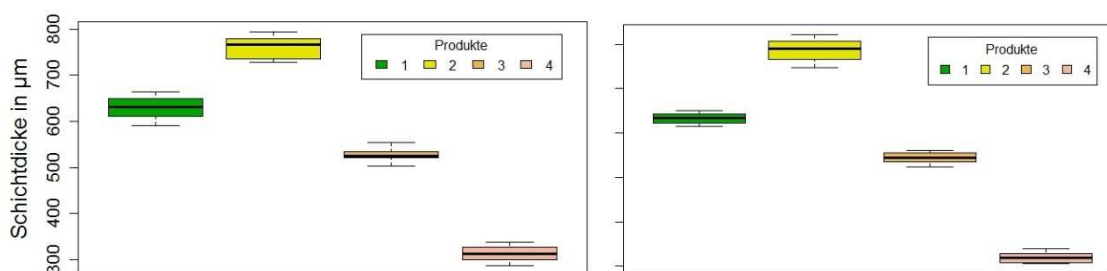


Abbildung 5: Berechnete Schichtdicke für die vier Produkte (11 Prüfkörper pro Produkt), welche für 1 Tag (links) und 7 Tage (rechts) ausgehärtet wurden.

5.2.2 Chemische Analysen der Wasserproben

Der pH-Wert lag in allen Mischproben sowie der Blindprobe zwischen 6 bis 7. Die elektrische Leitfähigkeit und die TOC-Konzentrationen sind in Tabelle 3 für die zwei Trocknungsvarianten dargestellt. Die höchste Leitfähigkeit wurde bei Produkt 2, gefolgt vom Produkt 3 gefunden.

Diese Reihenfolge wurde auch bei den 1-tägigen und 7-tägigen Aushärtezeiten gefunden. Die Leitfähigkeit der anderen zwei Produkte lag mit $< 7 \mu\text{S/cm}$ im Bereich der Blindprobe.

Für die TOC-Gehalte wurde angenommen, dass mit längerer Aushärtezeit die Polymerisation weiter fortgeschritten ist und somit geringere TOC-Gehalte nach 7 Tagen nachweisbar sind. Diese Annahme konnte für Produkt 1 und 4 bestätigt werden, weil die TOC-Gehalt mit fortschreitender Aushärtezeit abnahmen. Bei Produkt 2 sind die TOC-Gehalte gleich und die Leitfähigkeit verdoppelte sich. Der Grund für die erhöhte Leitfähigkeit ist nicht bekannt, könnte aber auf migrierte Salze zurückzuführen sein. Speziell verhält sich Produkt 3, bei welchem nach 7 Tagen eine doppelt so hohe Leitfähigkeit und ein doppelt so hoher TOC-Gehalt (von ca. 20 mg/L nach 1 Tag auf 37 mg/L nach 7 Tagen Aushärtungszeit) gemessen wurde. Im Vergleich zu den drei anderen Produkten gelangten bei diesem Produkt über 7 Tage Elutionsdauer die grössten TOC-Mengen ins Wasser.

Tabelle 3: Elektrische Leitfähigkeit und Konzentrationen vom totalen organischen Kohlenstoff (TOC), Bisphenol A (BPA), Bisphenol F (BPF) sowie Bisphenol-A-Diglycidylether (BADGE), Bisphenol-A-(2,3-Dihydroxypropyl)-Glycidyl-Ether (BADGE · H₂O) und Bisphenol-A-Bis(2,3-Dihydroxypropyl)-Ether (BADGE · 2 H₂O) für die Eluate der vier Produkte, welche 1 Tag und 7 Tage ausgehärtet waren, und der Blindprobe. Messwert mit „<“ (kleiner als) geben die Bestimmungsgrenze der entsprechenden Analyse an.

1 Tag Trocknung							
Produkt	Leitfähigkeit [$\mu\text{S/cm}$]	TOC [mg/L]	BPA [$\mu\text{g/L}$]	BPF [$\mu\text{g/L}$]	BADGE [$\mu\text{g/L}$]	BADGE-H ₂ O [$\mu\text{g/L}$]	BADGE-2H ₂ O [$\mu\text{g/L}$]
Produkt 1	6.3	9.3	2	<1	3	8	10
Produkt 2	42.2	12.5	2	<1	18	37	26
Produkt 3	25.0	19.7	6'890	<100	<100	<100	<100
Produkt 4	5.3	3.7	<100	<100	268	565	246
Blindprobe	6.8	2.1	<1	<1	<1	<1	<1

7 Tage Trocknung							
Produkt	Leitfähigkeit [$\mu\text{S/cm}$]	TOC [mg/L]	BPA [$\mu\text{g/L}$]	BPF [$\mu\text{g/L}$]	BADGE [$\mu\text{g/L}$]	BADGE-H ₂ O [$\mu\text{g/L}$]	BADGE-2H ₂ O [$\mu\text{g/L}$]
Produkt 1	4.2	3.3	<1	<1	13	13	7
Produkt 2	73.0	11.2	2	<1	5	10	9
Produkt 3	46.7	37.1	10'400	<100	<100	<100	<100
Produkt 4	6.6	0.8	<10	<10	38	128	46
Blindprobe	3.8	0.9	<1	<1	<1	<1	<1

Die Analysenresultate von BPA und BPF sowie den drei Transformationsprodukten für die vier Beschichtungsprodukte sind in Tabelle 3 dargestellt. Bei Produkt 1 und 2 spielt die Aushärtezeit eine untergeordnete Rolle für die Konzentrationshöhe. Sowohl nach 1 Tag als auch nach 7 Tagen wurden 2 $\mu\text{g/L}$ BPA im Eluat nachgewiesen (Ausnahme Produkt 1, 7 Tagen, BPA: Bestimmungsgrenze). Diese Konzentrationen liegen im Bereich der Bestimmungsgrenze. Bei

BPF liegen sogar alle vier Eluatkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Konzentrationen von Produkt 3 lagen nach 1 Trocknungstag und 7 Tagen Elutionsdauer bei 6'890 µg/L BPA, nach 7 Trocknungstagen sogar bei 10'400 µg/L BPA (entspricht 1.04 mg/m² und 0.69 mg/m²). Die hohe Auswaschung ist möglicherweise auf den bewussten Zusatz von BPA als Additiv zurückzuführen (Kap.3: Grundlagen zum Korrosionsschutz). Der BPA-Gehalt erklärt somit fast 25 % vom gemessenen TOC-Gehalt. Warum nach 7 Tagen Trocknungsdauer die TOC- und BPA-Konzentrationen höher lagen als nach 1 Tag konnte nicht geklärt werden (möglicherweise können geringe Abweichungen bei der Herstellung, z.B. bei der Durchmischung, die BPA-Freisetzung signifikant beeinflussen, siehe Kapitel 3). BPF war in jedem Fall nicht nachweisbar, wobei die Bestimmungsgrenze bei < 100 µg/L lag. Die hohe Bestimmungsgrenze für BPF ist auf die hohe BPA-Konzentration zurückzuführen. Die Gesamtprobe musste 100fach verdünnt werden, damit das Messgerät nicht zu hoch belastet wurde. Bei Produkt 4 lagen alle Konzentrationen < 100 µg/L (Bestimmungsgrenze) für 1 Tag Aushärtung und < 10 µg/L für 7 Tage Aushärtung. Auch hier ist durch die hohe Bestimmungsgrenze von 100 µg/L nur ein eingeschränkter Aussagewert gegeben.

In den Proben der Produkte 1 und 2 waren nur Spuren der BADGE-Varianten nachweisbar oder konnten gar nicht nachgewiesen werden. In Produkt 4 dagegen lagen sehr hohe Konzentrationen für alle drei BADGE-Varianten vor, 1 Tag nach der Trocknung sogar rund doppelt so hoch wie nach 7 Tagen. Die BADGE waren nicht eingebunden, sondern sind nur mit dem Wasser herausgelöst worden. Zu beachten ist, dass dagegen BPA und BPF in diesem Produkteluat nicht nachgewiesen wurden. Beim Produkt 3 wurden keine BADGE-Varianten oberhalb der Bestimmungsgrenze, die mit 100 µg/L relativ hoch lag, gefunden.

Bei drei von vier getesteten Produkten wurde BPA im Eluat nachgewiesen, jedoch lagen nur im Eluat von Produkt 3 hohe Konzentrationen vor. Beim vierten Produkt kann die Anwesenheit aber auch nicht ausgeschlossen werden. Für BPA gibt es einen vorgeschlagenen Grenzwert von 1.5 µg/L (www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien). Die gemessene BPA-Konzentration für Produkt 3, bei 10 L/m² Elutionsvolumen, liegt 4000 bis 4500fach über diesem vorgeschlagenen Grenzwert für Oberflächengewässer.

6 Biotests

Es wurden drei Biotests ausgewählt, welche für die Bewertung von Abfallstoffen (Deventer, 2004) oder Baumaterialien vorgesehen sind (DIBt, 2011) oder äquivalent mit solchen Tests sind. Diese drei Tests sind:

- Algen als Primärproduzenten
- Leuchtbakterien als Destruenten
- Ceriodaphnien als Primärkonsumenten.

Da Hinweise vorlagen, dass hormonwirksame Substanzen in den Produktrezepturen enthalten sein könnten, insbesondere BPA und BPF, wurden L-YES und eine CALUX-Palette mit sechs verschiedenen Endpunkten als Tests für die Erfassung hormonwirksamer Effekte gewählt.

6.1 Vorgehen

6.1.1 L-YES – Lyticase-basierender Yeast Estrogen Screen

Mit dem L-YES werden östrogenwirksame Substanzen bestimmt, in dem genetisch modifizierte Hefen (Routledge & Sumpter, 1996; Schultis & Metzger, 2004) auf 96-Well Platten pipettiert (Abbildung 8) und Verdünnungsreihen von Referenzen und Eluatproben über 18 h exponiert werden. Sind in der Probe Substanzen vorhanden, welche sich an den humanen Estrogen-Rezeptor binden, dann reagieren die Hefen mit der Produktion vom Enzym β -Galactosidase. Die Menge an produzierter β -Galactosidase wird, nach der Exposition, mittels einer Farbreaktion bestimmt (gelbes CPRG wird umgewandelt in rotes CPR). Das Testprotokoll basiert auf einem aktuellem ISO Standard (ISO/CD 19040-1).

Die Positivkontrolle 17 β -Estradiol wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit 0.3 % Ethanollösung über zehn Wells auf den 96-Well Platten verdünnt. Die höchste Endkonzentration lag bei 2.45 10⁻⁹ M (80 μ L/Well). Die Eluate wurden wie die Positivkontrolle in einer 1:2 Verdünnungsreihe über sieben oder zehn Wells mit 80 μ L sterilem Reinstwasser (Nanopure-Qualität) pro Well verdünnt. Zwei verschiedene Negativkontrollen, 0.3 % Ethanollösung sowie steriles Reinstwasser, wurden auf jeder Platte in je 12 Wells mitgeführt (80 μ L/Well). Sowohl die Positivkontrolle wie auch die Eluate wurden in Dreifachbestimmung (Triplikate) analysiert. Von einer am Vortag angesetzten Hefekultur wurden 40 μ L Zellsuspension mit einer bestimmten Zelldichte pro Well zugefügt. Um die Eigenfarbe der Positivkontrolle (höchste gemessene Konzentration) und der unverdünnten Proben im Medium zu bestimmen, wurde in je drei Wells nur Medium ohne Hefezellen beigelegt. Alle Proben wurden einen Tag nach deren Herstellung getestet.

Nach 18 h Inkubation (+30°C) wurde die Zelldichte bei 600 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Synergy 4, Biotek, Winooski, USA) gemessen. 60 min nach Zugabe von 100 μ L Lysis-Mix mit CPRG wurde die Farbreaktion bei 540 nm gemessen.

Zur Quantifizierung der östrogenen Aktivität wurden mittlere effektive Konzentrationen (EC50) sowie 10 % und 20 % effektive Konzentrationen (EC10 und EC20) der 17 β -Estradiol-Referenz bestimmt. Hierzu wurden die Induktionsdaten (Absorption 540 nm) normalisiert und mit Gleichung 1 gefitted (GraphPad Prism Version 5.02 für Windows, GraphPad Software, La Jolla Kalifornien USA).

$$\text{Induction [\%]} = \text{Minimum \%} + \frac{(\text{Maximum} - \text{minimum}) \%}{1 + 10^{(\log(\text{EC50}) - \log(\text{concentration})) \cdot \text{slope}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Auch die Dosiswirkungskurven der Proben wurden normalisiert und mit Gleichung 1 gefitted. Die Probenkonzentration (in % der Probe), bei der 10 %, 20 % und 50 % vom Effekt der 17 β -Estradiol-Referenz (oder Positiv-Kontrolle) erreicht werden (PC10, PC20 und PC50), wurde aus der gefitteten Kurve abgeleitet (Abbildung 6; siehe auch OECD TG 455, 2012).

Die östrogene Aktivität einer Probe kann man in 17 β -Estradiol Äquivalente (EEQ) umrechnen. Dazu teilt man den EC10 von 17 β -Estradiol durch die PC10 der Probe.

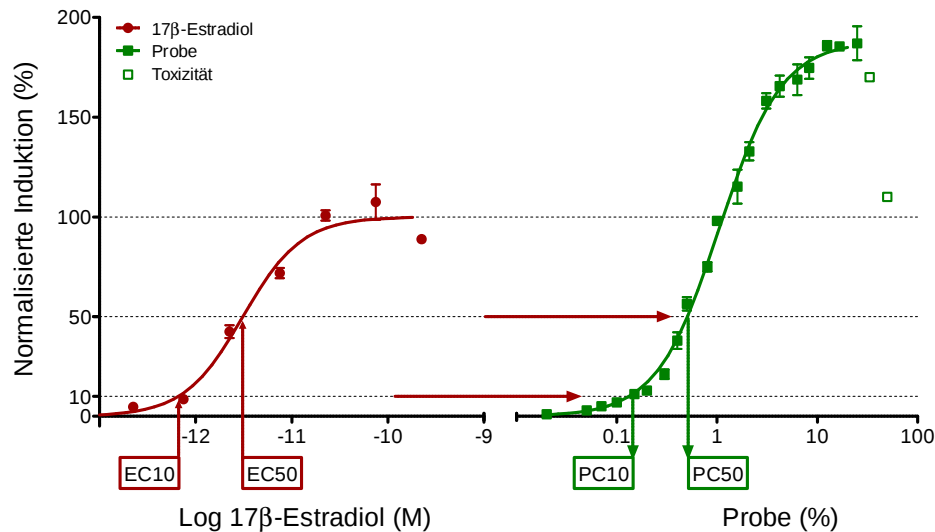


Abbildung 6: Darstellung der PCx-Ableitung. Die Dosiswirkungskurve der Referenz wird gefittet und daraus werden EC10 und EC50 abgeleitet (EC = Effektkonzentration). Die erforderlichen Probekonzentrationen für ähnliche Effekte wie die in der Positiv-Kontrolle (PC) werden mit PC10 und PC50 gekennzeichnet.

6.1.2 CALUX-Tests – Chemical Activated Luciferase gene eXpression

Im CALUX-Test werden Referenzproben und reale Wasserproben in mehreren Verdünnungsstufen auf einer 96-Well Platte pipettiert. Danach werden Medium und Zellen zugefügt. Bei den CALUX-Assays handelt es sich um die humane Osteosacrom Zelllinie U2OS, in die stabil ein exogener Hormonrezeptor transfiziert wurde. Ähnlich wie beim L-YES findet in den Zellen eine Rezeptoraktivierung statt, wenn in der Probe Agonisten (Substanzen, welche an den Rezeptor binden können) vorhanden sind. Die Zellen reagieren bei einer Rezeptoraktivierung mit der Produktion von Luciferase. Je nach Zell-Konstrukt sind verschiedene Endpunkte möglich. Nach 24 h Inkubation kann die resultierende Luziferase-Aktivität, und damit das Ausmass an Hormonaktivität, mittels eines Luminometers quantifiziert werden. Das Protokoll der Test basiert auf einem aktuellem ISO Standard (ISO/CD 19040-3).

Alle Proben wurden in drei verschiedenen Tests geprüft:

- ER α -CALUX für östrogene Wirkung
- anti-AR-CALUX für anti-androgene Wirkung
- anti-PR-CALUX für anti-progestagene Wirkung.

Zusätzlich wurden die Proben mit 1 Tag Trocknungszeit mit drei weiteren CALUX analysiert

- Nrf2-CALUX für oxidativen Stress
- P53-CALUX für Gentoizität
- PPAR γ 2-CALUX für Insulin Sensitivität/Obesität, z. B. bei perfluorierten Substanzen.

Die CALUX-Tests wurden bei BDS (Amsterdam, NL) in Auftrag gegeben. Die Auswertung der Daten (Induktion oder Hemmung von Lumineszenz) erfolgte analog zur Auswertung für L-YES (Gleichung 1).

6.1.3 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen

Der kombinierte Algentest (Escher et al., 2008) umfasst zwei Endpunkte:

- Die Hemmung der Ausbeute des Photosystems II
- Die Hemmung der Algenwachstumsrate.

Die Photosynthese-Aktivität wird durch Messung der Quantenausbeute nach 2 h und 24 h bestimmt. Die Wachstumsrate wird durch Absorptionsmessungen über 24 h ermittelt. Als Testorganismus ist die einzellige Süßwassergrünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* verwendet worden, ein Standardtestorganismus für die Wasserqualitätsbewertung (ISO 8692:2012). Der Test wird in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Referenzverbindung wird Diuron benutzt, ein potenter Inhibitor des Photosystems II (Schreiber et al., 2002). Proben und die Referenzverbindung (Diuron) liegen typischerweise in Ethanol vor. Sie werden auf Mikrotiterplatten pipettiert und dort in einer 2-fachen Reihe mit Ethanol verdünnt. Die Lösungsmittel werden abgedampft und anschliessend die Eluate und Referenzprobe wieder rückgelöst im Medium. Die 24 h Testphase beginnt mit der Zugabe der Algenkultur.

In diesem Projekt wurde das obige Verfahren (ethanolische Verdünnungsreihe, $3 \cdot 10^{-7}$ M bis $2.3 \cdot 10^{-9}$ M) nur für Diuron verwendet. Um die Wasserproben bei maximaler Konzentration testen zu können, wurden die Proben zuerst 1:1 mit doppeltkonzentriertem Assay-Medium gemischt. Von dieser Mischung wurden 150 µL zur ersten Reihe der Platte und weitere 150 µL zur zweiten Reihe hinzugefügt. Von der zweiten bis zur achten Reihe wurde eine 2fache Verdünnungsreihe mit Assay-Medium hergestellt. Schliesslich wurden in alle Wells 150 µL Algenkultur gegeben, um den Test zu starten ($t = 0$). Alle Proben wurden einen Tag nach deren Herstellung getestet.

Die Photosynthese-Ausbeute wurde mit einem Maxi-Imaging PAM gemessen (Pulsamplitude Modulation, IPAM; Walz, Effenrich, Deutschland) nach 2 h und 24 h (Escher et al., 2008; Schreiber et al., 2007). Das Wachstum der Algen wurde durch eine Absorptionsmessung bei 685 nm erfasst (Mikrotiterplatten-Photometer, Synergy 4, Biotek, Winooski, USA) nach 0, 2, 20 und 24 h. Schliesslich wurde die Photosynthese-Ausbeute (Y) und das Algenwachstum (μ) mit Gleichung 2 berechnet.

$$Inhibition [\%] = \left(1 - \frac{Y_{Sample}}{Y_{Kontrolle}}\right) \times 100 \% \text{ resp. } \left(1 - \frac{\mu_{Sample}}{\mu_{Kontrolle}}\right) \quad \text{Gleichung 2}$$

Dosiswirkungskurven der beiden Parameter (Y und μ) wurden mit GraphPad Prism 5 und Gleichung 1 gefittet.

6.1.4 Leuchtbakterientest mit *Aliivibrio fischeri*

Der Test auf die Hemmung der Biolumineszenz wird mit dem gram-negativen Meeresbakterium *Aliivibrio fischeri* durchgeführt. Die Lumineszenz in dem Bakterium ist direkt abhängig von dem Zustand des Stoffwechsels der Zelle. Substanzen, welche den Energiestoffwechsel stören, bewirken eine Minderung der Lichtemission, die ein Anzeichen von Toxizität ist. Um diese unspezifische Toxizität auszuwerten, wird die Biolumineszenz gemessen, bevor die Bakterien einer Probe ausgesetzt sind und 30 min nach der Exposition (Escher et al., 2008; ISO 11348-3:2007).

Die Tests wurden wieder auf 96-Wells Platten durchgeführt mit 3,5-Dichlorphenol als Positivkontrolle und Medium als Negativkontrolle (Escher et al., 2008). 3,5-Dichlorphenol wurde im Triplikate getestet mit einer 7-stufigen doppelten Verdünnungsreihe mit einer Startkonzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M im ersten Well. Die Negativkontrolle wurde mit acht Replikaten getestet. Die Proben wurden im Triplikate (drei Messungen an einem Eluat) und mit zweifacher Verdünnungsreihe getestet. Der niedrigste Verdünnungsfaktor, welcher getestet werden konnte, war 2.2. Dieser hohe Anteil an Probe (45 %) war möglich durch eine Mischung von neun Teilen wässrige Probe und einem Teil 10fach konzentriertem Versuchsmedium. Von dieser Mischung wurden 120 µL auf eine 96-Wells Platte pipettiert und davon eine zweifache Verdünnungsreihe mit einfach konzentriertem Versuchsmedium hergestellt. Abschliessend wurden 100 µL von allen Wells auf eine Platte mit 100 µL Bakterienlösung überführt. Wie auch für den kombinierten Algentest (und L-YES) wurden die Tests auf Hemmung der Biolumineszenz am Tag nach der Herstellung der Proben durchgeführt.

Um die Hemmung der Biolumineszenz zu berechnen, wurden Platten mit 100 µL Bakterienlösung pro Well in einem Lumineszenz-Plattenleser kurz vor der Exposition mit den Proben gemessen und 30 min nachdem 100 µL der Proben zugefügt worden waren. Die Biolumineszenz-Daten der Proben (I_{Probe}) und Kontrollen ($I_{Kontrolle}$) wurden in Gleichung 3 eingegeben, um die Hemmung der Biolumineszenz zu berechnen.

$$Inhibition [\%] = \left(1 - \frac{I_{Probe}}{I_{Kontrolle(korrigiert)}} \right) \times 100 \% \quad \text{Gleichung 3}$$

Die berechnete Biolumineszenz-Hemmung wurde in Gleichung 1 berücksichtigt, um die EC10, EC20 und EC50 Werte zu bestimmen.

6.1.5 Chronischer Reproduktionstest mit Wasserflöhen

In diesem Test werden die Wasserflöhe *Ceriodaphnia dubia* in Verdünnungsreihen den Eluaten und einer Referenz ausgesetzt. Die Auswirkungen auf Sterblichkeit und Reproduktion über 7 Tage wurde erfasst und die chronische Toxizität berechnet. Für dieses Projekt wurden die Test von dem Privatlabor Soluval Santiago (Couvett, Schweiz) gemäss Entwurf ISO/CD 20665 (ISO, 2008) und AFNOR T90-376 (AFNOR, 2000) durchgeführt.

Die Versuche wurden mit leicht veränderten Versionen des Standards durchgeführt: Das Verdünnungsmedium entspricht einem mässig harten Wasser, hergestellt aus 25 % Evian Mineralwasser, 25 % Elendt M4 Medium (Elendt und Bias, 1990) und 50 % entionisiertes Wasser ergänzt mit Selen und Vitamin B₁₂. Das Futter war eine Mischung aus Hefe, aufgeschlossenen Fischflocken (TetraMin®) und Grünalgen (*P. subcapitata* und *Chlorella sp.*). Frisch geschlüpfte Tiere, welche weniger als 24 h alt waren und maximal 8 h Altersunterschied hatten, wurden 7 Tage verschiedenen Verdünnungen der Proben in einem System mit festgelegter Umwälzung ausgesetzt (12 Replikate pro Konzentration). Das Kontrollwasser (d.h. Verdünnungsmedium) wurde mit 20 Replikaten getestet. Alle Versuche wurden bei +25 °C in einem temperaturkontrollierten Raum durchgeführt. Die Beleuchtung lag im Bereich von 300 bis 500 Lux bei einem Licht-Dunkel-Verhältnis von 16:8 h. Das Wasser wurde jeden Tag erneuert, ausgenommen am ersten Tag. Am ersten Tag und jedem folgenden wurden während des Wasserwechsels das Überleben der Muttertiere bestimmt und die Nachkommen gezählt. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Proben (pH, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit) wurden während des Tests in regelmässigem Abstand gemessen (n=6). Die Ergebnisse der Kontrollen

erfüllten die Validitätskriterien: Am siebten Tag war die Sterberate der Muttertiere $\leq 20\%$; der Anteil der Männchen $\leq 20\%$; mindestens 60 % der lebenden Muttertiere hatten mindestens drei Nachkommen und der Mittelwert an Nachkommen pro lebendem Muttertier war ≥ 15 . Die Hemmung des Wachstums der Population wurde mit Gleichung 4 berechnet.

$$Inhibition [\%] = \left(1 - \frac{Nachkommen_{Probe}}{Nachkommen_{Kontrolle}}\right) \times 100 \% \quad \text{Gleichung 4}$$

Die EC50 für die Hemmung des Wachstums der Population wurden über Gleichung 1 bestimmt.

6.1.6 Mittlere effektive Konzentrationen für Bisphenol A und Bisphenol F

In den in 6.1.1 bis 6.1.4 erwähnten Biotests wurde der Effekt von BPA und BPF als Einzelstoff getestet, um mittlere effektive Konzentrationen zu bestimmen. Für *Ceriodaphnia dubia* (6.1.5) wurden Literaturdaten herangezogen (Tabelle 4). Für Testkonzentrationsbereiche und vollständige Dosis-Wirkungskurven in den jeweiligen Tests siehe Abbildungen 22-25.

Tabelle 4: Mittlere effektive Konzentrationen (EC50) für Bisphenol A (BPA) und Bisphenol F (BPF) in den angewendeten Biotests. Da BPA und BPF im L-YES und im CALUX höhere (oder tiefere) Effekte induzieren können als die maximale Referenzkonzentration im Test, wurde für alle hormonelle Wirkungen der PC50 berechnet (PC50 = benötigte Konzentration um 50 % vom Effekt der Positiv-Kontrolle zu erreichen; Abbildung 6).

Test	BPA [M]	BPA [mg/L]	BPF [M]	BPF [mg/L]
L-YES (PC50)	$1.2 \cdot 10^{-6}$	0.27	$1.5 \cdot 10^{-6}$	0.29
ER α -CALUX (PC50)	$2.4 \cdot 10^{-7}$	0.05	$4.7 \cdot 10^{-7}$	0.09
Anti-AR CALUX (PC50)	$8.9 \cdot 10^{-7}$	0.20	$4.6 \cdot 10^{-6}$	0.93
Anti-PR CALUX (PC50)	$4.5 \cdot 10^{-6}$	1.0	$1.2 \cdot 10^{-5}$	2.5
Algen 24 h Wachstum	$3.9 \cdot 10^{-5}$	9.0	$2.0 \cdot 10^{-4}$	41
Algen 2h Inh. Photosynthese	$2.1 \cdot 10^{-4}$	49	$5.1 \cdot 10^{-4}$	101
Algen 24h Inh. Photosynthese	$6.3 \cdot 10^{-5}$	15	$2.3 \cdot 10^{-4}$	47
Leuchtbakterien	$6.9 \cdot 10^{-5}$	16	$7.3 \cdot 10^{-5}$	15
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Tatarazako et al., 2002)	$2.4 \cdot 10^{-5}$	5.6	keine Daten	keine Daten

Für *Ceriodaphnia dubia* wurde eine Literaturquelle zur BPA-Toxizität gefunden (Tatarazako et al., 2002). Da nur der IC25 (inhibiting concentration, Hemmkonzentration) von 4 mg/L angegeben ist, wurden die Datenpunkte einer Grafik neu gefittet (Abbildung 7) und ein EC50 von 5.6 mg/L BPA abgeleitet.

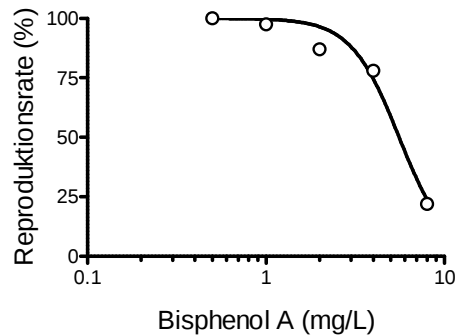


Abbildung 7: Dosiswirkungsdaten für Bisphenol A und *Ceriodaphnia dubia* wurden aus einer Grafik von Tatarazako et al. (2002) extrahiert und zur Ableitung einer mittleren Effektkonzentration EC50 für Bisphenol A genutzt (Fit mit GraphPad Prism).

6.2 Resultate und Diskussion

6.2.1 L-YES

Abbildung 8 zeigt die L-YES Platten der Blindprobe und drei Produkte nach 1 Tag Trocknung. Unten auf den Platten sind drei rötlich gefärbte 17 β -Estradiol Verdünnungsreihen sichtbar. Eine hohe 17 β -Estradiol Konzentration führt zu einer Umwandlung von CPRG (gelb) in CPR (rot).

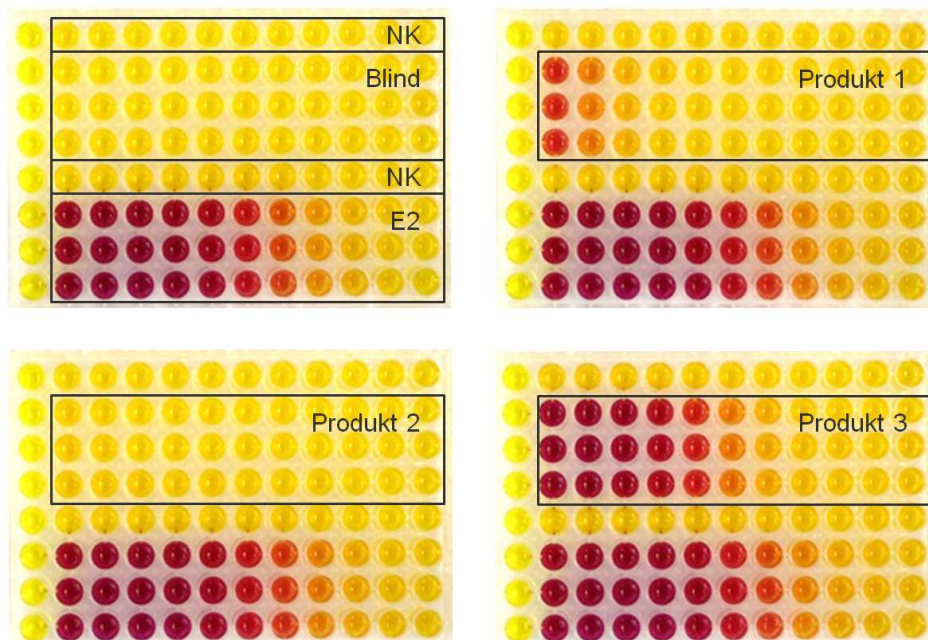


Abbildung 8: Fotos von L-YES Platten: ein Blindprobe und drei Produkte, getestet nach 1 Tag Trocknung und 7 Tagen auswaschen. Auf jeder Platte enthält die linke Spalte eine Lösungsmittelkontrolle. Die drei Reihen unten umfassen die 17 β -Estradiol-Verdünnungsreihen im Triplikate (E2, höchste Konzentration links). Eine Reihe darüber und in der obersten Reihe liegen Negativkontrollen (NK) vor. Die drei Reihen über die Negativkontrollen umfassen Triplikate-Verdünnungsreihen der Proben (höchste Konzentration links).

Die Verdünnungsreihen von der Blindprobe und von Produkt 2 zeigten, auch bei maximaler Probemenge im Test (67 %), keine östrogene Wirkung (das Medium bleibt gelb). Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung wurde in einem zweiten Durchgang zusammen mit den Produkten nach 7 Tagen Trocknung getestet und war unauffällig (siehe Anhang: Abbildung 16). Bei Produkt 1 zeigen die beiden höchsten Probekonzentrationen eine leichte Rotfärbung. Dagegen sind bei Produkt 3 alle drei Verdünnungsreihen stark rötlich gefärbt. Damit ist eindeutig nachgewiesen, dass aus Produkt 3 Stoffe ausgewaschen werden, welche vergleichbar mit 17 β -Estradiol den Östrogenrezeptor aktivieren.

Die Dosiswirkungskurve von Produkt 3 nach 1 Tag Trocknung ist in Abbildung 9 dargestellt (Dosiswirkungskurve Produkt 1: Anhang, Abbildung 17). Die 17 β -Estradiol-Konzentration, welche benötigt wird, um 50 % Effekt zu erzeugen (mittlere Effektkonzentration, EC50), wurde aus der Dosiswirkungskurve abgeleitet. Darüber hinaus wurden EC10 und EC20 berechnet. Die korrespondierenden Probenkonzentrationen, um den EC50 von 17 β -Estradiol zu erreichen (PC50), finden sich in Tabelle 5. Für weitere Bilder von L-YES Platten und L-YES Dosiswirkungskurven siehe Anhang, Abbildungen Abbildung 16 Abbildung 17.

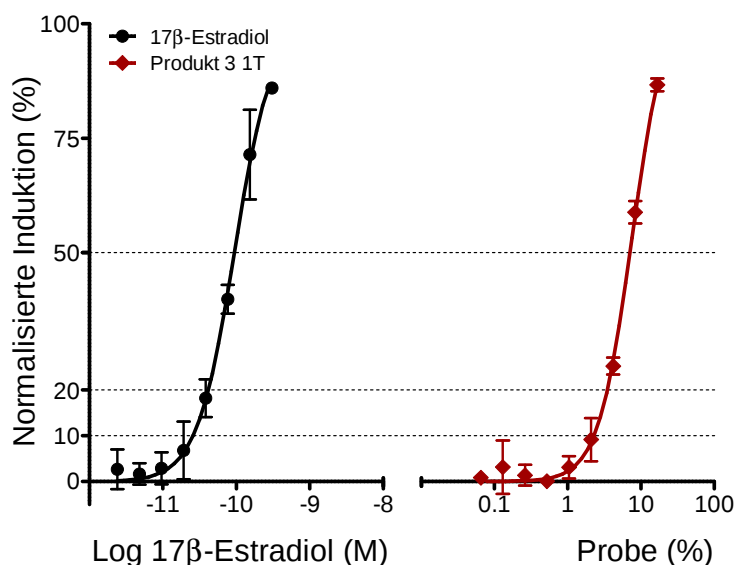


Abbildung 9: L-YES Dosiswirkungskurven von 17 β -Estradiol (E2) und Produkt 3 mit 1 Tag Trocknungsdauer (1T) in Triplikatmessung. Die gepunkteten Linien markieren drei Effekt-Levels der E2-Referenz (EC10, EC20 und EC50).

Nach 1 Tag Trocknung von Produkt 3 wurde im Eluat eine BPA-Konzentration von 6.89 mg/L gemessen. Der EC50 für BPA und L-YES liegt bei 0.27 mg/L (Tabelle 4). Die toxischen Einheiten (TU, toxic units) für BPA, berechnet nach Gleichung 5, ergeben TU = 1.80. Somit reicht die BPA-Konzentration in der Probe, um die beobachtete hormonelle Wirkung erklären zu können. Dies gilt auch für Produkt 3, getestet nach 7 Tagen Trocknung, TU = 1.5. Es ist deshalb bei Produkt 3 gut begründet, dass der beobachtete Effekt im L-YES hauptsächlich durch BPA verursacht wurde. Generell könnten aber noch andere (anti-)östrogen-aktive Substanzen zur Gesamtaktivität beitragen, die aber in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden.

$$Toxic\ Unit_{BPA} = \frac{BPA\text{-Konzentration in der Probe bei } 50\% \text{ Effekt}}{EC50 \text{ von BPA}}$$

Gleichung 5

Die BPA-Konzentration im Eluat von Produkt 1 nach 1 Tag Trocknung war 0.002 mg/L (Tabelle 3). Diese Konzentration ist zu gering, um die hormonelle Wirkung in der Probe zu erklären (Abbildung 8); denn der TU für Produkt 1 beträgt 0.007. Deshalb ist es bei Produkt 1 unklar, welche Substanzen die beobachtete östrogene Wirkung verursachen.

Tabelle 5: *Effektdaten zur östrogenen Wirkung der Proben im L-YES und ER α -CALUX. Mittlere Effektkonzentrationen (EC50) von 17 β -Estradiol (M) und die erforderlichen Eluatkonzentrationen, um den EC50 von 17 β -Estradiol zu erreichen („positive control“, PC50 in %). 17 β -Estradiol-Äquivalente (EEQ) wurden interpoliert bei einem 10 % Effekt-Level der Positiv-Kontrolle (PC10). *: Extrapolierter Wert (max. Konzentration im Test war 67 %). ** Wurde in einem zweiten Durchgang zusammen mit den Proben „7 Tage Trocknung“ getestet.*

L-YES			ER α -CALUX	
Probe	EC50 oder PC50 [M oder % Probe]	EEQ [ng/L]	EC50 oder PC50 [M oder % Probe]	EEQ [ng/L]
1 Tag Trocknung				
17 β -Estradiol	9.4 10 ⁻¹¹ M	-	5.2 10 ⁻¹² M	-
Produkt 1	99 %*	23	16%	4.8
Produkt 2	-	-	-	-
Produkt 3	7.1 %	310	0.9 %	160
Produkt 4**	-	-	-	-
7 Tage Trocknung				
17 β -Estradiol	1.0 10 ⁻¹⁰ M	-	4.6 10 ⁻¹² M	-
Produkt 1	-	-	110 %*	2.0
Produkt 2	-	-	-	-
Produkt 3	3.9 %	550	0.5 %	280
Produkt 4	-	-	-	-

Für Produkt 1 wurde ein EEQ-Wert im L-YES von 23 ng/L berechnet (Tabelle 5). Dieser Wert ist vergleichbar mit Rohabwasser (20 - 60 ng/L; Kienle et al., 2012). Der EEQ-Wert von 310 ng/L (bzw. 550 ng/L nach 7 Tagen Trocknung) für Produkt 3 liegt sogar um etwa einen Faktor 10 höher.

6.2.2 CALUX-Test

Effekte wurden nur bei drei der sechs verwendeten CALUX-Systeme beobachtet: im ER α - (östrogene Wirkung), anti-AR- (anti-androgene Wirkung) und anti-PR-CALUX (anti-progestagene Wirkung) (Tabelle 5, Tabelle 6; Anhang: Abbildung 16 ff.). Dagegen sind im Nrf2- (oxidativer Stress), P53- (Gentoxizität) und PPAR γ 2-Test (Insulin Sensitivität/Obesität) keine Effekte beobachtet worden (Tabelle 6, Anhang: Abbildung 21).

Die Resultate für ER α -CALUX stimmen gut mit den L-YES-Daten überein. Produkt 3 nach 1 Tag Trocknung ist sowohl im L-YES (Abbildung 9) als auch im ER α -CALUX deutlich aktiv (Abbildung 10). Die im ER α -CALUX bestimmten EC50 und PC50 liegen etwa 10fach tiefer als die PC50 im L-YES (Tabelle 5). Diese Beobachtung lässt sich gut mit Literaturangaben

belegen: CALUX-basierte Verfahren sind etwa 10fach sensitiver als Hefe-basierte Verfahren (Murk et al., 2002). Hervorzuheben ist, dass die Unterschiede zwischen den beiden Verfahren bezüglich EEQs und geschätzten BPA-Konzentrationen nur einen Faktor 2 betragen. Somit bestätigen sich die beiden Verfahren gegenseitig. Ähnlich wie beim L-YES sind auch die TU für BPA und Produkt 3 beinahe 1: nach 1 Tag Trocknung TU = 1.18; nach 7 Tagen Trocknung TU = 0.92. Zudem erreicht die Probe von Produkt 3 im ER α -CALUX eine deutlich höhere Induktion als 17 β -Estradiol – auch das ist typisch für BPA (Anhang: Abbildung 22).

Wie beim L-YES zeigt Produkt 1 auch im ER α -CALUX eine klare Dosiswirkungskurve (Anhang: Abbildung 18)., Die östrogene Wirkung im Eluat von Produkt 1 konnte auch mit dem ER α -CALUX nicht BPA zugeordnet werden (TU = 0.006) und wird somit von anderen Substanzen verursacht.

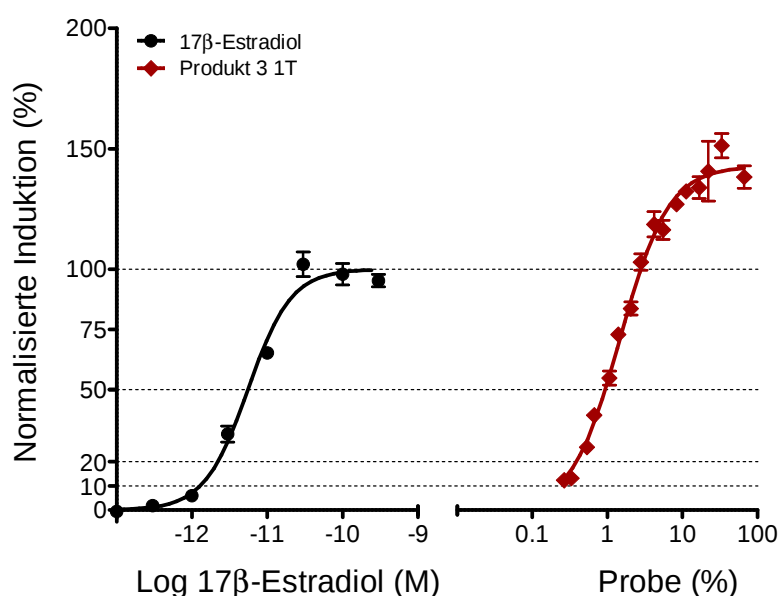


Abbildung 10: ER α -CALUX Dosiswirkungskurven von 17 β -Estradiol (E2) und Produkt 3 nach 1 Tag Trocknungsdauer (1T) in Triplikatmessung (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Die gepunkteten Linien markieren vier verschiedene Effekt-Levels der E2-Referenz (10 %, 20 %, 50 %, 100 %).

Die PC50 und PC80 der Proben waren relativ ähnlich im ER α - und anti-AR-CALUX (Tabelle 6; Anhang: Abbildung 19). Für Produkt 3 ist klar, dass in beiden CALUX-Systemen (ER α und anti-AR) die Effekte hauptsächlich durch BPA verursacht werden – BPA ist in beiden CALUX-Systemen etwa gleich potent (Tabelle 4). Die Gründe für die anti-AR-Effekte bei Produkt 1 und 2 bleiben aber ungeklärt, weil die BPA-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze liegen (Tabelle 6).

BPA spielt im anti-PR-CALUX wohl weniger eine Rolle als im ER α - oder anti-AR-CALUX (Tabelle 4: BPA ist 20fach weniger potent im anti-PR-CALUX und im ER α -CALUX). Dies spiegelt sich in den PC80 vom anti-PR-CALUX wider. So ist z. B. das PC80-Verhältnis zwischen Produkt 1 und Produkt 3 für anti-PR nahe 1 (14 % zu 9.5 %), das PC50- und PC80-Verhältnis für ER α und anti-AR jedoch liegt zwischen 7 und 18 (16 % zu 0.9 % und 12 % zu 1.7 %). Obwohl klar ist, dass bei den anti-PR-Effekten BPA eine untergeordnete Rolle spielt (TU $\ll$ 1), erklärt es bei Produkt 3 ungefähr ein Drittel vom anti-PR-Effekt. Welche Substanzen bei den Produkten 1 und 2 den anti-PR-Effekt verursachen, ist offen.

Tabelle 6: Effektkonzentrationen der Proben für die sechs verwendeten CALUX-Tests. Für ER α -CALUX erfolgt die Angabe als PC50: die erforderliche Probenkonzentration (in % der Probe), wobei die mittlere Effektkonzentration (EC50) von 17 β -Estradiol induziert wird. Für anti-AR- und anti-PR-CALUX erfolgt die Angabe als PC80 (Probenkonzentration, bei der der maximale Effekt der Referenz, Flutamid oder Ru486, um 20 % inhibiert wird). X : Probe wurde nicht getestet, weil nach 1 Tag Trocknung keine Effekte beobachtet wurden (kein messbarer Effekt PC50 >> 100 %). * Wurde in einem zweiten Durchgang zusammen mit den Proben „7 Tage Trocknung“ getestet. ** Probe war Cytotoxisch ab 20 % Probe.

Probe	ER α	Anti-AR	Anti-PR	Nrf2	P53	PPAR γ 2
1 Tag Trocknung						
Produkt 1	16 %	12 %	14 %	-	-	-
Produkt 2	-	66 %	44 %	-	-	-
Produkt 3	0.9 %	1.7 %	9.5 %	-	-	-
Produkt 4*	-	-	-	-	-	-
7 Tage Trocknung						
Produkt 1	109 %	50 %	44 %	X	X	X
Produkt 2	-	65 %	67 %	X	X	X
Produkt 3	0.5 %	0.1 %	8.4 %**	X	X	X
Produkt 4	-	-	-	X	X	X

6.2.3 Leuchtbakterientest

Nach 1 Tag und 7 Tagen Trocknung zeigten zwei Produkte eine toxische Wirkung: Produkt 1 (EC50 0.4 % bzw. EC50 2.3 %) und Produkt 3 (extrapolierter EC50 bei 100 % bzw. EC50 32 %) (Abbildung 11).

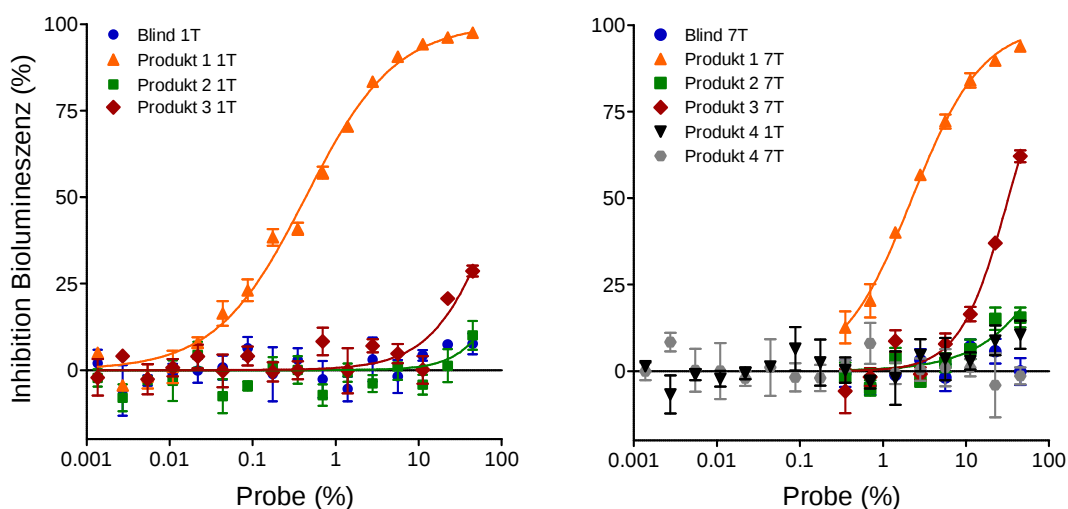


Abbildung 11: Dosiswirkungskurven für Triplikatmessungen im Leuchtbakterien-Test (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Links: Proben nach 1 Tag Trocknung (1T); rechts: Proben nach 7 Tagen Trocknung (7T; Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung wurde im zweiten Durchgang, zusammen mit den „7T-Proben“, getestet).

Nachweislich kommt BPA im Eluat vom Produkt 1 vor, die Konzentration ist aber zu gering, um die starke Toxizität erklären zu können. Der EC₅₀ für BPA und *A. fischeri* liegt bei 15.7 mg/L. Die toxischen Einheiten (TU, toxic units) für BPA, berechnet nach Gleichung 5, ergeben $TU \ll 1$ ($5 \cdot 10^{-7}$). Demgegenüber liegen für Produkt 3 die TU bei 0.44, womit klar gezeigt werden kann, dass BPA massgeblich den EC₅₀ bestimmt.

6.2.4 Chronischer Reproduktionstest mit Wasserflöhen

Die Eluate von allen vier Produkten zeigten nach 1 Tag Trocknung eine toxische Wirkung auf Wasserflöhe (Abbildung 12). Die EC₅₀ liegen zwischen 12 % (Produkt 3) und 56 % (Produkt 2), wobei Produkt 1 eine intermediäre Toxizität zeigt (31 %). Mit BPA lässt sich die Toxizität in den Proben nicht alleine erklären. Beispielsweise liegt der BPA-EC₅₀ bei 5.6 mg/L, die verdünnte Konzentration der Probe im Test auf 12 % (der EC₅₀ von Produkt 3) bedeutet aber, dass effektiv nur 1 mg/L BPA im Testmedium vorkommen. Die TU liegt insofern bei 0.2 ($TU = 1 / 5.6$) und BPA erklärt die toxische Wirkung der Probe nur zu 18 %. Vergleichbar unklar ist die Toxizität bei Produkt 1.

Nach 7 Tagen Trocknungsdauer zeigten alle Proben, auch die Referenz aus Reinstwasser (Blindprobe), eine Hemmung der Reproduktionsraten. Eine toxische Wirkung der Referenz (EC₅₀ 63 %) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass im Reinstwasser wichtige Spurenelemente fehlten. Dass sich die beiden Referenzenproben tatsächlich in einigen chemischen Parametern unterschieden, ist anhand der elektrischen Leitfähigkeit und des TOC sichtbar (Tabelle 3). Warum aber die Referenz im zweiten Durchgang ein Problem darstellte, jedoch im ersten Testdurchgang mit Proben nach 1 Tag Trocknungsdauer und in einem vorhergehenden Projekt (Eluate von Fassaden; Burkhardt et al., 2013) nicht, lässt sich dennoch nicht vollständig klären.

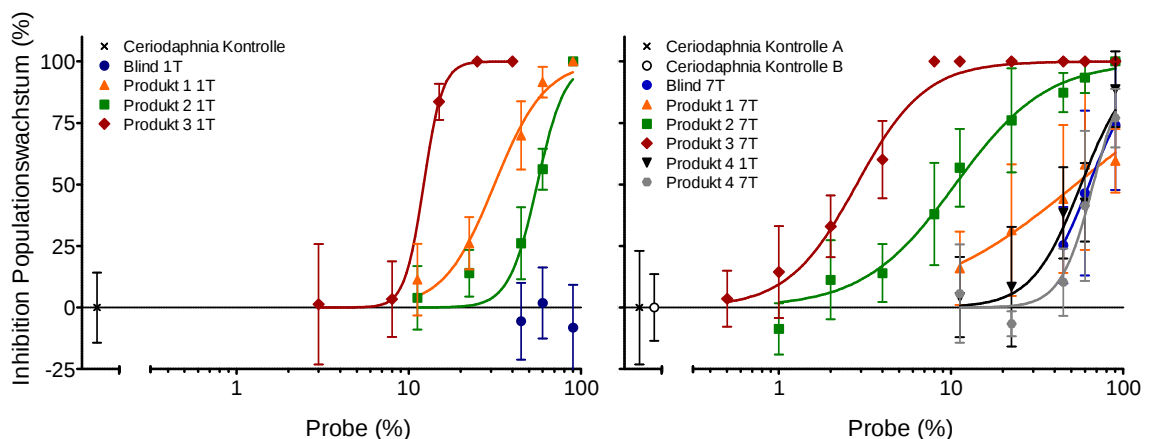


Abbildung 12: Dosiswirkungskurven im Reproduktionstest mit *Ceriodaphnien* ($n=12$ Muttertiere pro Verdünnung und Probe, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Links: Ergebnisse nach 1 Tag Trocknung (1T); rechts: Ergebnisse nach 7 Tagen Trocknung (7T; Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung wurde im zweiten Durchgang, zusammen mit den „7T-Proben“, getestet).

Bei der Beurteilung der toxischen Wirkung muss auch die Hemmung der Reproduktion in der Referenzprobe berücksichtigt werden. So zeigt Produkt 4 ähnliche Effekte wie die dazugehörige Blindprobe (EC₅₀ nach 1 Tag Trocknung 57 % und nach 7 Tagen Trocknung 67 %). Auch

Produkt 1 zeigt nur einen geringfügig höheren Effekt als der Blindwert (53 %). Obwohl die EC50 von der Blindprobe, Produkt 1 und Produkt 4 also leicht unterschiedlich sind, sind die 95 % Konfidenzintervalle quasi identisch (Anhang: Tabelle 8) und man kann nicht wirklich zwischen den Varianten unterscheiden. Dagegen weisen Produkte 2 und 3 deutlich tiefere EC50 auf und es gibt eindeutig keine Überschneidungen bei den 95 % Konfidenzintervallen. Insofern sind die ermittelten Effekte bei Produkten 2 und 3 statistisch belastbar und konsistent.

6.2.5 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen

Im Algentest gibt es zwei Endpunkte: 1.) Hemmung der Photosynthese (Messung nach 2 h und 24 h) und 2.) Hemmung der Wachstumsrate über 24 h. Bei keiner der Proben von Produkt 1, 2 und 4 wurde eine Hemmung der Photosynthese festgestellt. Nur für Produkt 3 wurde ein Effekt bei der Wachstumsrate gefunden, sowohl nach 1 als nach 7 Tagen Trocknungszeit (Abbildung 13).

Die mittlere Effektkonzentration EC50 für Produkt 3 liegt bei 67 % Probe nach 1 Tag und 31 % nach 7 Tagen Trocknung. Da Produkt 3 grössere Mengen BPA freisetzt (Tabelle 3) wurden TUs berechnet: 0.54 nach 1 Tag Trocknung und 0.6 nach 7 Tagen Trocknung. Somit scheint BPA zum ganz wesentlichen Teil verantwortlich für den beobachteten Effekt auf die Algenwachstumsrate.

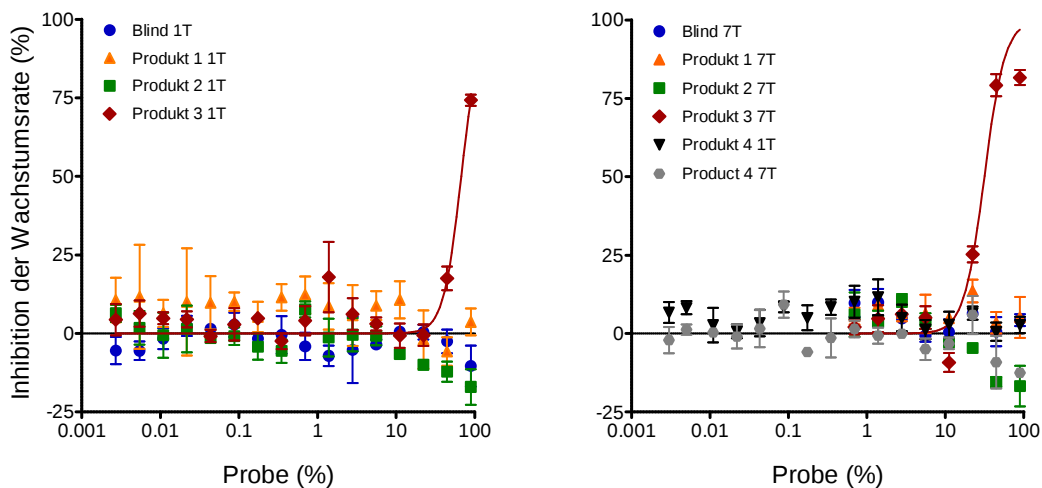


Abbildung 13: Dosiswirkungskurven in Triplikatmessungen im Algentest (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Links: 1 Tag Trocknung, 1T; rechts: 7 Tage Trocknung, 7T. Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung wurde im zweiten Durchgang, zusammen mit den „7T-Proben“, getestet. Nur Produkt 3 zeigt eine toxische Wirkung auf die Wachstumsrate der Algen.

7 Bewertung der Biotests für Leuchtbakterien, Wasserflöhe und Algen

Für Materialien, die als Korrosionsschutzmittel im Stahlwasserbau oder Stahlhochbau verwendet werden, gibt es kein bestehendes Bewertungsschema für ökotoxische Effekte, die in Biotests im Labor ermittelt wurden. Vom Deutschen Institut für Bautechnik (DIBt, Berlin) gibt es ein Konzept für erdberührte Bauprodukte, um den möglichen Einfluss auf Boden und Grundwasser abzuschätzen (angewendet z. B. für Injektionsmittel, die in Kontakt zu Grundwasser stehen).

Im gestuften Bewertungsschema gibt es verschiedene Aspekte, die abgeklärt werden und in die Gesamtbeurteilung einfließen (Abbildung 14):

- 1) Ermittlung der Inhaltsstoffe
- 2) Elution der Produkte (praxisnah)
- 3) Ermittlung allgemeiner und stofflicher Parameter
- 4) Ermittlung biologischer Parameter durch Biotests.

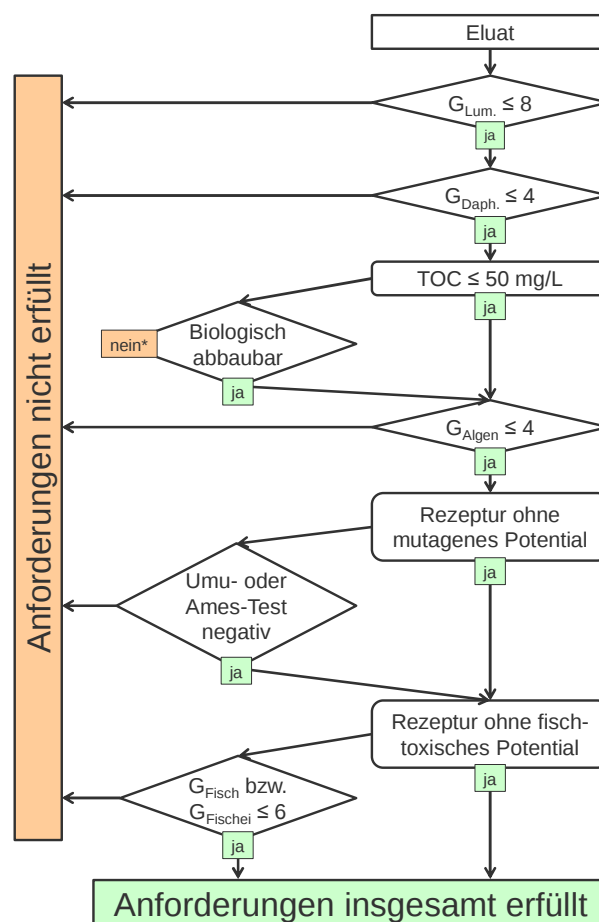


Abbildung 14: Bewertung der Eluate anhand von Verdünnungsstufen (G-Werte) (DIBt, 2011). Die G-Werte beziehen sich auf Verdünnungen, die in den Biotest-Systemen nicht überschritten werden dürfen: G_{Lum} = Biolumineszenz-Test mit *A. fischeri*, ISO 11348-1-3; G_{Daph} : 48 h Daphnien Immobilisierungstest, ISO 6341; TOC: totaler organischer Kohlenstoff, DIN EN 1484; G_{Algae} : Algenzellvermehrung, DIN 38412-33; G_{Fisch} : Fischmortalität, DIN 38412-31; $G_{Fischei}$: Entwicklung von Fischeiern, DIN 38415-6). *: Ist kein Ausschlusskriterium, sondern die Bewertung erfolgt mit Ergebnissen anderer Tests.

Das Konzept beruht unter anderen auf der Bewertung von ökotoxikologischen Effekten durch die Eluate in Biotests. Aufgeführt sind auch Leuchtbakterien-, Wasserflöhe- (Daphnien) und Algen-Tests, analog zu (aber nicht identisch mit) den bei dieser Studie eingesetzten Tests. In der Bewertung werden die getesteten Verdünnungsstufen mit festgelegten Giftigkeitsschwellen (G-Wert) verglichen. Die festgelegten G-Werte für Leuchtbakterien, Daphnien, Algen und Fischen korrelieren mit dem 20 % Effekt (d.h. EC20 oder PC20). Nach dem DIBt-Schema erfüllt ein Eluat unmittelbar die Anforderungen, wenn maximal eine 8fache Verdünnung im Leuchtbakterien-Test und 4fache Verdünnung im Daphnien- und Algen-Test zur Einhaltung des EC20 benötigt wird. Zudem dürfen keine Substanzen mit mutagenem oder fischtoxischem Potential in der Rezeptur enthalten sein. Der TOC-Gehalt >50 mg/L ist keiner Beschränkung unterworfen, solange diese Fraktion biologisch abbaubar ist.

Auf Basis der Dosiswirkungsbeziehungen wurde für die vier Korrosionsschutzmittel berechnet, bei welcher Verdünnungsstufe die 20 % Effektschwelle EC20 gemäss DIBt-Schema erreicht wird (Tabelle 7). Nach diesem Konzept erfüllt nur Produkt 4 die Anforderungen vollständig. Bei Produkt 1 ist vor allem die Wirkung auf die Biolumineszenz sehr problematisch und überschreitet ca. 160fach die Anforderungen. Dies ist bemerkenswert auch vor dem Hintergrund, dass die verantwortliche Substanz nicht bekannt ist. Produkt 3 ist bedeutend problematisch im Daphnien-Test mit einer ca. 16fachen Überschreitung vom Kriterium. Die Wirkung beruht im Wesentlichen auf der nachgewiesenen BPA-Konzentration.

Tabelle 7: G-Werte (Verdünnungsstufen der Proben) für alle Tests und Endpunkte, bei denen Effekte beobachtet wurden. Die fett gedruckten Zahlen zeigen an, bei welchen Tests die Anforderungen an den G-Wert des DIBt-Schemas nicht erfüllt sind. * Wurde in einem zweiten Durchgang zusammen mit den Proben „7 Tage Trocknung“ getestet.

Probe	L-YES	ERα	anti-AR	anti-PR	Algen- wachstum	Biolumines- zenz	Cerio- daphnia
1 Tag Trocknung							
Blind	-	-	-	-	-	-	-
Produkt 1	2	11	8	7	-	1282	5
Produkt 2	-	-	2	2	-	1	2
Produkt 3	29	259	57	11	2	4	10
Produkt 4*	-	-	-	-	-	-	3
7 Tage Trocknung							
Blind	-	-	-	-	-	-	2
Produkt 1	-	3	2	-	-	171	8
Produkt 2	-	-	2	-	-	2	22
Produkt 3	51	468	<u>766</u>	12	5	8	67
Produkt 4	-	-	-	-	-	-	2

Das DIBt-Bewertungsschema ist entwickelt worden für erdberührte Bauteile. Im Zusammenhang mit den im Labor bestimmten Konzentrationen sollte stets berücksichtigt bleiben, dass die Versuchsbedingungen der Elution (Zeitdauer 7 Tage, Wassermenge 10 L/m²,

Raumtemperatur) die Konzentrationshöhe von Leitfähigkeit, TOC, BPA, BPF, BADGE etc. massgeblich beeinflussen. Durch Veränderung der Parameter lässt sich die Konzentration sowohl erhöhen als auch reduzieren.

Das Schema sieht generell vor, dass eine „Übertragungsfunktion“ verwendet wird, um die im Labor ermittelten Schadstoffkonzentrationen auf erwartete Umweltkonzentrationen unter „natürlichen Verhältnissen“ zu übertragen. Solche Funktionen fehlen für Beschichtungen im Stahlwasserbau oder Stahlhochbau, sodass das hier vorgestellte Vorgehen nur einer nicht verifizierten Grobbeurteilung entspricht, zumal in der Anwendungspraxis oft hohe Verdünnungen zu erwarten sind. Damit wird unterstrichen, dass die Versuchsergebnisse in Tabelle 7 der Orientierung dienen und nicht direkt auf die Umweltsituation übertragbar sind.

8 Schlussfolgerungen

Marktrecherche

- Im Stahlhochbau und -wasserbau der Schweiz wird von 315 bis 490 Tonnen Jahresverbrauch Korrosionsschutzmitteln rund die Hälfte von Epoxydharzen abgedeckt, gefolgt mit von 2K- und 1K-Polyurethan-Systemen. Einen umweltproblematischen Inhaltsstoff stellt Bisphenol A (BPA) dar. Es können weitere relevante Stoffe enthalten sein, die im Rahmen dieser Studie nicht näher spezifiziert wurden, z.B. Alkylphenole wie Nonylphenol und p-tert-Butylphenol.

Elutionsversuche

- Die beiden Trocknungszeiten von 1 und 7 Tagen zeigen überwiegend konsistente Resultate (innerhalb ca. eines Faktors 2). In der realen Anwendungspraxis werden aber höhere Verdünnungen auftreten als im Versuch. Somit stellen die 10 L/m² im Elutionsversuch sowie die Ein-Punkt-Messung ein Worst-Case-Szenario dar.
- In zukünftigen Untersuchungen sollte die chemische Analytik mehr verschiedene Stoffe erfassen und niedrigere Bestimmungsgrenzen sicherstellen.

Biotests

- Produkt 1: Sehr auffällig ist die hohe Toxizität im Biolumineszenz-Test. Diese Toxizität liess sich keiner Substanz zuordnen. Die hormonelle Wirkung ist nicht über BPA erklärbar, sodass der Grund ebenfalls ungeklärt bleibt.
- Produkt 2: Nur im Ceriodaphnien-Test zeigte sich ein toxischer Effekt; BPA und BPF waren aber nicht (kaum) und BADGE-Varianten nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. Produkt 2 verhält sich vergleichbar zu Produkt 4 bzw. ist deutlich weniger problematisch als Produkte 1 und 3.
- Produkt 3: BPA erklärt die Effekte im L-YES und ER α -CALUX, beides östrogene Wirkungstests, und anti-AR-CALUX. Die Toxic Units für diese Tests liegen alle nahe bei 1. Die hohe Toxizität im Ceriodaphnien-Test ist auffällig, die teilweise auch mit BPA in Verbindung steht.
- Produkt 4: in allen Biotests unproblematisch, BPA und BPF waren nicht nachweisbar (möglicherweise auch wegen der höheren Bestimmungsgrenzen), die BADGE-Varianten traten in sehr geringen Konzentrationen, relativ zu den übrigen getesteten Produkten aber in recht hohen Konzentrationen, auf.
- Das DIBt-Schema für die Bewertung von Eluaten aus Baumaterialien erweist sich als vielversprechender Ansatz für die Erstbeurteilung von Biotest-Resultaten für organische Beschichtungen des Stahlhochbaus und Stahlwasserbaus. Eine noch aussagekräftigere und realistischere Bewertung wird ermöglicht, wenn für die Übertragung der Laborresultate auf die Realität eine Funktion definiert wird, die aber nicht vorliegt.
- Der höchste TOC betrug 37 mg/L, die biologische Abbaubarkeit wurde aber nicht bestimmt. Ein Abbautest wäre sinnvoll, um damit toxisch wirkende Substanzen auszuschliessen.
- Für BPA gibt es einen vom Oekotoxzentrum Eawag-EPFL vorgeschlagenen Grenzwert von 1.5 μ g/L (www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien). Die gemessenen BPA-Konzentrationen für Produkt 3 liegen bis zu 7000fach über diesem vorgeschlagenen Grenzwert. Die IAWR (Internationale Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke im

Rheineinzugsgebiet mit ihren drei Mitgliedsorganisationen; IAWR 2008) empfiehlt eine tiefere Zielvorgabe, „die es erlaubt, mit lediglich naturnahen Aufbereitungsverfahren Trinkwasser zu gewinnen“ (Donau -, Maas - und Rhein – Memorandum). Für endokrin wirksame Substanzen, wie BPA, gilt ein Zielwert von 0.1 µg/L. Die Eluate von Produkt 3 liegen bis zu 100'000fach über diesem Zielwert.

- Für die Beurteilung der Oberflächengewässergüte in der Schweiz liegt zurzeit ein Expertenbericht vor (Modulstufen-Konzept, Modul Oekotox; Kienle et al., 2015). Im MSK werden 0.4 ng/L als EEQ-Grenzwert vorgeschlagen. Demnach müsste das Eluat von Produkt 3 um das 1400fache und von Produkt 1 um das 60fache verdünnt werden, um den vorgeschlagenen EEQ-Grenzwert einzuhalten. Hierbei ist aber zu beachten, dass in der Praxis in vielen Fällen starke Verdünnungen auftreten können und eine unmittelbare Gefährdung für Wasserorganismen aus den vorliegenden Erkenntnissen nicht abgeleitet werden kann.

9 Literatur

- AFNOR, 2000. AFNOR T90-376. Water quality - determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test.
- Baier, R.: Stahlbau und Korrosionsschutz. Bundesanstalt für Wasserbau Karlsruhe, Referat B2, Chemie- und Korrosionslabor, Vortrag vom 14.06.2013.
- Bartels, H.: Korrosionsschutz im Stahlwasserbau, Januar 2014.
- BAW: Richtlinien für die Prüfung von Beschichtungssystemen für den Korrosionsschutz im Stahlwasserbau (RPB). BAW-Merkblätter und -Richtlinien, Bundesanstalt für Wasserbau, Karlsruhe, 2011.
- Burkhardt, M., Dietschweiler, C., Campiche, S., Junghans, M., Schifferli, A., Baumberger, D., Kienle, C., Vermeirssen, E., Werner, I.: Ecotoxicological assessment of immersion samples from façade render. Report for the Swiss Federal Office for the Environment FOEN, Bern. S. 34, 2013.
- BVK: Korrosionsschutz von Stahlbauten durch Beschichtungssysteme. Bundesverband Korrosionsschutz e. V., Köln, und dem Verband der Lackindustrie e.V., Frankfurt am Main.
- Deventer, K., Zipperle, J.: Ökotoxikologische Charakterisierung von Abfall – Verfahrensentwicklung für die Festlegung des Gefährlichkeitskriteriums „ökotoxisch (H14)“. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Bd. 2, Karlsruhe, 2004.
- DIBt: Grundsätze zur Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser. Deutsches Institut für Bautechnik, Berlin, 2011.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E.L.M., 2008. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *Journal of Environmental Monitoring* 10:612-621.
- Fischer, B., Milunov, M., Floredo, Y., Hofbauer, P., Joas, A.: Identification of relevant emission pathways to the environment and quantification of environmental exposure for Bisphenol A. Deutsches Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 2014.
- ISO 11348-3:2007. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO, 2008. ISO/CD 20665. Water quality. Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*.
- ISO 8692:2012. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- ISO/CD 19040-1 Water quality -- Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 1: Yeast estrogen screen (YES, *Saccharomyces cerevisiae*).
- ISO/CD 19040-3 Water quality -- Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay.
- IAWR - Internationale Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke im Rheineinzugsgebiet (2008). Donau -, Maas - und Rhein – Memorandum 2008. S. 20.

- Jakubke, H.-D., Karcher, R. (Hrsg.): Lexikon der Chemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001.
- Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Homazava, N., Werner, I.: Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließgewässern. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf. S. 85, 2012.
- Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I.: Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests – Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU). Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf. S. 51, 2015.
- Migné, V.: Supplement of the methodology for risk evaluation of biocides. Emission Scenario document for biocides used as masonry preservatives (product type 10), INERIS, 2002
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D.: Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21:16-23, 2002.
- OECD TG 455 (2012) OECD Guideline for the testing of chemicals – Performance-based test guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists. S. 39.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P.: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology & Chemistry* 15:241-248, 1996.
- Schreiber, U., Müller, J.F., Haugg, A., Gademann, R.: New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* 74:317-330, 2002.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B.I., Mueller, J.F.: Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 22:2554-2563, 2007.
- Schultis, T., Metzger, J.W.: Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57:1649-1655, 2004.
- Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K., Iguchi, T.: Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid (*Ceriodaphnia dubia*). *Chemosphere* 48:597-601, 2002.
- UBA: Leitlinie zur hygienischen Beurteilung von organischen Beschichtungen im Kontakt mit Trinkwasser (Beschichtungsleitlinie). Deutsches Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 30.11.2010.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P.: Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378-455, 2012

10 Anhang

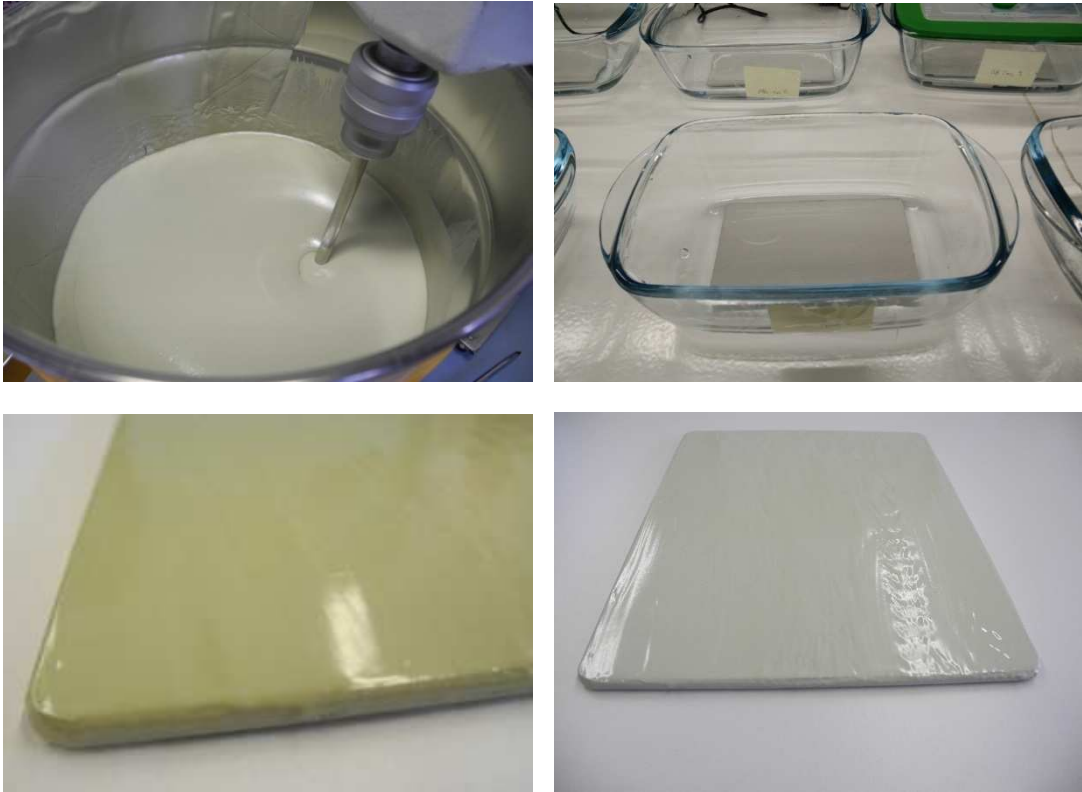


Abbildung 15: Herstellung der Prüfkörper auf Glasplatten für die Elutionsversuche.

Tabelle 8: Übersicht zu allen Effektdaten und Tests. Die in einem Versuch überlappenden EC50-Werte sind grau schattiert. * Die Probe von Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung (1T) wurde zusammen mit den Proben nach 7 Tagen Trocknung (7T) hergestellt. Unterstrichene Zahlen sind extrapoliert.

	PC50-Werte - % Probe im Medium				EC50-Werte - % Probe im Medium, 95 % Konfidenzintervalle			
	L-YES	ER α	anti-AR	anti-PR	Algen Photosynthese	Algen Wachstum	Bio-Lumineszenz	Cerio-daphnia
Blind	-	-	-	-	-	-	-	-
Produkt 1 1T	99	16	50	67	-	-	0.44 0.39 - 0.48	31 29 - 34
Produkt 2 1T	-	-	-	-	-	-	-	56 53 - 58
Produkt 3 1T	7.1	0.9	7.0	30	-	67 62 - 74	100 63 - 158	12 11 - 14
Produkt 4 1T*	-	-	-	-	-	-	-	57 52 - 63
Blind	-	-	-	-	-	-	-	63 55 - 73
Produkt 1 7T	-	<u>109</u>	83	-	-	-	2.3 2.1 - 2.4	53 39 - 72
Produkt 2 7T	-	-	77	-	-	-	-	11 9.4 - 12
Produkt 3 7T	3.9	0.5	2.6	<u>23</u>	-	31 28 - 35	32 29 - 36	2.8 2.6 - 3.1
Produkt 4 7T	-	-	-	-	-	-	-	67 62 - 72

	PC20-Werte - % Probe im Medium				EC20-Werte - % Probe im Medium			
	L-YES	ER α	anti-AR	anti-PR	Algen Photosynthese	Algen Wachstum	Bio-Lumineszenz	Cerio-daphnia
Blind	-	-	-	-	-	-	-	-
Produkt 1 1T	57	9.4	12	14	-	-	0.1	20
Produkt 2 1T	-	-	66	44	-	-	87	43
Produkt 3 1T	3.5	0.4	1.7	9.5	-	47	28	10
Produkt 4 1T*	-	-	-	-	-	-	-	36
Blind	-	-	-	-	-	-	-	40
Produkt 1 7T	-	33	50	44	-	-	0.6	13
Produkt 2 7T	-	-	65	67	-	-	53	5
Produkt 3 7T	2.0	0.2	<u>0.1</u>	8.4	-	21	13	1.5
Produkt 4 7T	-	-	-	-	-	-	-	50

	G-Werte				G-Werte			
	L-YES	ER α	anti-AR	anti-PR	Algen Photosynthese	Algen Wachstum	Bio-Lumineszenz	Cerio-daphnia
Blind	-	-	-	-	-	-	-	-
Produkt 1 1T	2	11	8	7	-	-	1282	5
Produkt 2 1T	-	-	2	2	-	-	1	2
Produkt 3 1T	29	259	57	11	-	2	4	10
Produkt 4 1T*	-	-	-	-	-	-	-	3
Blind	-	-	-	-	-	-	-	2
Produkt 1 7T	-	3	2	-	-	-	171	8
Produkt 2 7T	-	-	2	-	-	-	2	22
Produkt 3 7T	51	468	<u>766</u>	12	-	5	8	67
Produkt 4 7T	-	-	-	-	-	-	-	2

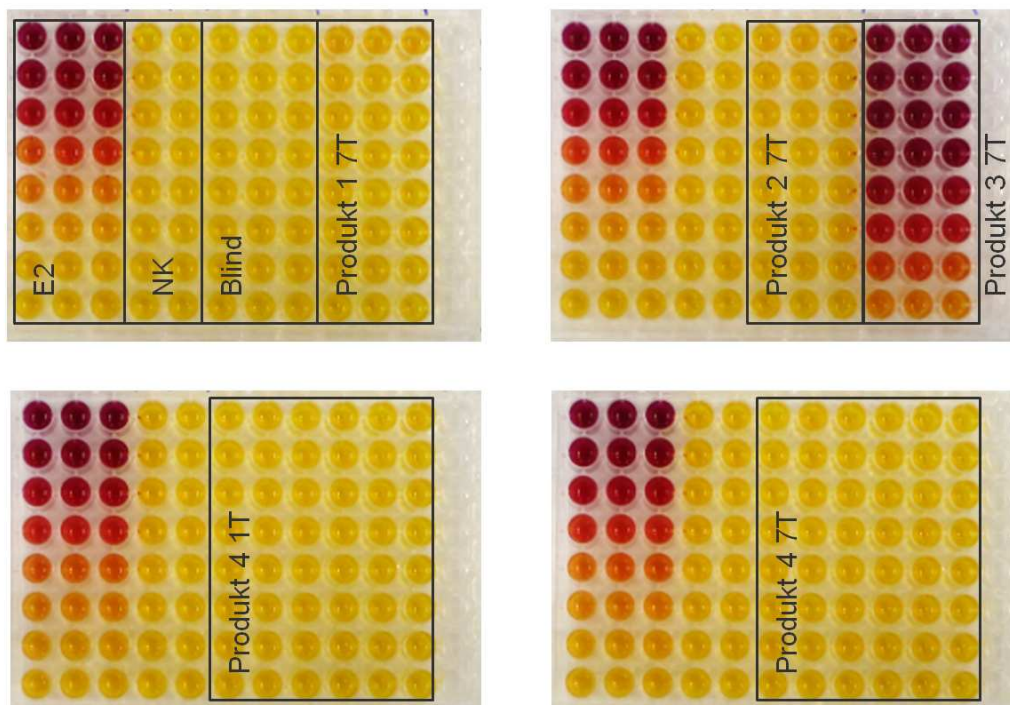


Abbildung 16: Test im L-YES für Blindproben und 4 Produkte nach 7 Tagen Trocknung (7T; ausser links unten: Produkt 4 nach 1 Tag Trocknung, 1T). Nur Produkt 3 zeigt bei 7T eine östrogene Wirkung. E2: 17β-Estradiol Verdünnungsreihen; NK: Negativkontrollen.

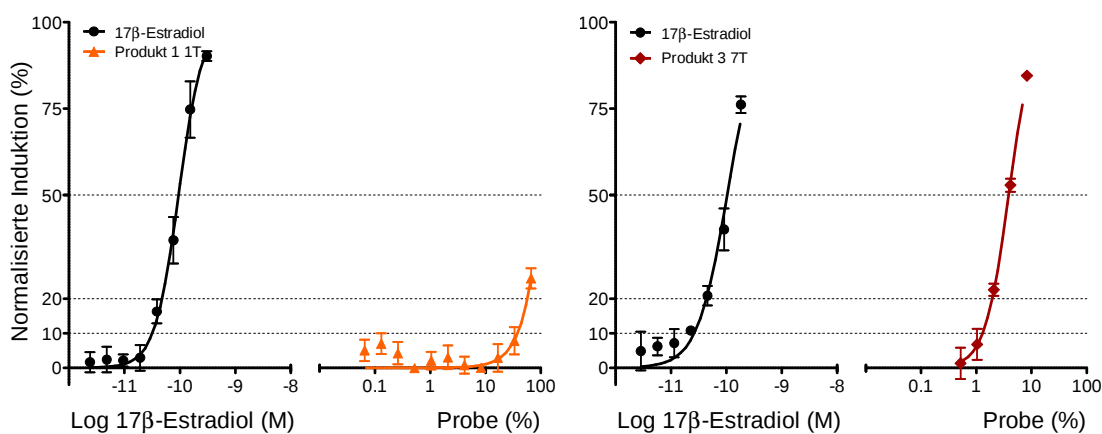


Abbildung 17: Links: Dosiswirkungskurven von 17β-Estradiol im L-YES für Produkt 1 nach 1 Tag Trocknungsdauer (leicht positiv in Abbildung 8); rechts: Dosiswirkungskurven von 17β-Estradiol im L-YES für Produkt 3 nach 7 Tagen Trocknungsdauer (Positiv in Abbildung 16).

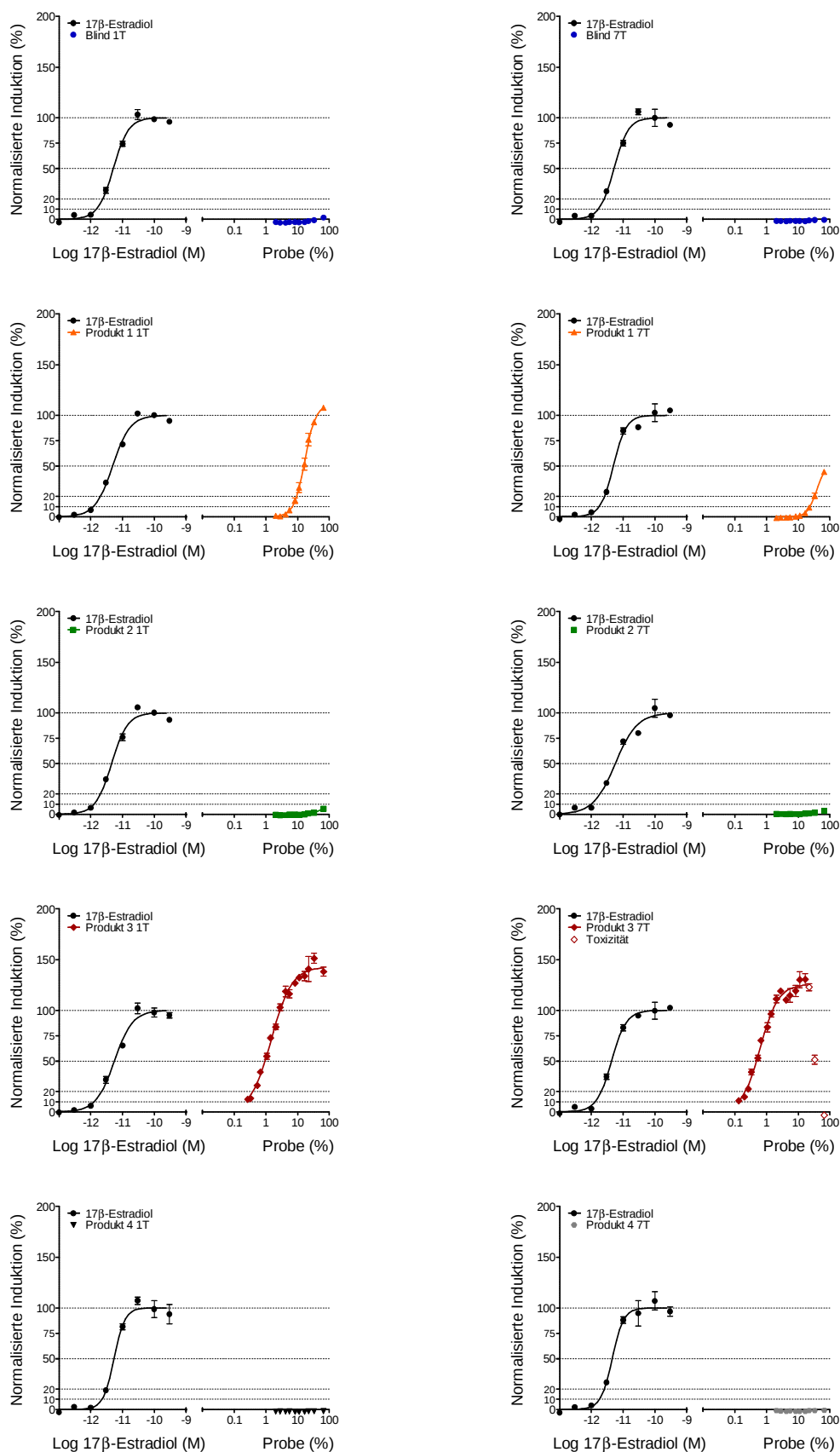


Abbildung 18: Dosiswirkungskurven von 17β-Estradiol im ERα-CALUX für Blindproben und vier Produkte nach 1 Tag Trocknungsdauer (1T, links) oder 7 Tagen (7T, rechts).

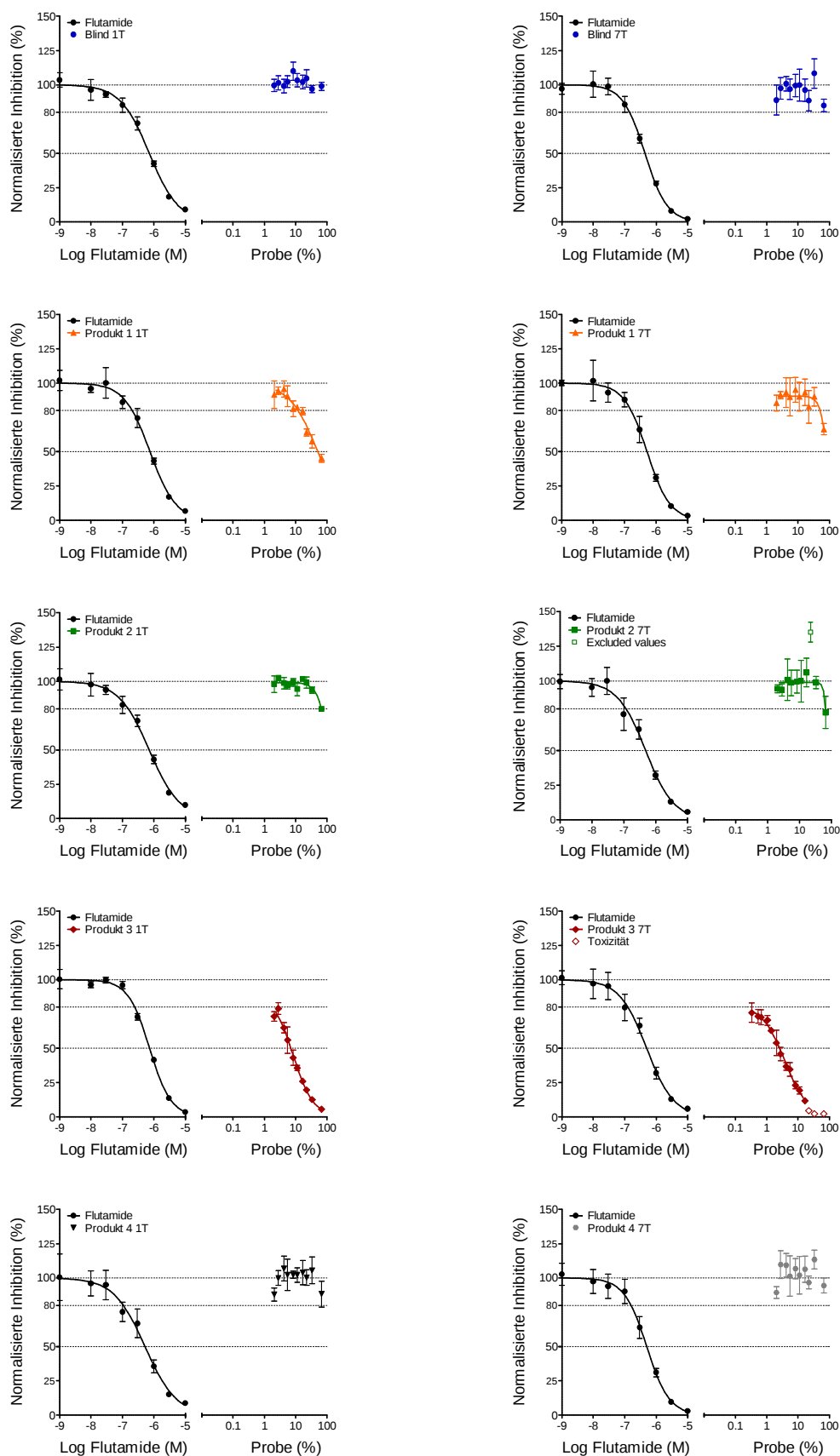


Abbildung 19: Dosiswirkungskurven von Flutamide im anti-AR-CALUX für Blindproben und vier Produkte nach 1 Tag Trocknungsdauer (1T, links) oder 7 Tagen (7T, rechts).

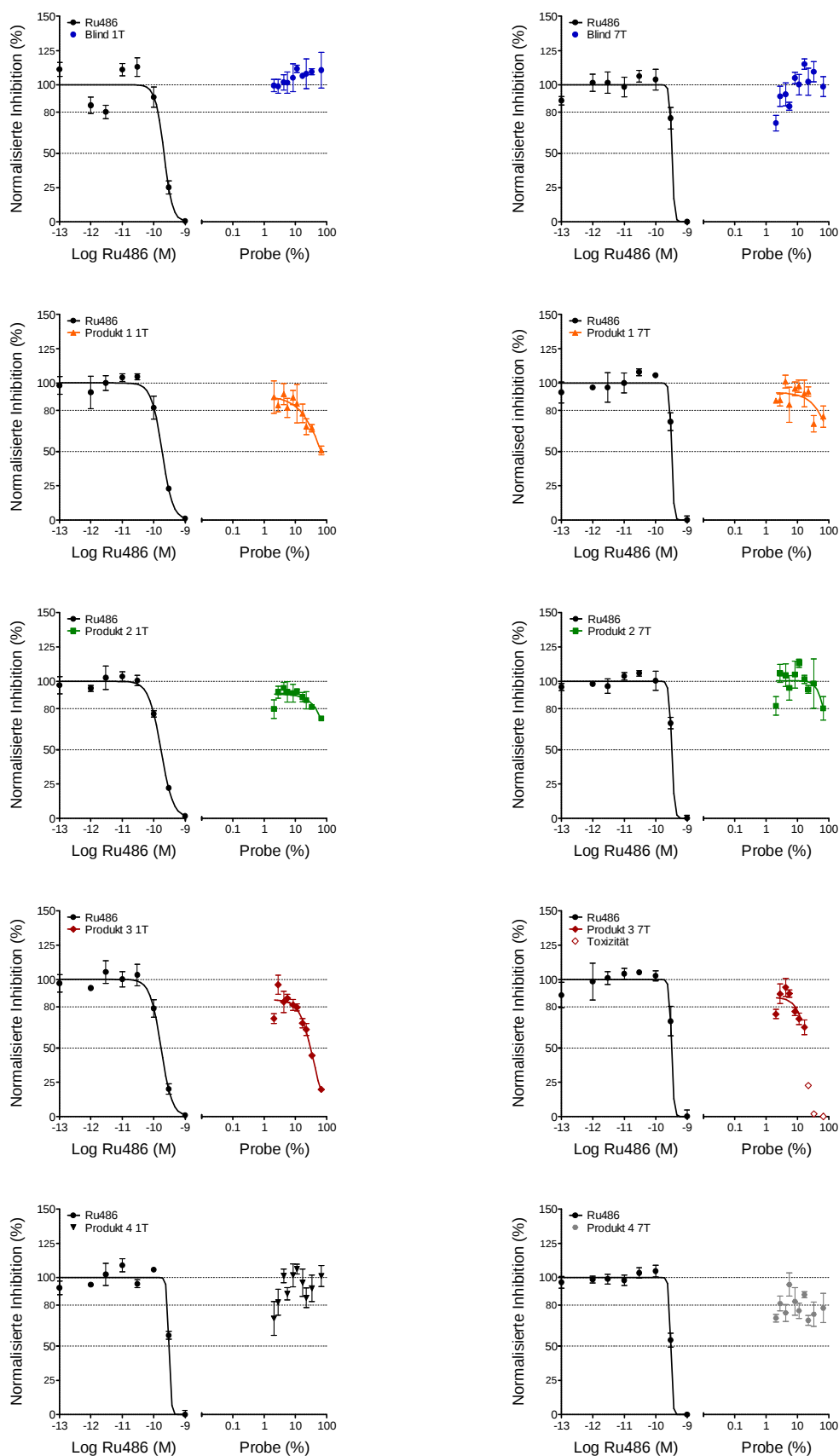


Abbildung 20: Dosiswirkungskurven von Ru486 im anti-PR-CALUX von Blindproben und vier Produkte nach 1 Tag Trocknungsdauer (1T, links) oder 7 Tagen (7T, rechts).

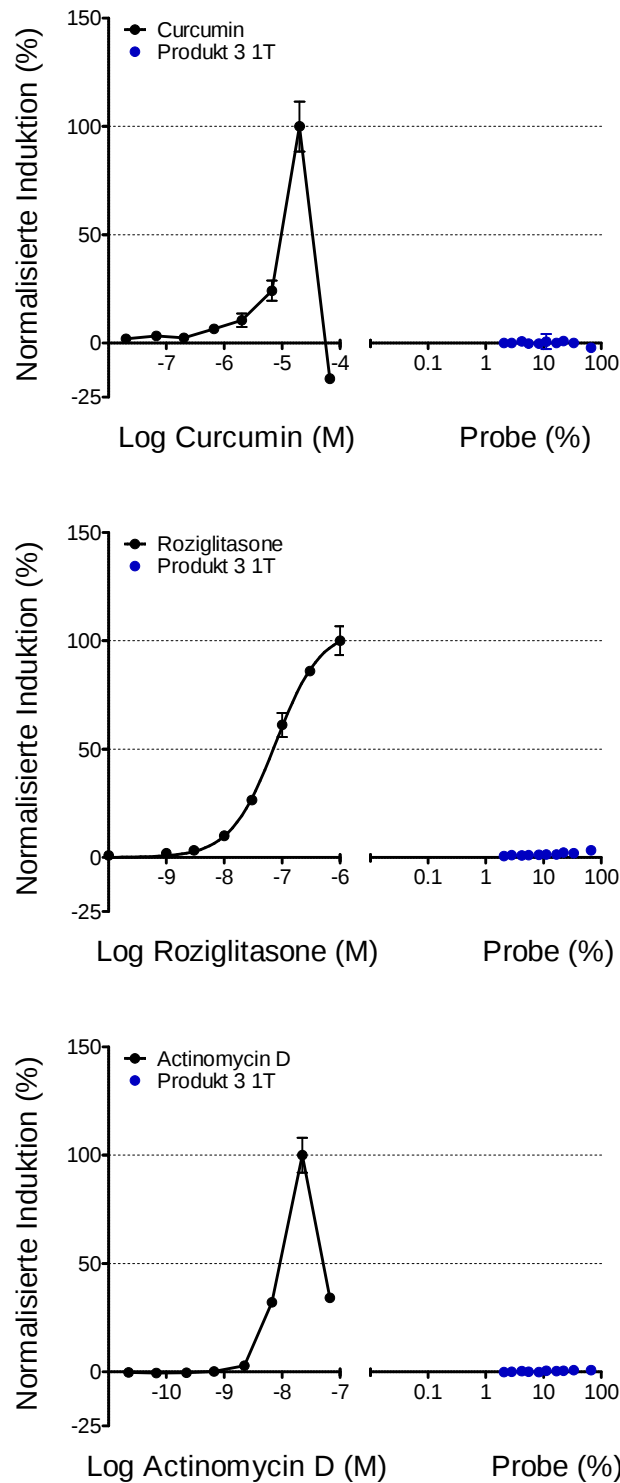


Abbildung 21: Drei CALUX-Tests Nrf2 (oben), PPAR γ 2 (Mitte) und P53 (unten), in denen keine Effekte in den wässrigen Proben beobachtet wurden. Dargestellt ist das Beispiel der Probe von Produkt 3 nach 1 Tag Trocknung einschliesslich der jeweiligen Positivkontrolle.

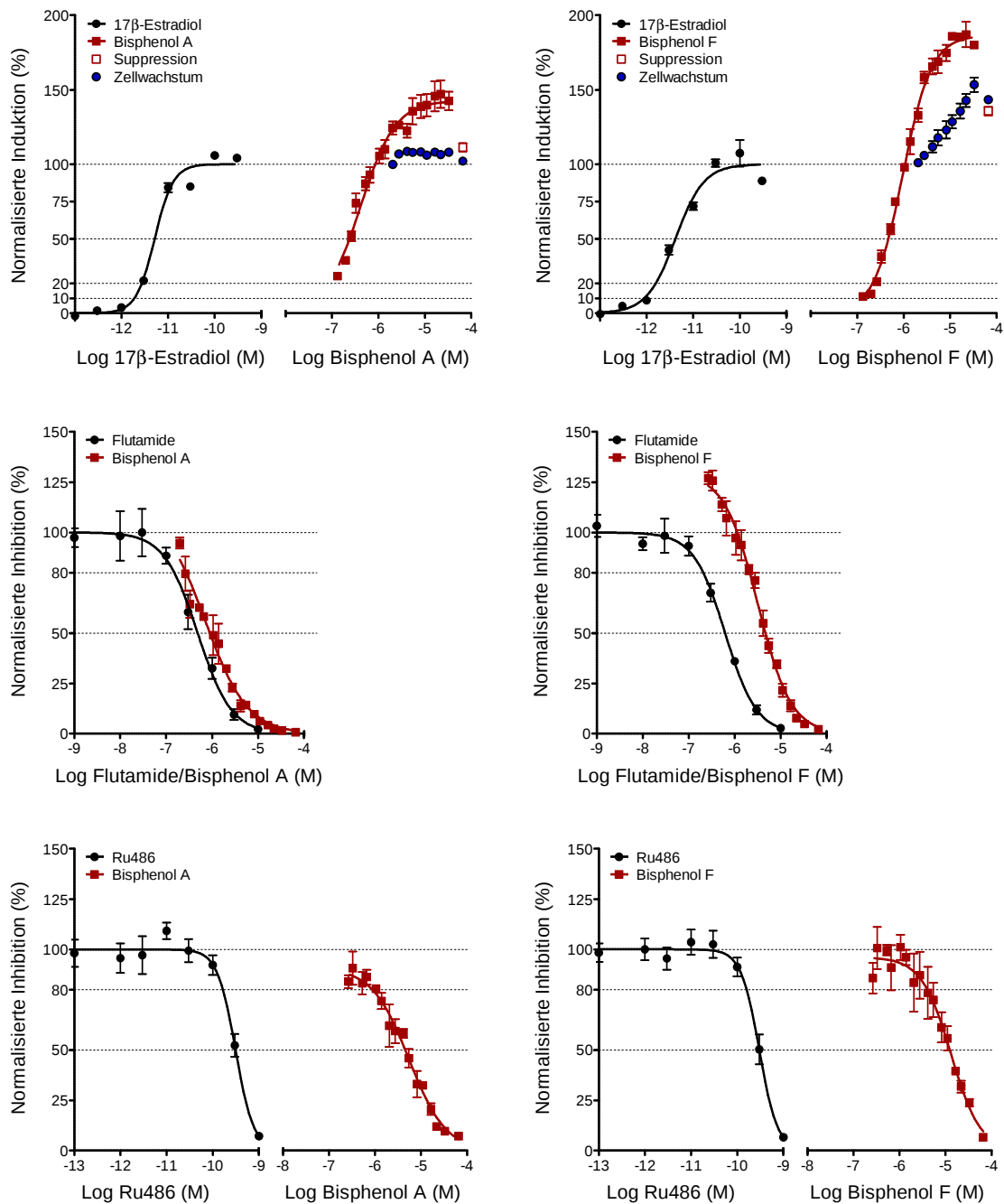


Abbildung 22: Dosiswirkungskurven von Bisphenol A (BPA) und Bisphenol F (BPF) im ERα-CALUX (oben, mit 17β-Estradiol als Referenz), anti-AR-CALUX (Mitte, mit Flutamide als Referenz) und anti-PR-CALUX (unten, mit Ru486 als Referenz). In den beiden oberen Grafiken ist auch Zellwachstum im CALUX dargestellt (Kontrolle = 100 %). * BPF fördert Zellwachstum um mehr als 20 % ab einer Konzentration von $8.3 \cdot 10^{-6}$ M. ** Die beobachtete Suppression der Induktion in ERα-CALUX und bei der höchsten BPA- und BPF- Konzentration beruht nicht auf einer Inhibition des Zellwachstums (Toxizität), sondern sie könnte ein Indiz für eine nicht-monotone Dosiswirkungsbeziehung darstellen (Vandenberg et al., 2012).

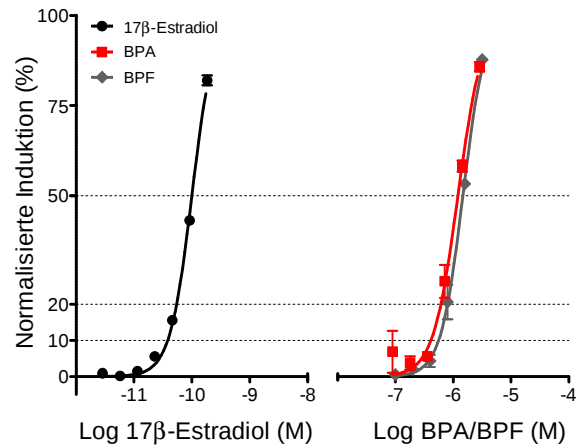


Abbildung 23: Dosiswirkungskurven im L-YES von 17β-Estradiol (Referenz), Bisphenol A (BPA) und Bisphenol F (BPF).

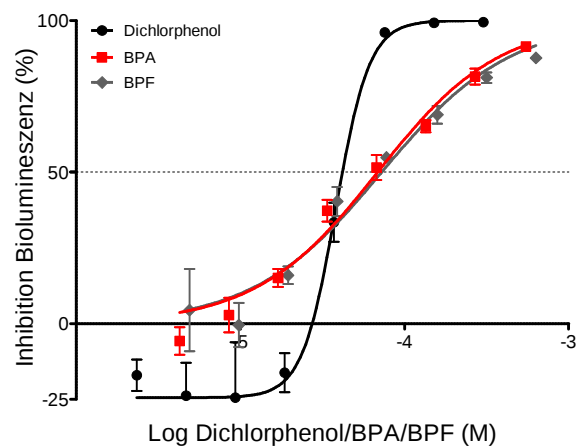


Abbildung 24: Dosiswirkungskurven im Leucht bakterientest von Dichlorphenol (Positivkontrolle), Bisphenol A (BPA) und Bisphenol F (BPF).

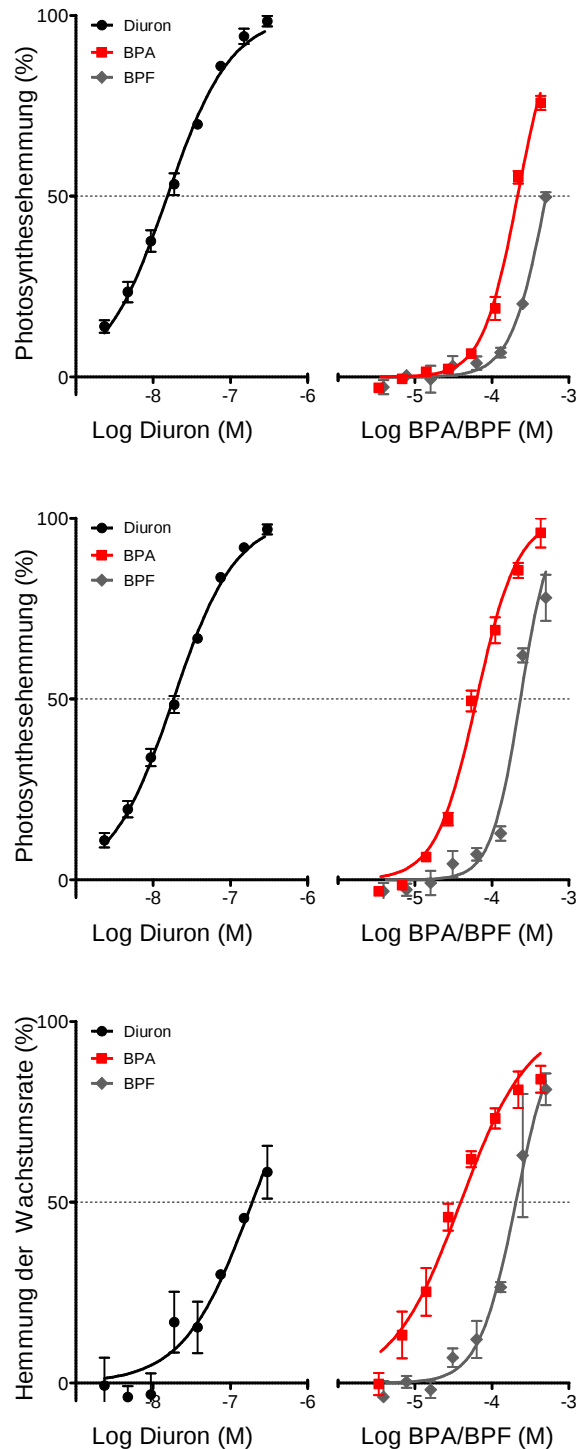


Abbildung 25: Dosiswirkungskurven im kombinierten Algentest von Diuron (Referenz), Bisphenol A (BPA) und Bisphenol F (BPF). Oben: Endpunkt Photosynthesehemmung nach 2 h; Mitte: Endpunkt Photosynthesehemmung nach 24 h; unten: Endpunkt Hemmung der Wachstumsrate nach 24 h.