





Leitfaden RiSKWa – die Bewertung anthropogener Spurenstoffe im Wasserkreislauf (GOW-Konzept, Tox-Box-Projekt)

Thomas Braunbeck, Tamara Grummt & Henner Hollert

Umwelt
Bundesamt

RWTH AACHEN
UNIVERSITY

Aquatische Ökologie & Toxikologie, Univ.
Heidelberg, INF 504, D-69120 Heidelberg
Umweltbundesamt, Heinrich-Heine-Straße 12,
D-08645 Bad Elster
Institut für Umweltforschung, RWTH Aachen,
Worringerweg 1, D-52074 Aachen



Bereitstellung von Wasser – die Herausforderung für die Menschheit



Wasser als wertvolles, aber gefährdetes Gut





Verbundprojekt Tox-Box:

Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung

Koordination: Dr. Tamara Grummt,

Umweltbundesamt Bad Elster

Anthropogene Spurenstoffe



Chemische
Analytik!

←→

Toxikologische
Sicherheit?



Der Gesundheitliche Orientierungswert – das “GOW-Konzept”

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch -
Gesundheitsschutz 2003 · 46:249–251
DOI 10.1007/s00103-002-0576-7

Empfehlung des Umweltbundesamtes

Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht

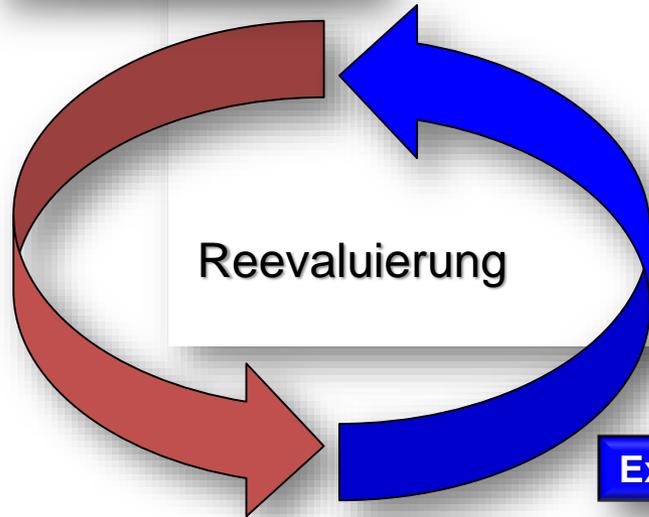
Empfehlung des Umweltbundesamtes
nach Anhörung der Trinkwasser
beim Umweltbund

**+ Paradigmenwechsel in
der Toxikologie: in vitro!**

Wissenschaftlicher
Kenntnisstand

Reevaluierung

Exposition



Das Konzept des Gesundheitlichen Orientierungswerts (GOW)

Gentoxisch + meta-bolisch für den Menschen relevant?	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	
Gentoxisch?		Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein	Nein	
Immun- und/oder neurotoxisch?			Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein	
Subchronische Toxizität?				Ja / keine Daten	Nein	Nein	
Chronische Toxizität?					Ja / keine Daten	Nein	
Gesundheitlicher Orientierungswert (GOW; µg/L)	Besorgnisbereich					3.0 µg/L (GOW ₅)	> 3,0 µg/L
	↓	↓	↓	↓	↓	1.0 µg/L (GOW ₄)	
	≤ 0.01 µg/L (GOW ₀)	0.1 µg/L (GOW ₁)	0.3 µg/L (GOW ₃)	Vorsorgebereich			

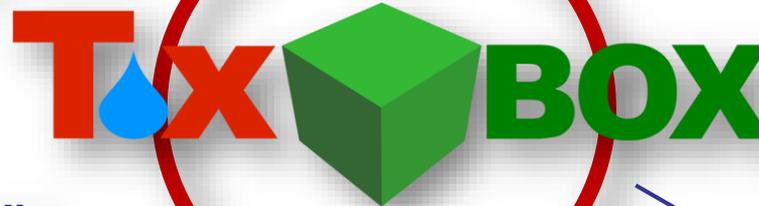
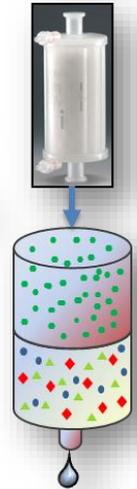


**Modul:
Endokrine
Effekte**

TP 11: Incos Boté, Nieder-Olm
TP 12: RWTH, Aachen

Modul: Exposition

TP 1: Rhein-Energie, Köln
TP 2: UFZ, Leipzig



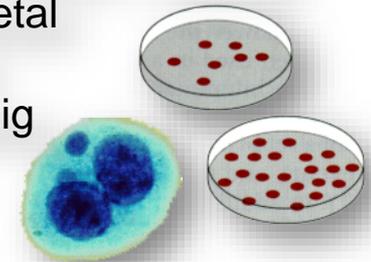
Modul: Neurotoxizität

TP 9: UBA, Bad Elster
TP 10: Universität Heidelberg



Modul: Genotoxizität

TP 3: RheinEnergie, Köln
TP 4: DLR, Köln
TP 5: Hydrotox GmbH, Freiburg
TP 6: DIfE, Nuthetal
TP 7: DLR, Köln
TP 8: UFZ, Leipzig



Koordination
UBA, Bad Elster

Ziele des Tox-Box Projekts

- (1) **Auswahl der Testverfahren** auf der Basis der umfangreichen Stoffprüfung für die einzelnen bewertungsrelevanten Endpunkte:
 - Gentoxizität
 - Neurotoxizität
 - Endokrine Effekte
- (2) Festschreibung der **Testprotokolle** und Festlegung der **Bewertungskriterien**
- (3) Leitfaden zur **hierarchischen Stoffbewertung** und **Festschreibung der Handlungsoptionen** auf regulatoriver Ebene

Die Tox-Box Substanzliste

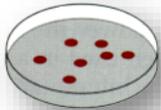
1,1,1,2-Tetrachlorethan	Acesulfam	Chloralkane, C 10-13	Nonylphenol
1,2-Dibrom-3-chlorpropan	Aclonifen	Citalopram	Perfluoroctansulfonat (PFOS)
17 α -Ethinylestradiol (EE2)	Acridin	Coffein	Perfluoroktansäure (PFOA)
1-Acetyl-1-methyl-2-dimethyl-oxamoyl-2-phenyl-hydrazid (AMDOPH)	Amidotrizoesäure	Cyclophosphamid	Phosphorsäure-tris-(2-chlorpropyl)-ester TCPP
	AMPA	Cypermethrin	
	Atrazin	Dichlorvos	Quinoxifen
2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol (TMDD)	Benzo[a]pyren	Diclofenac	Resorcinol
	Benzotriazol	Dicofol	Sotalol
2,4-Dichlorphenol	Beta-Sitosterol	Diethylamin	Sulfamethoxazol
2,4-Dinitrotoluol	Bifenox	Heptachlor-epoxid	Sulfolan
2,6-Dichlorbenzamid	Bis(2-methoxyethyl)ether (Diglyme)	Hexabromcyclo-dodecan	Tertbutryn
2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-f]chinolin	Bisphenol A	Hexachlorbenzol	TOSU
2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol	Bromierte Diphenylether	Hexachlorbutadien	Tributylzinnoxid (TBTO)
3,3-Dichlorbenzidin	Carbamazepin	Iopamidol	Triphenylphosphin-oxid
3,4-Dichloranilin	Carbamazepin-Epoxid	Linuron	Venlafaxin
4-Amino-3,3-dichlor-dinitrobiphenyl	Carbendazim	N-Nitrosodimethylamin	
		N-Nitrosomorpholin (NMOR)	

Das Tox-Box-Modul Gentoxizität

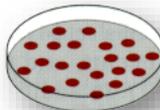
In vitro-Kurzzeittests

Bakterielle Tests

Ames I



Kontrolle



Gentoxisch

umu-Test



Cytotoxizitätstests

Plating efficiency

Apoptose

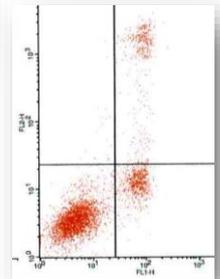
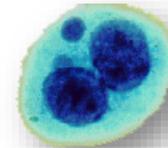
Neutralrottest

P53-Induktion

Reaktive Sauerstoff-
spezies (ROS)

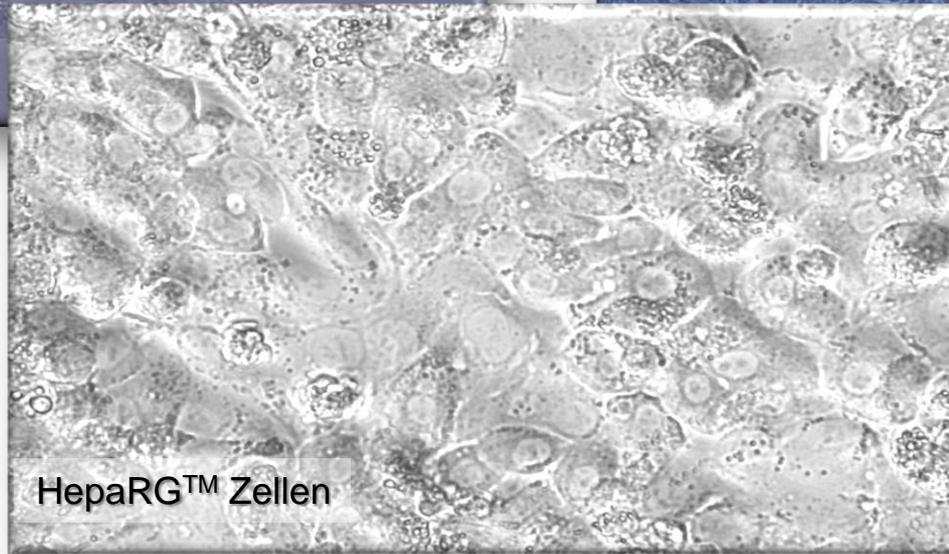
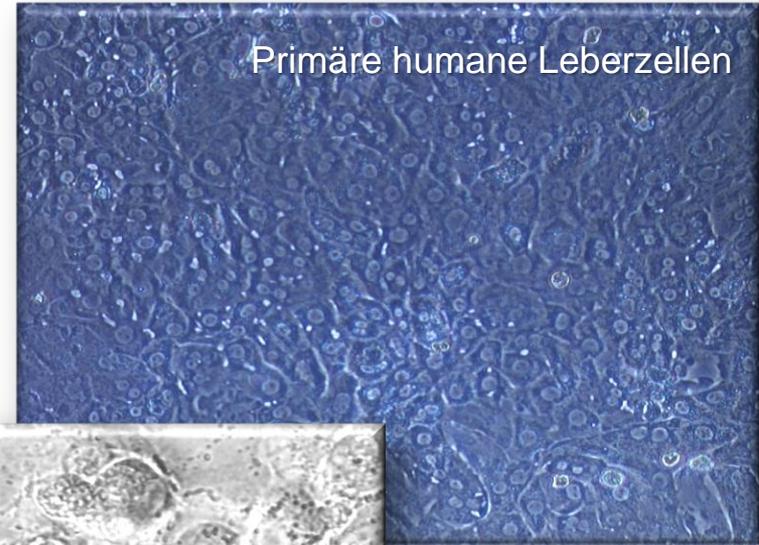
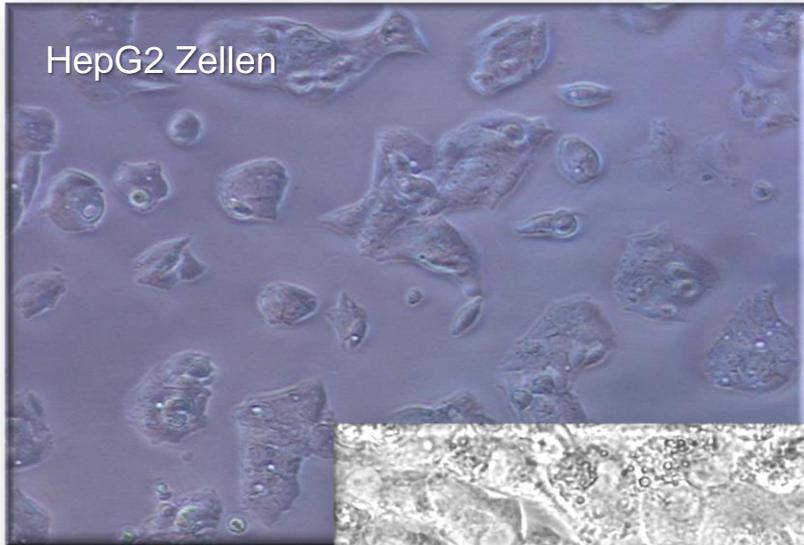
Zellkulturtests

Mikrokerntest



FACS

Gentoxizität: Einbeziehung des humanrelevanten Metabolismus



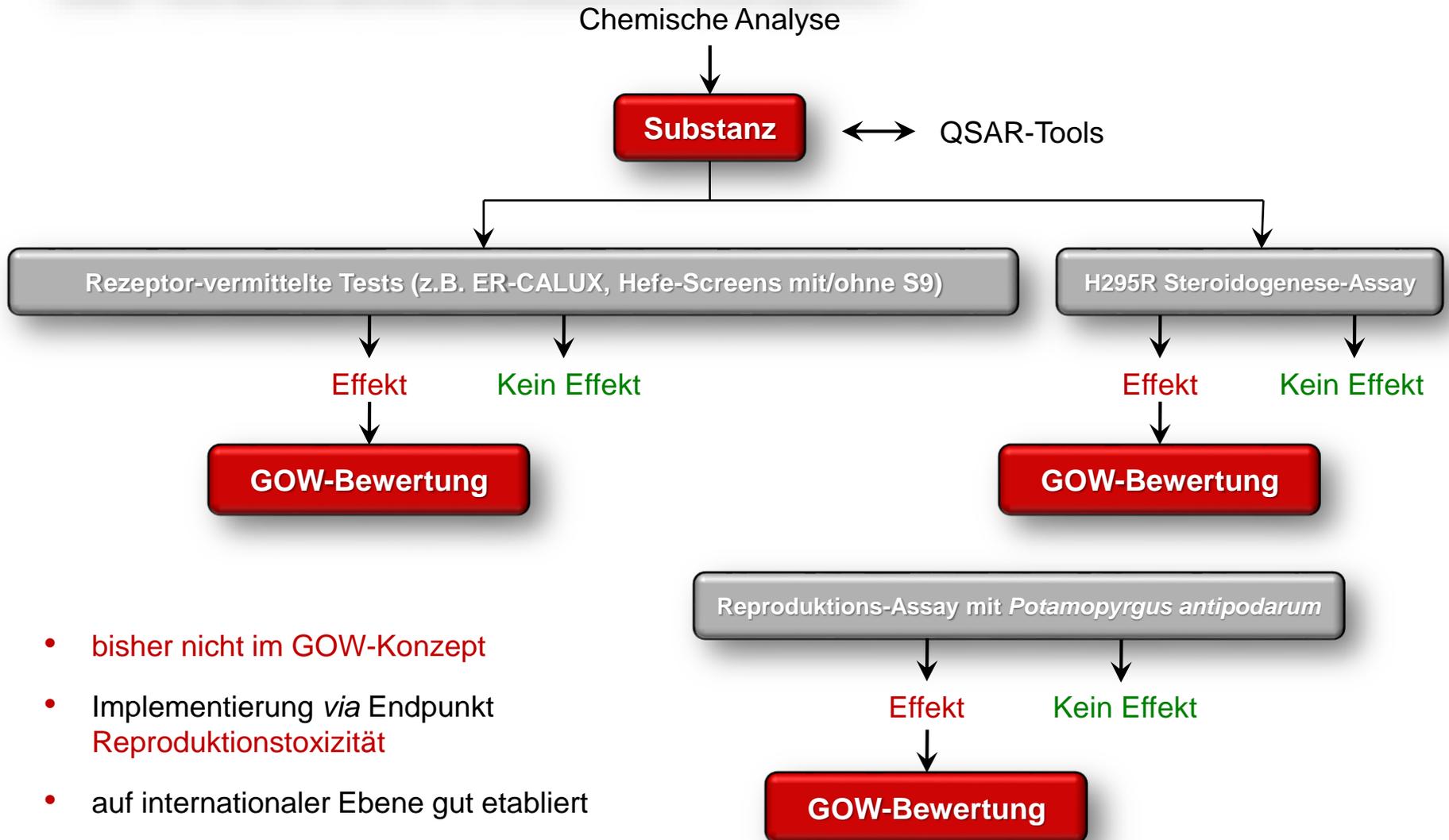
Das Tox-Box-Modul Endokrine Disruption

Gentoxisch + metabolisch für den Menschen relevant?	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	
Gentoxisch?		Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein	Nein	
Immun- und/oder neurotoxisch?			Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein	
Subchronische Toxizität?				Ja / keine Daten	Nein	Nein	
Chronische Toxizität?					Ja / keine Daten	Nein	
Gesundheitlicher Orientierungswert (GOW; µg/L)	Besorgnisbereich					3.0 µg/L (GOW ₅)	> 3,0 µg/L
	≤ 0.01 µg/L (GOW ₀)	0.1 µg/L (GOW ₁)	0.3 µg/L (GOW ₃)	1.0 µg/L (GOW ₄)	Vorsorgebereich		

Endokrine Effekte ?

- keine Leitlinien für das experimentelle Design von endokrinen Teilstudien
 - hohe Relevanz des Trinkwassers für die menschliche Gesundheit
- Integration endokriner Effekte in harmonisierte Teststrategie

Das Tox-Box-Modul Endokrine Disruption



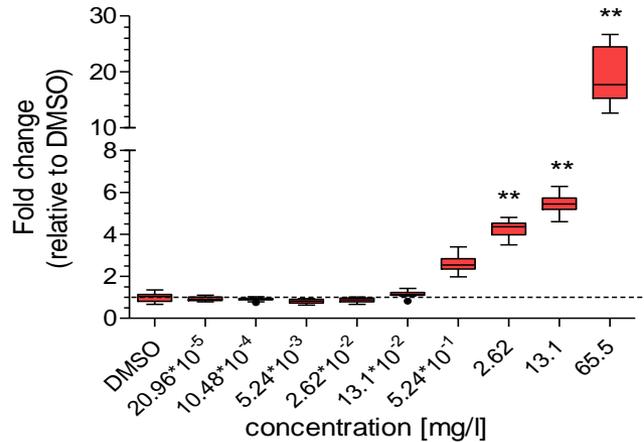
- bisher nicht im GOW-Konzept
- Implementierung *via* Endpunkt Reproduktionstoxizität
- auf internationaler Ebene gut etabliert

Vergleich CALUX (mit / ohne S9) und YES

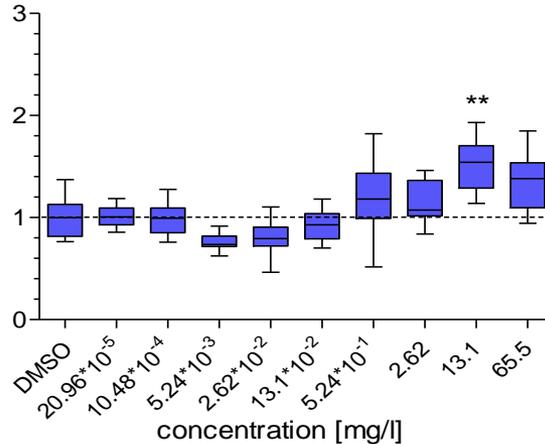
Substanz	U2OS ohne S9	U2OS mit S9	RYES
Benzo(a)pyren (BaP)	Kein Effekt	0.03	0.05
3,3'-Dichlorobenzidin (DCB)	Kein Effekt	0.25	0.3
2,4-Dichlorophenol (DCP)	Kein Effekt	0.03	0.01
3,4-Dichloroanilin (DCA)	Kein Effekt	6.25	1.5
Diclofenac	Kein Effekt	2.98	Kein Effekt
Atrazin	Kein Effekt	Kein Effekt	Kein Effekt
Tributylzinnoxid	Kein Effekt	Kein Effekt	Kein Effekt
Diatrizoic acid	Kein Effekt	Nicht getestet	Kein Effekt
Sulfamethoxazol	Kein Effekt	Kein Effekt	Kein Effekt
Tris (1-chloro-2-propyl) phosphat	Kein Effekt	Nicht getestet	Kein Effekt
Perfluoroktansäure (PFOA)	Kein Effekt	Nicht getestet	Kein Effekt

H295r-Assay für nicht-rezeptorvermittelte endokrine Wirkung

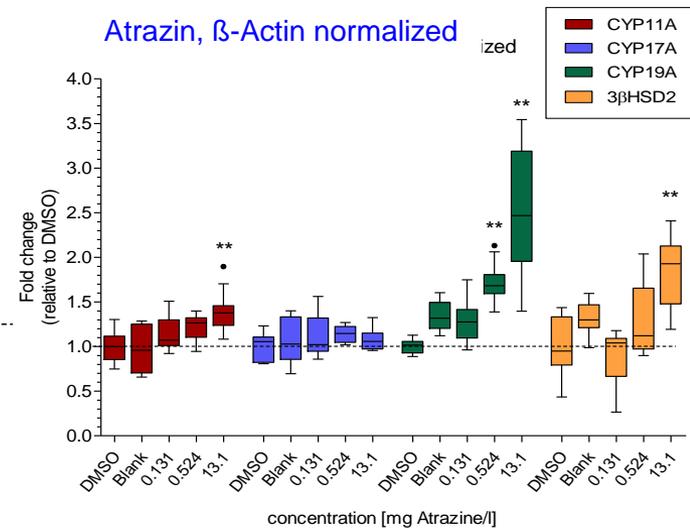
Atrazin (Estradiol)



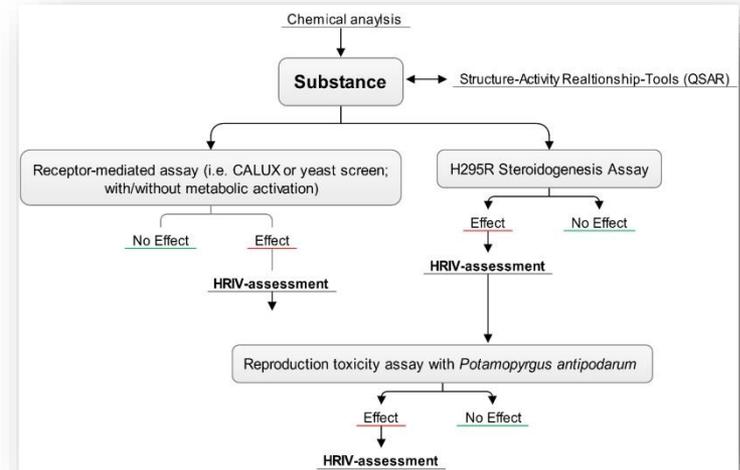
Atrazin (Testosteron)



Atrazin, β -Actin normalized



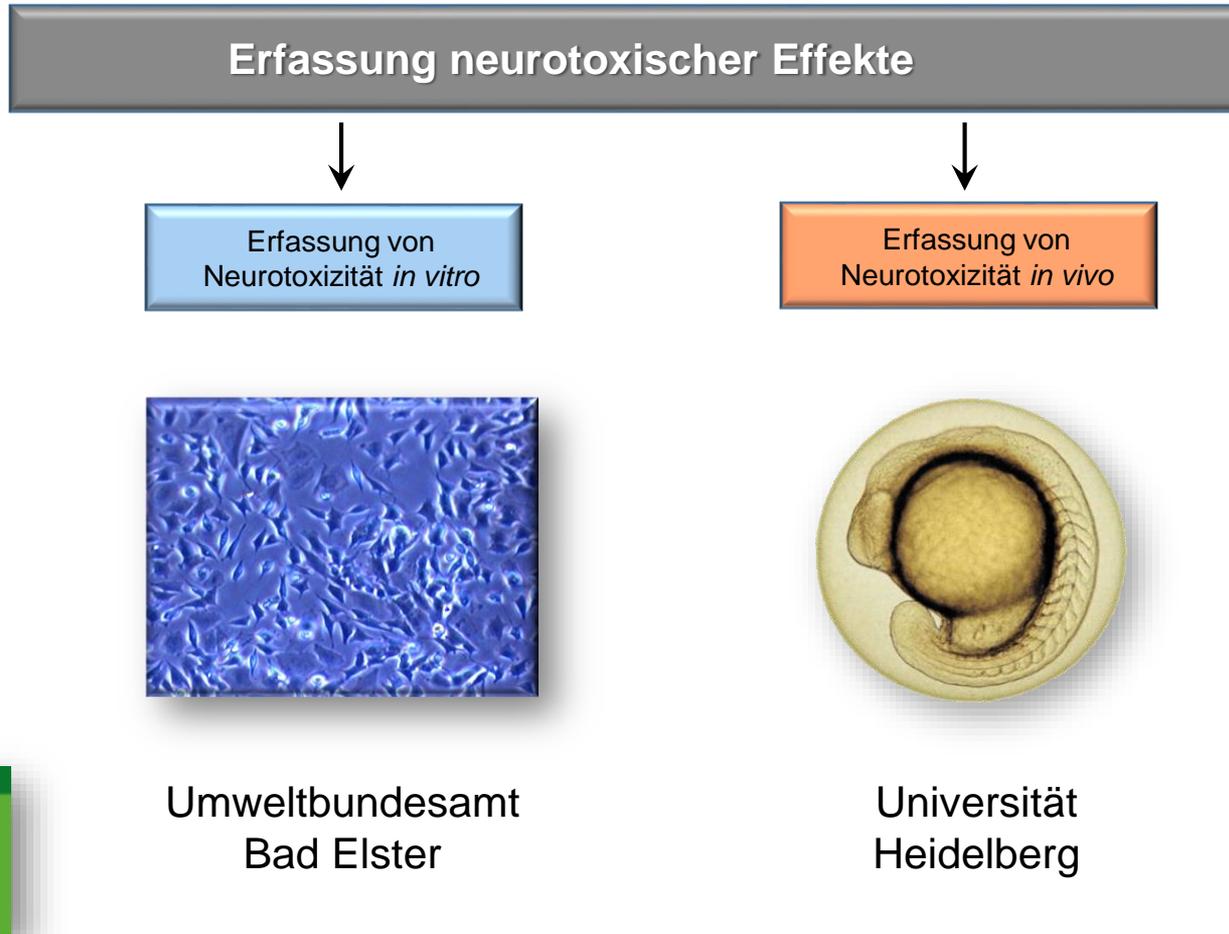
- EDCs sind ein wichtiger MoA für Trinkwasser
 - **Notwendigkeit der Implementierung in die GOW-Strategie**
- EDCs wurden erfolgreich in das GOW-Konzept integriert
- **geeignete Testbatterie**
- **Metabolismus** unbedingt berücksichtigen!
- **S9-Supplementierung** in Teststrategie integriert
- zusätzlicher Einsatz von **QSARs** sinnvoll
- EDCs → Tox-Box Leitfaden



Neurotoxizität im GOW-Konzept

Gentoxisch + meta-bolisch für den Menschen relevant?	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Gentoxisch?		Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein	Nein
Immun- und/oder neurotoxisch?	→		Ja / keine Daten	Nein	Nein	Nein
Subchronische Toxizität?			↓	Ja / keine Daten	Nein	Nein
Chronische Toxizität?			↓		Ja / keine Daten	Nein
Gesundheitlicher Orientierungswert (GOW; µg/L)	Besorgnisbereich				3.0 µg/L (GOW ₅)	> 3,0 µg/L
	≤ 0.01 µg/L (GOW ₀)	0.1 µg/L (GOW ₁)	0.3 µg/L (GOW ₃)	1.0 µg/L (GOW ₄)	Vorsorgebereich	

Das Tox-Box-Modul Neurotoxizität

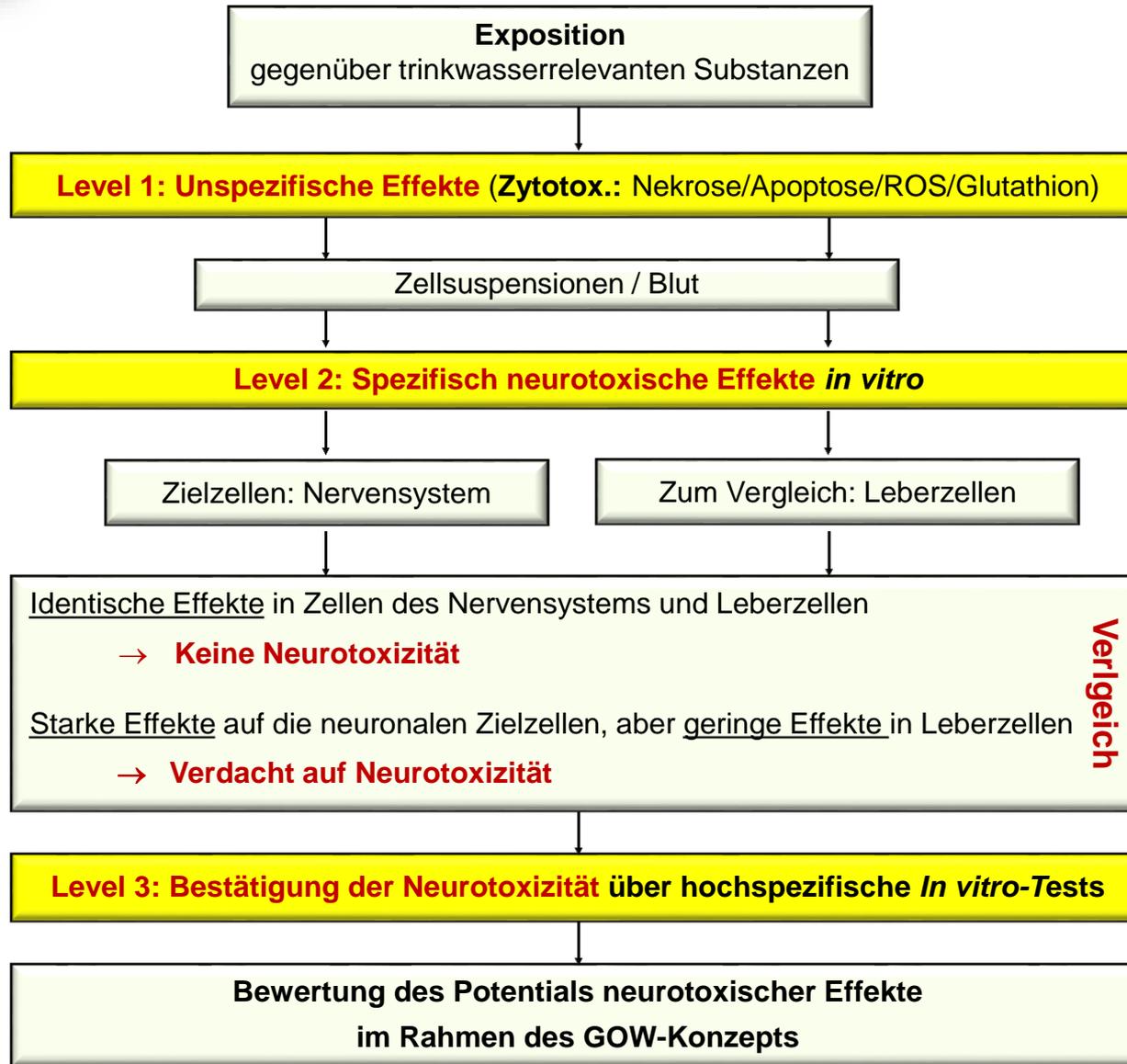


Umweltbundesamt
Bad Elster

Universität
Heidelberg



**In vitro-Neurotoxizität
im Rahmen des GOW-Konzepts**



***In vitro*-Neurotoxizität Level 1: Unspezifische Effekte**

Jurkat:
Humane T-Lymphocyten

U 937:
Hystiocyt. Lymphomazellen

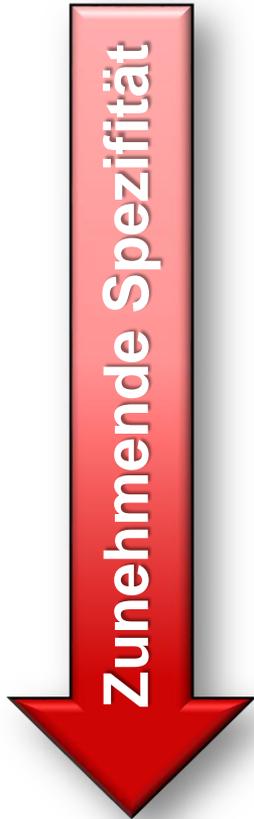
Oxidativer Stress (ROS) → große Bedeutung für Nervenzellen

Glutathionlevel

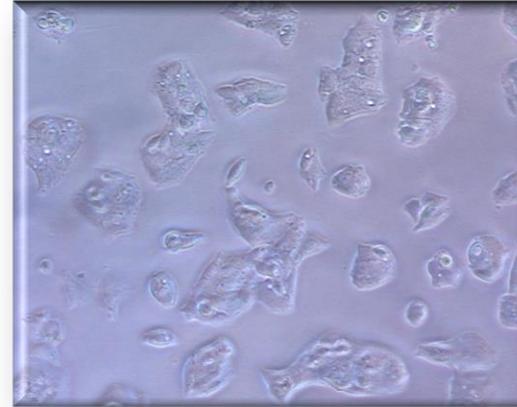
Propidiumiodid-Nekrosetest → Ausschluss von Zytotoxizität

Apoptosetest → Ausschluss zytotoxischer Konzentrationen

In vitro-Neurotoxizität Level 2: Spezifische Effekte in versch. Zelllinien



HepG2 – Leberzellen



SH-SY5Y – Neuroblastomzellen

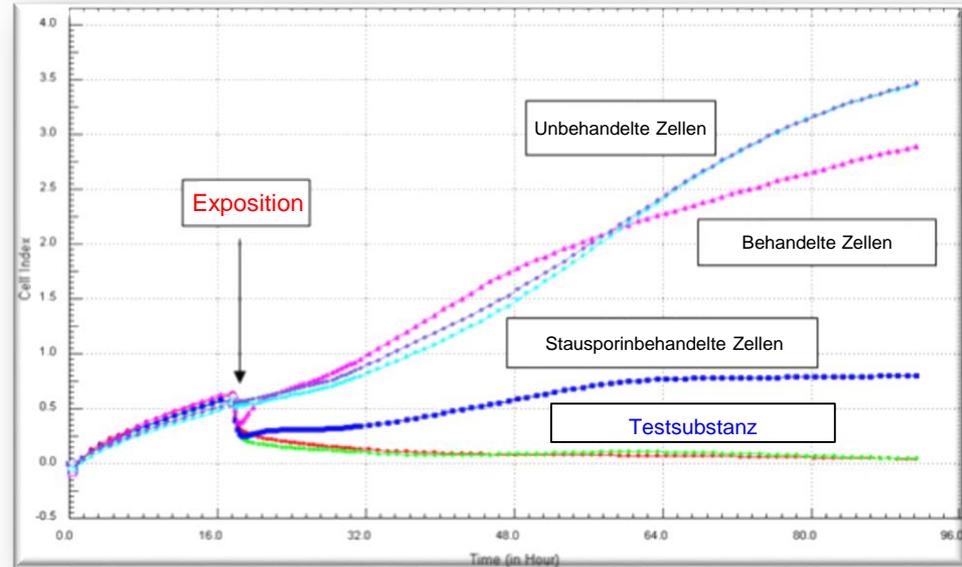


Neurotoxizität

In vitro-Neurotoxizität Level 2: Neuronenspezifische Effekte



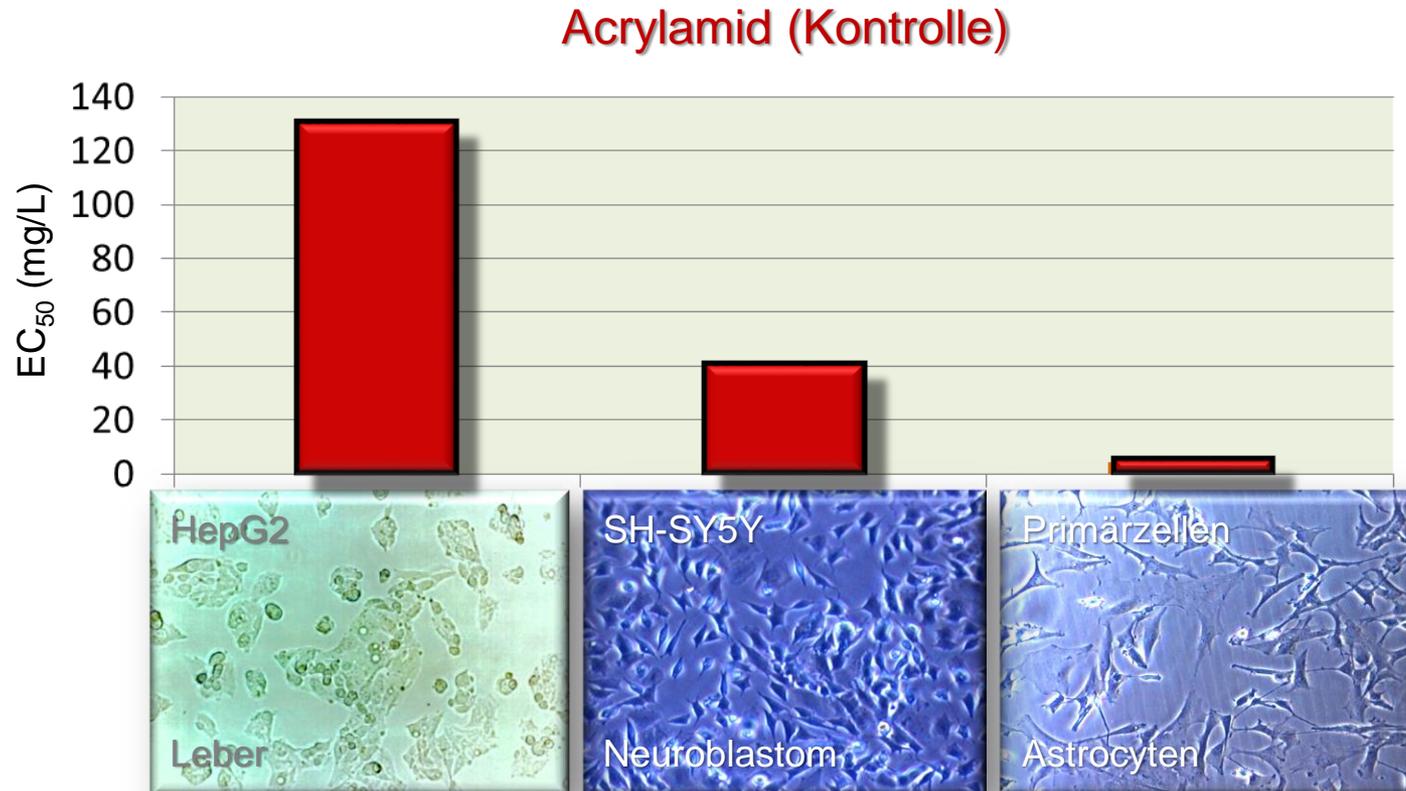
Real-time Zellanalyse



EC₅₀-Werte bei HepG2- und SHSY5Y-Zellen mit Real-time Zellanalyse

	EC ₅₀ HepG2	EC ₅₀ SH-SY5Y
Acrylamid (Kontrolle)	130	40
Dichlorvos	17	8
Perfluoroktansulfonsäure (PFOS)	66	170

In vitro-Neurotoxizität Level 3: Hochspezifische neurotoxische Effekte...

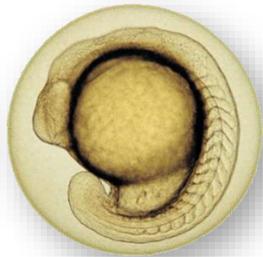


Neurotoxizität *in vivo* in Embryonen des Zebraabürblings

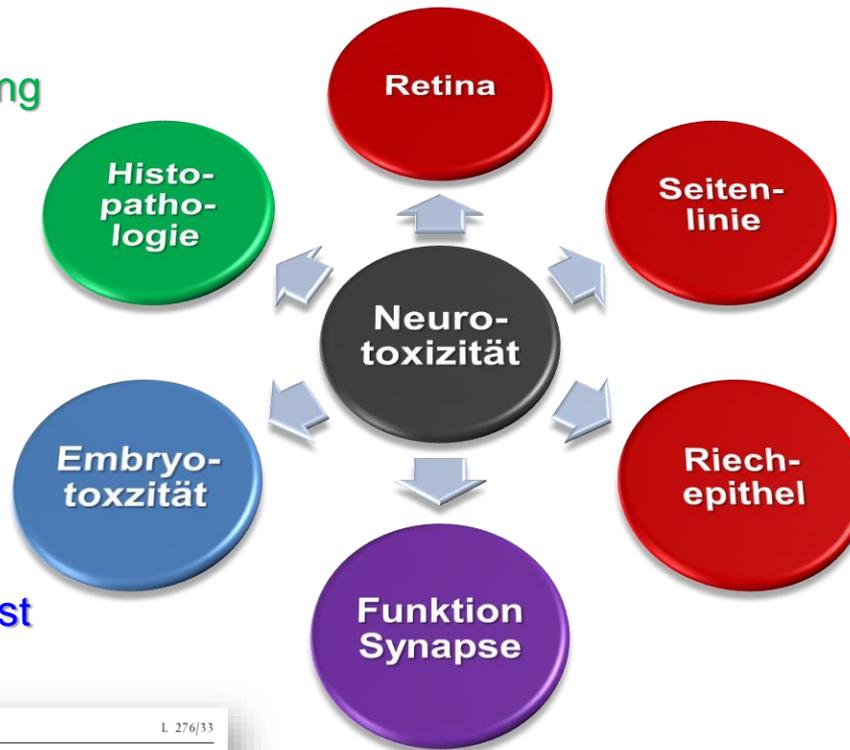
→ Verifizierung der *In vitro*-Beobachtungen



HE-Färbung



Fischembryotest (OECD 236)



Fluoreszenzmikroskopie

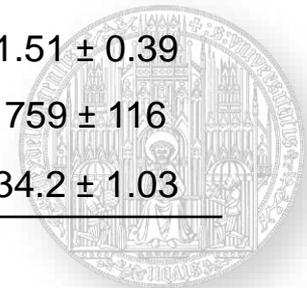


Range-finding für Neurotoxizitätsprüfungen über den Fischembryotest

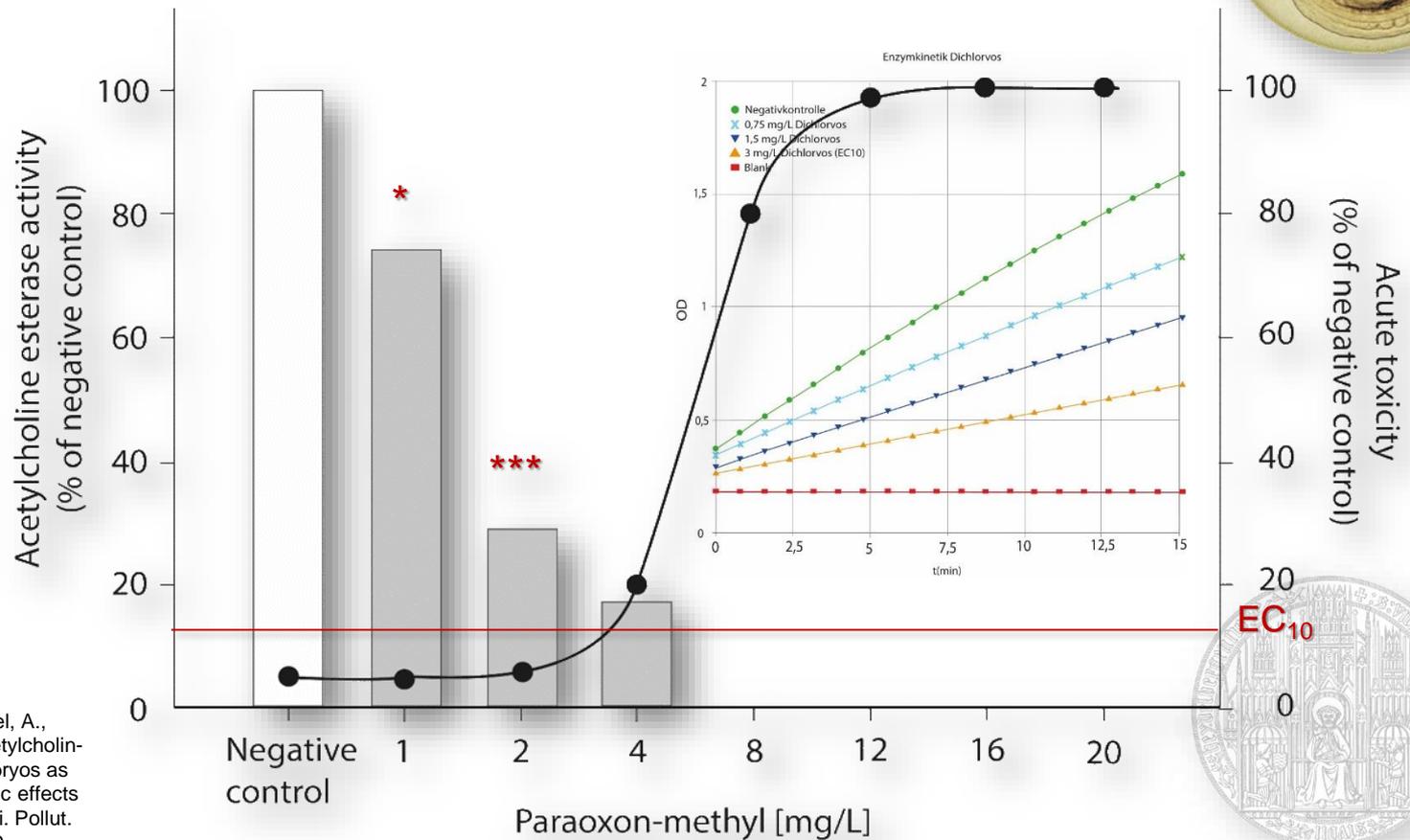
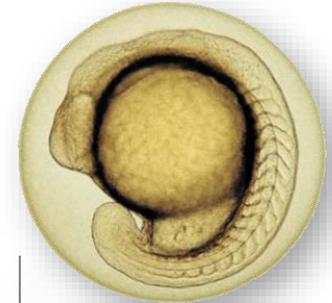


EC und LC-Werte (mg/L) von Amidotrizoesäure, Koffein, Cypermethrin, Dichlorvos, 2,4-Dichlorpheno,l 2,4-Dinitrotoluol, 4-Nonylphenol, Perfluoroktansäure und Perfluoroktansulfonsäure im Fischembryotest mit Embryonen des Zebraärlblings (*Danio rerio*)

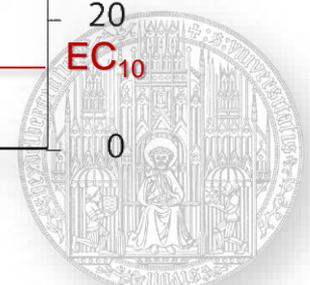
Testsubstanz	EC ₁₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)
Amidotrizoesäure	n.d.	n.d.	n.d.
Koffein	24.23 ± 1.86	45.9 ± 5.16	514.89 ± 0.0
Cypermethrin	n.d.	n.d.	n.d.
Dichlorvos	2.83 ± 0.53	4.65 ± 0.54	8.1 ± 0.49
2,4-Dichlorphenol	1.65 ± 0.48	2.34 ± 0.06	7.1 ± 0.28
2,4-Dinitrotoluol	3.92 ± 0.08	6.9 ± 0.07	n.d.
4-Nonylphenol	0.14 ± 0.06	0.28 ± 0.09	1.51 ± 0.39
Perfluoroktansäure	n.d.	759 ± 116	759 ± 116
Perfluoroktansulfonsäure	6.65 ± 1.19	21.39 ± 1.05	34.2 ± 1.03



“Konventionelle” Neurotoxizität: Hemmung der Acetylcholinesterase

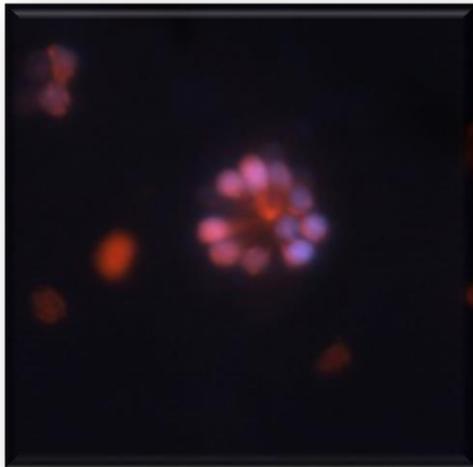
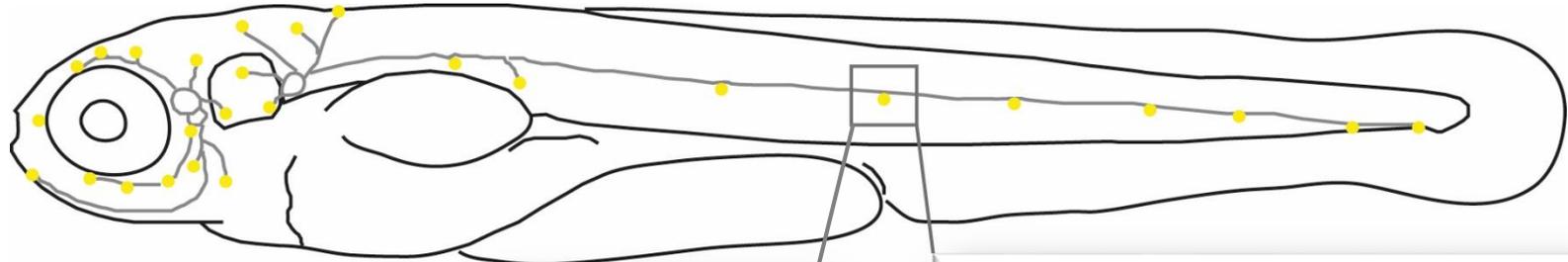


Kais, B., Stengel, D., Batel, A., Braunbeck, T. (2015) Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 22: 16329-16339

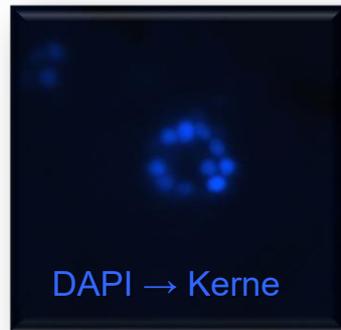




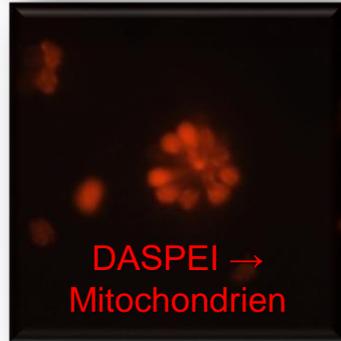
Der Neuromastenassay in Embryonen des Zebrahärlings



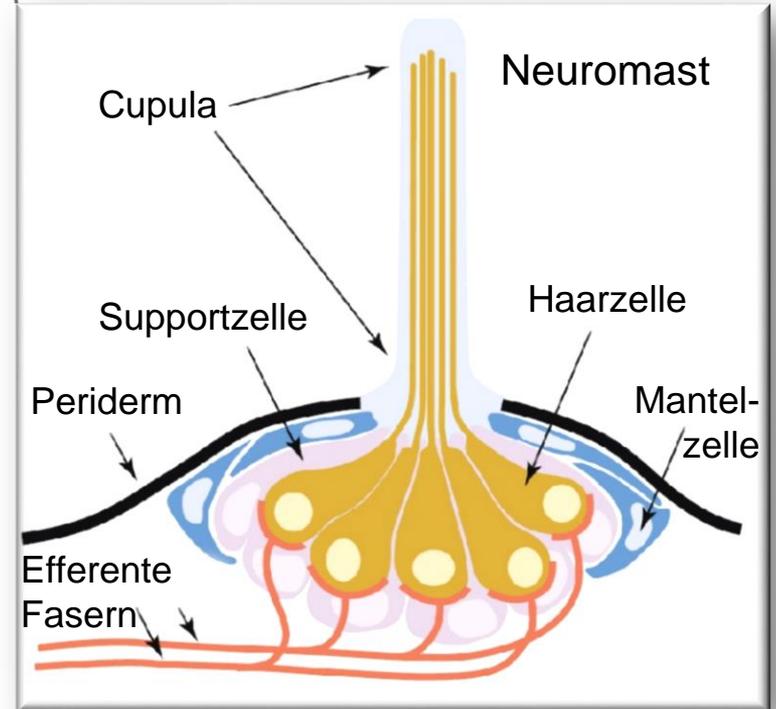
In vivo Fluoreszenz-doppelfärbung



DAPI → Kerne

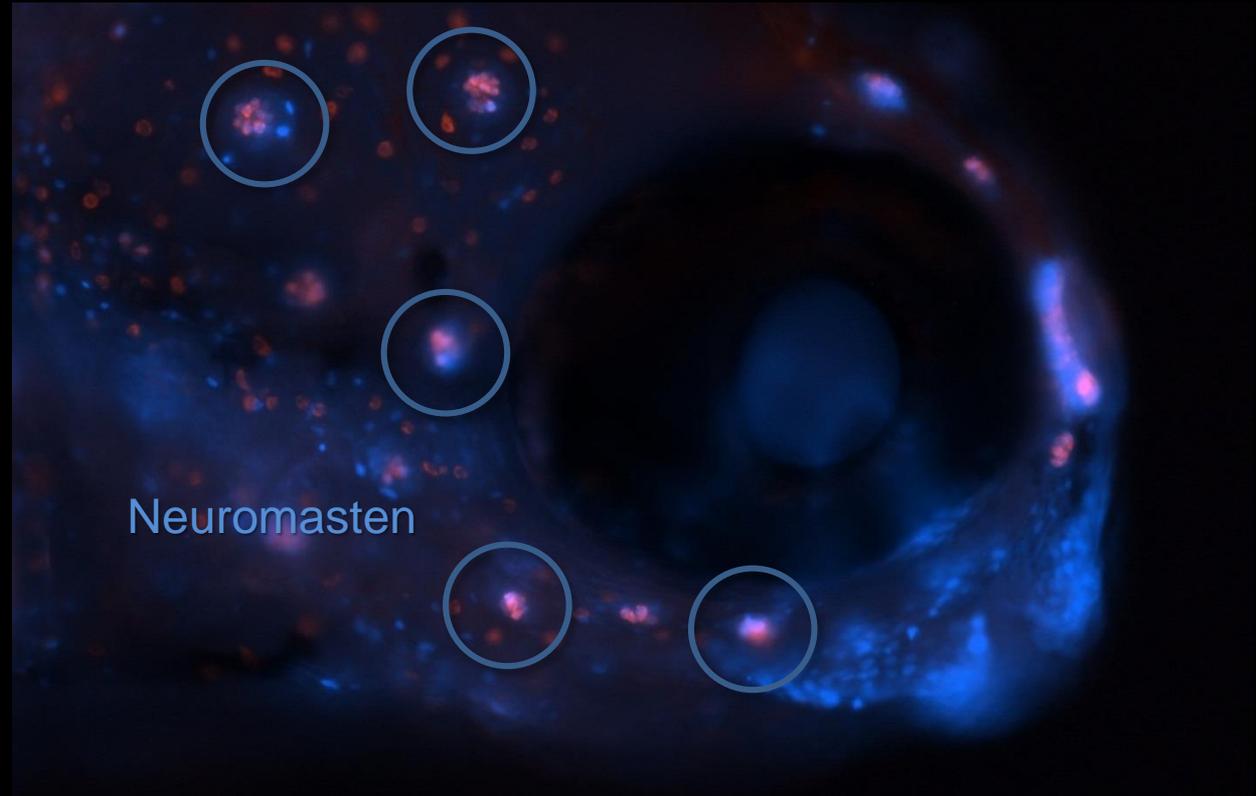
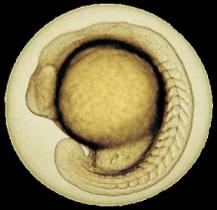


DASPEI → Mitochondrien

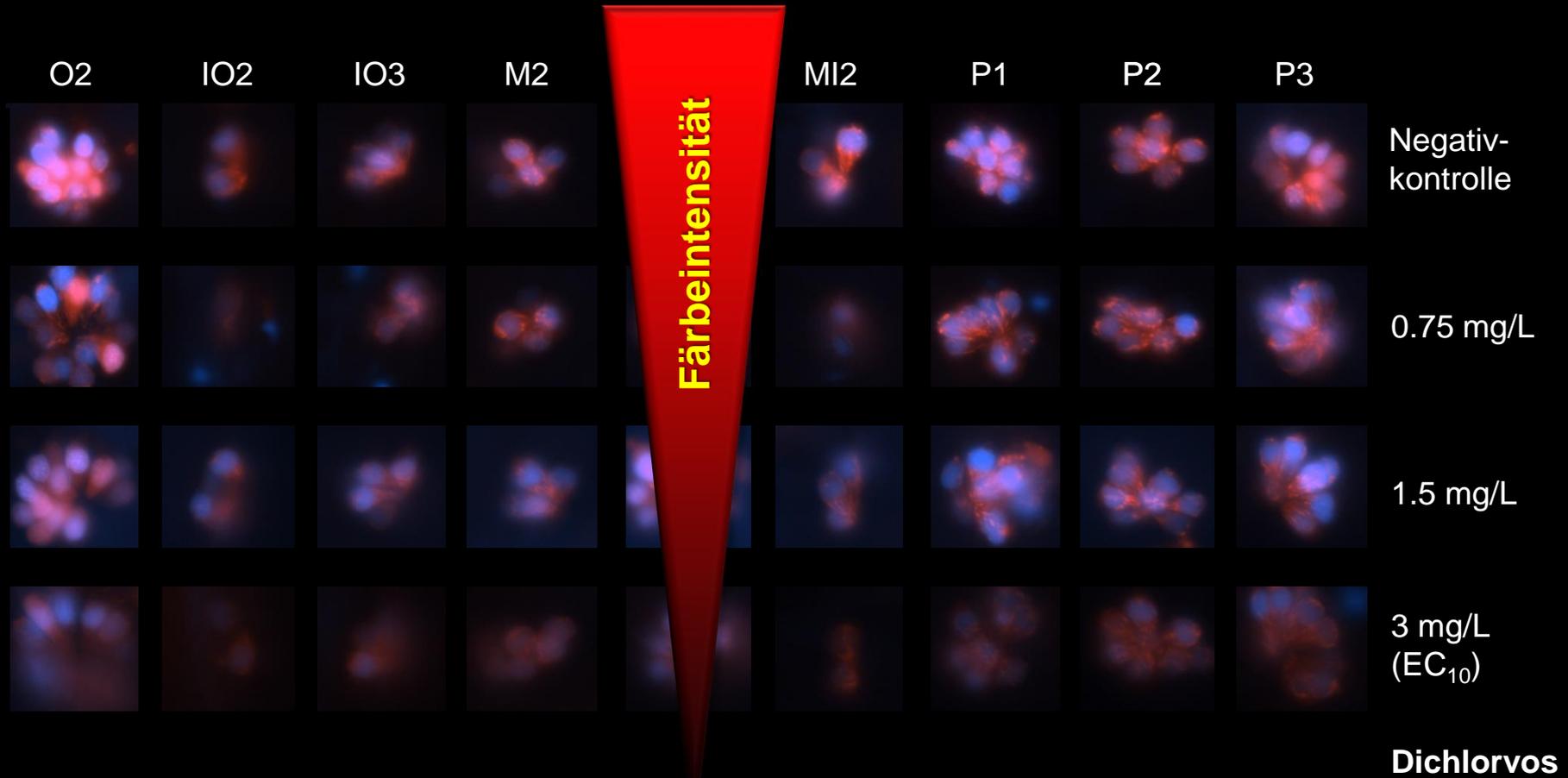


Neurotoxizität in Fischembryonen

Neuromasten
(Seitenlinie)

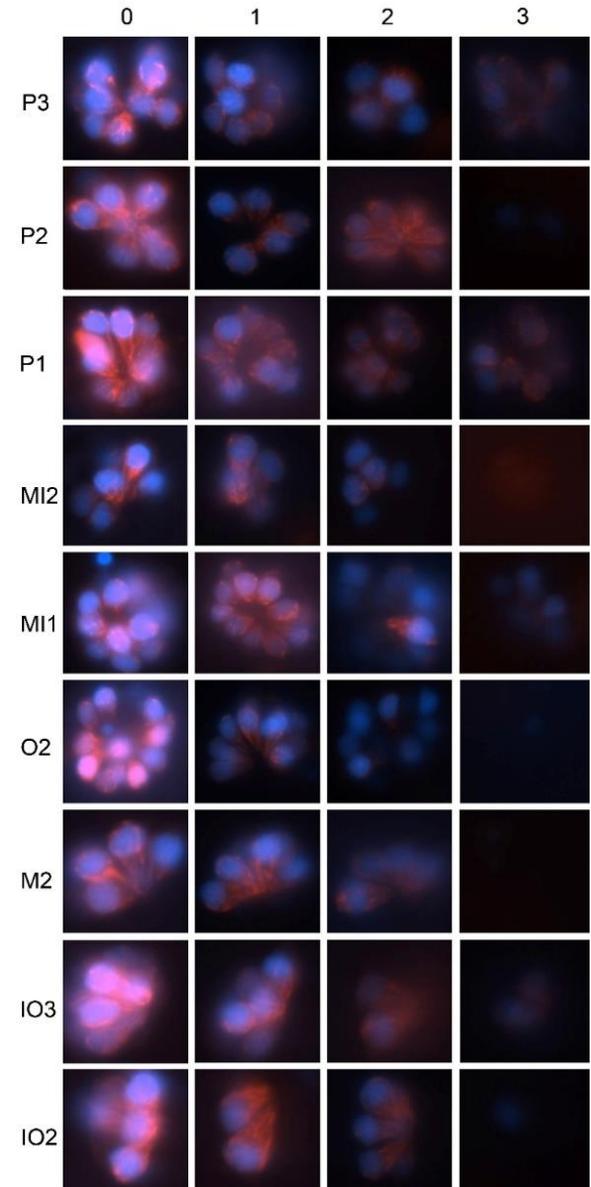
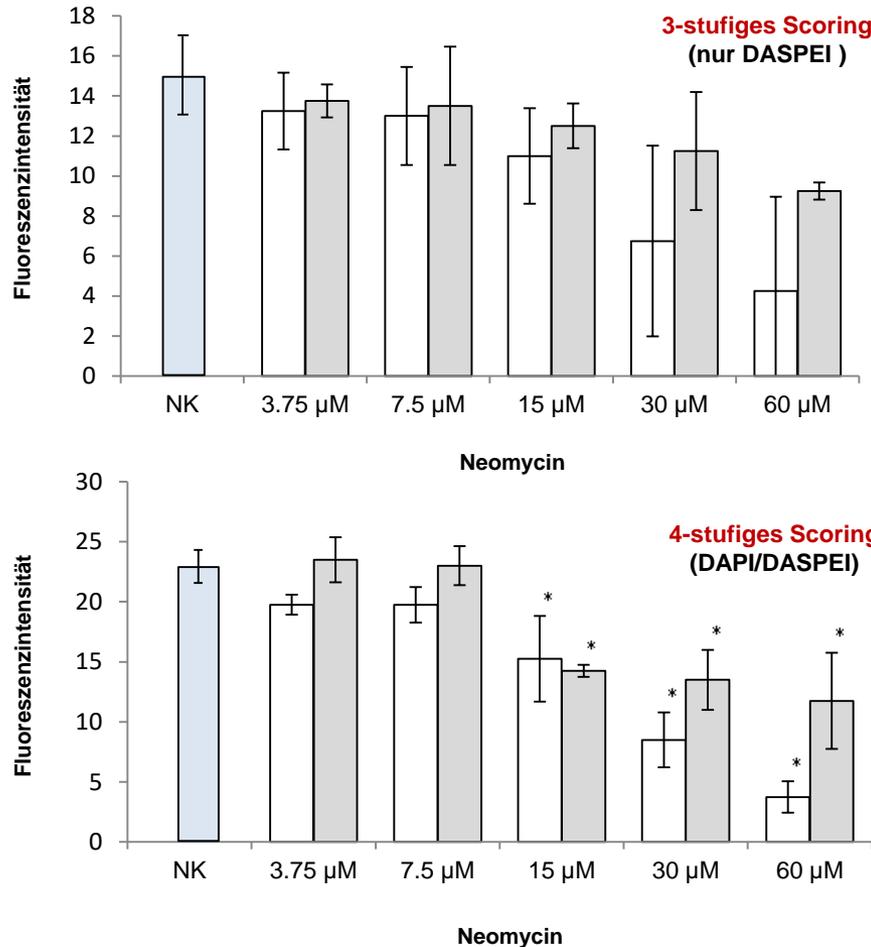


Neurotoxizität im Fischembryonen: Seitenlinie



Stengel, D., Zindler, F., Braunbeck, T. (2016) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 193C: 18-29

Neurotoxizität in Fischembryonen: Seitenlinie



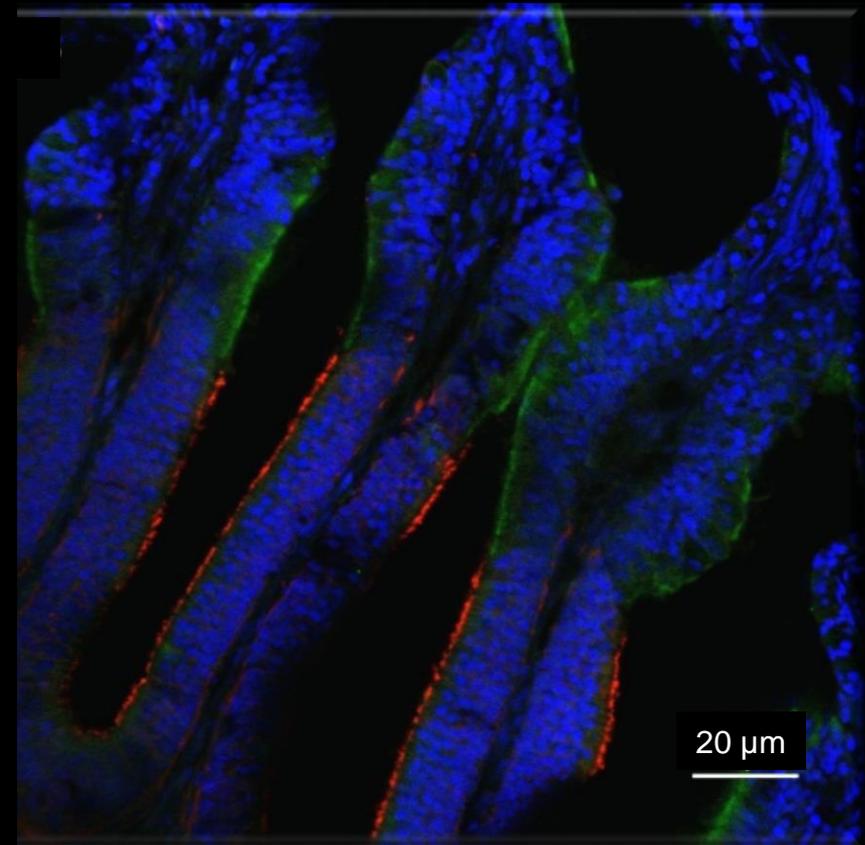
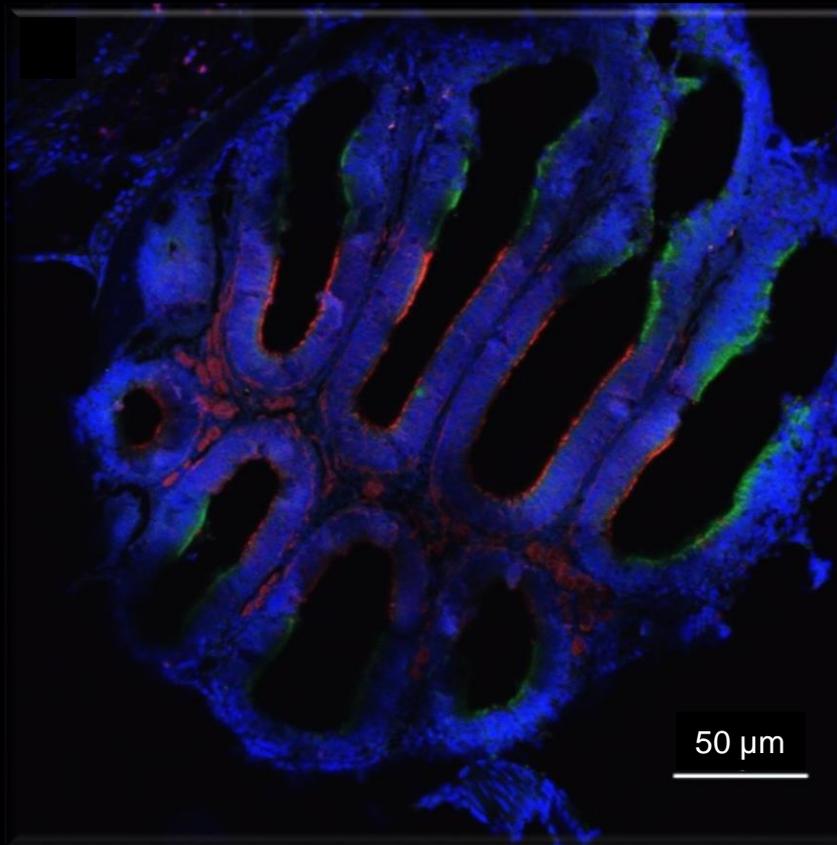
Stengel, D., Zindler, F., Braunbeck, T. (2016) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 193C: 18-29

Neurotoxizität in Fischembryonen: adultes Riechepithel



G_{olf} – G-Protein Untereinheit

ANO2 – Ca^{2+} -abhängiger Chloridkanal

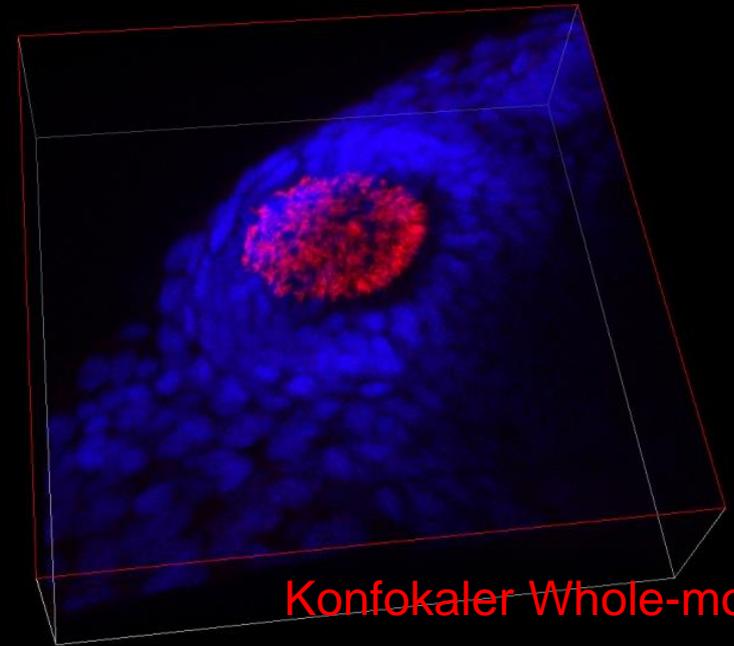


Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel

Kryoschnitte

G_{olf} – G-Protein Untereinheit

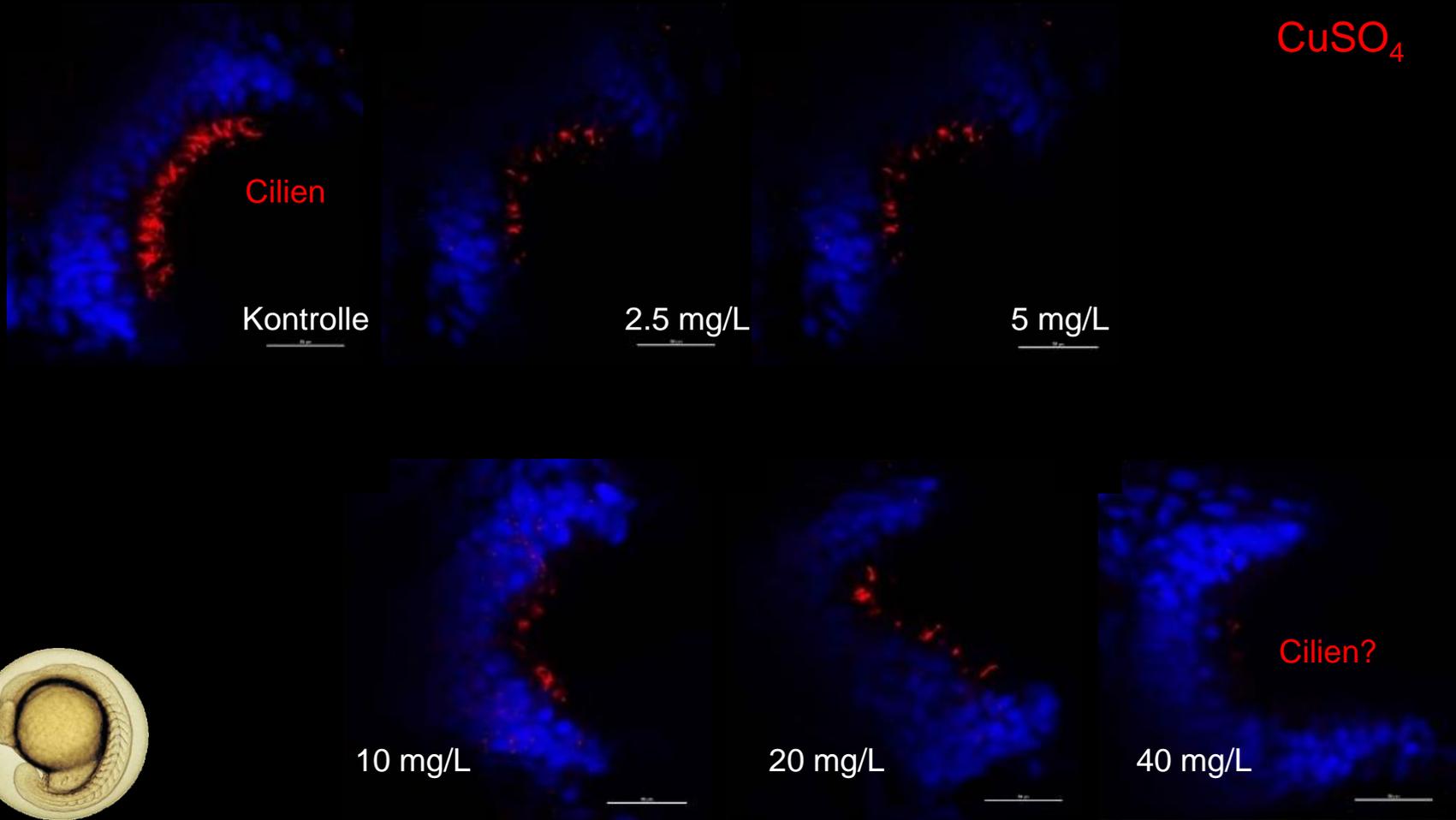
Whole-mount



Konfokaler Whole-mount

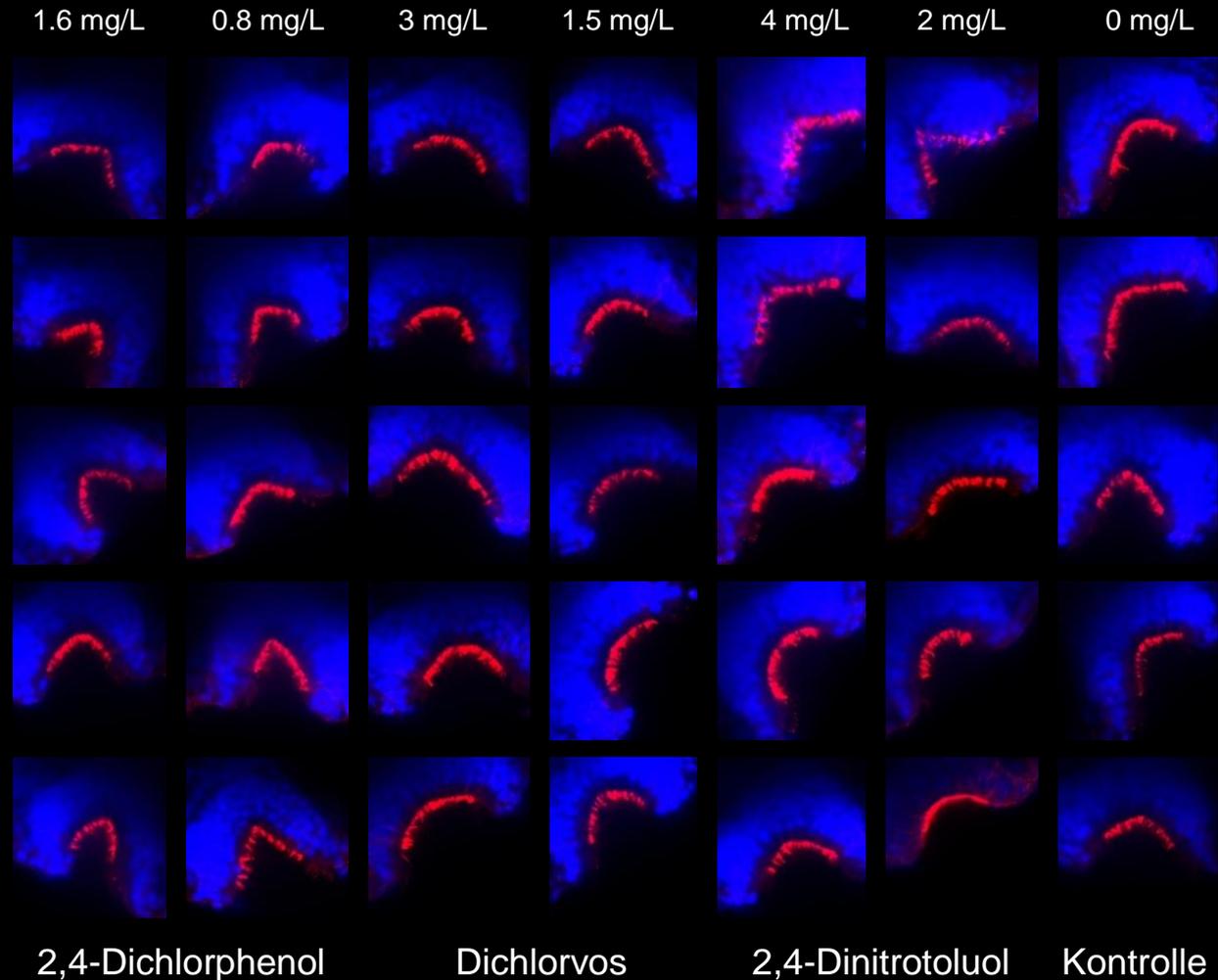


Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel

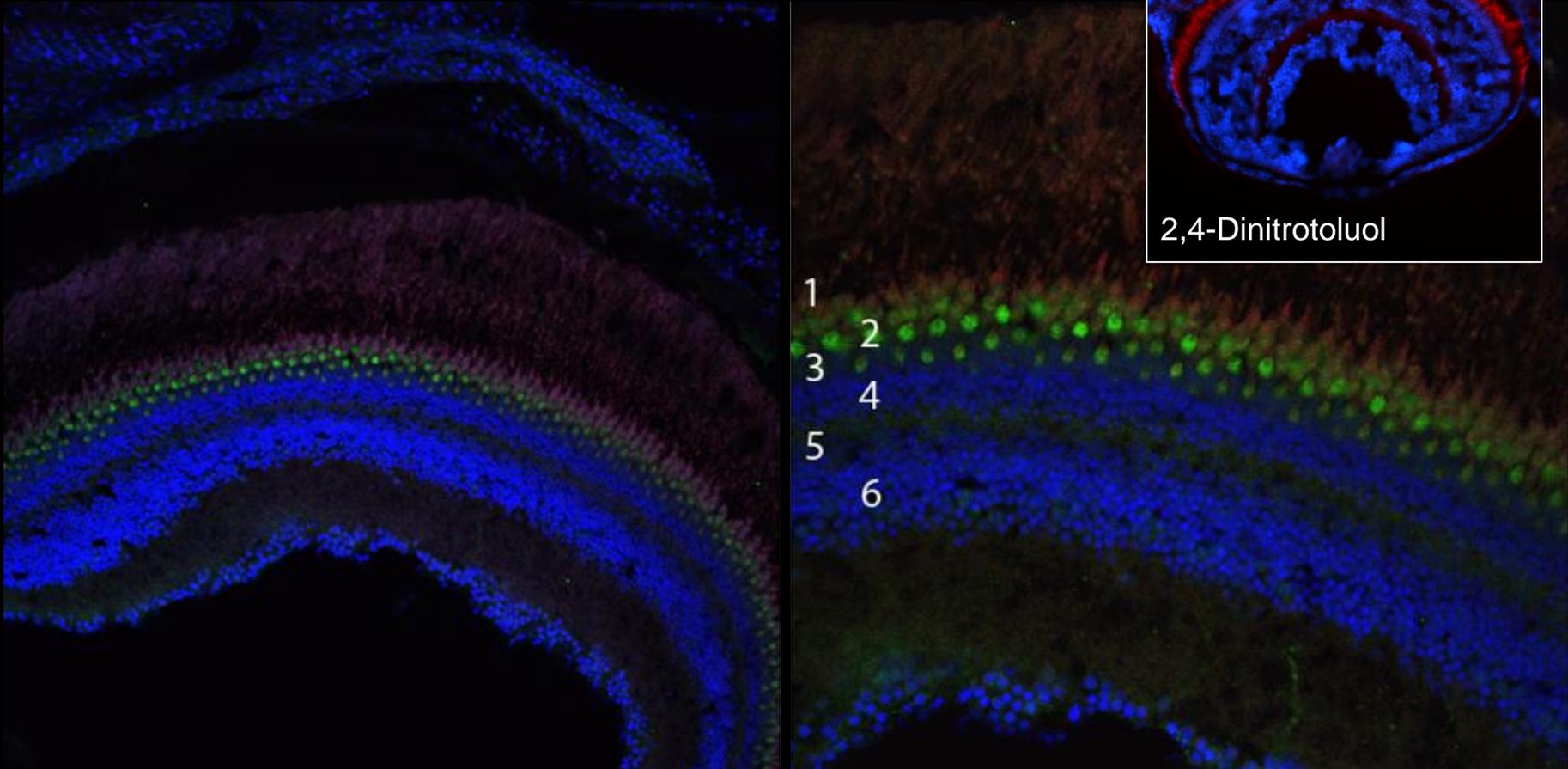


Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel

**Kein Effekt
am EC₁₀**



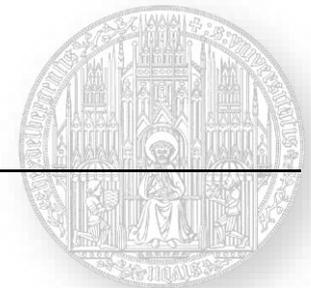
Neurotoxizität in Fischembryonen – Retina



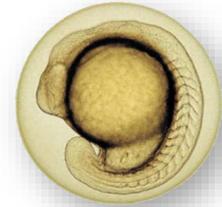
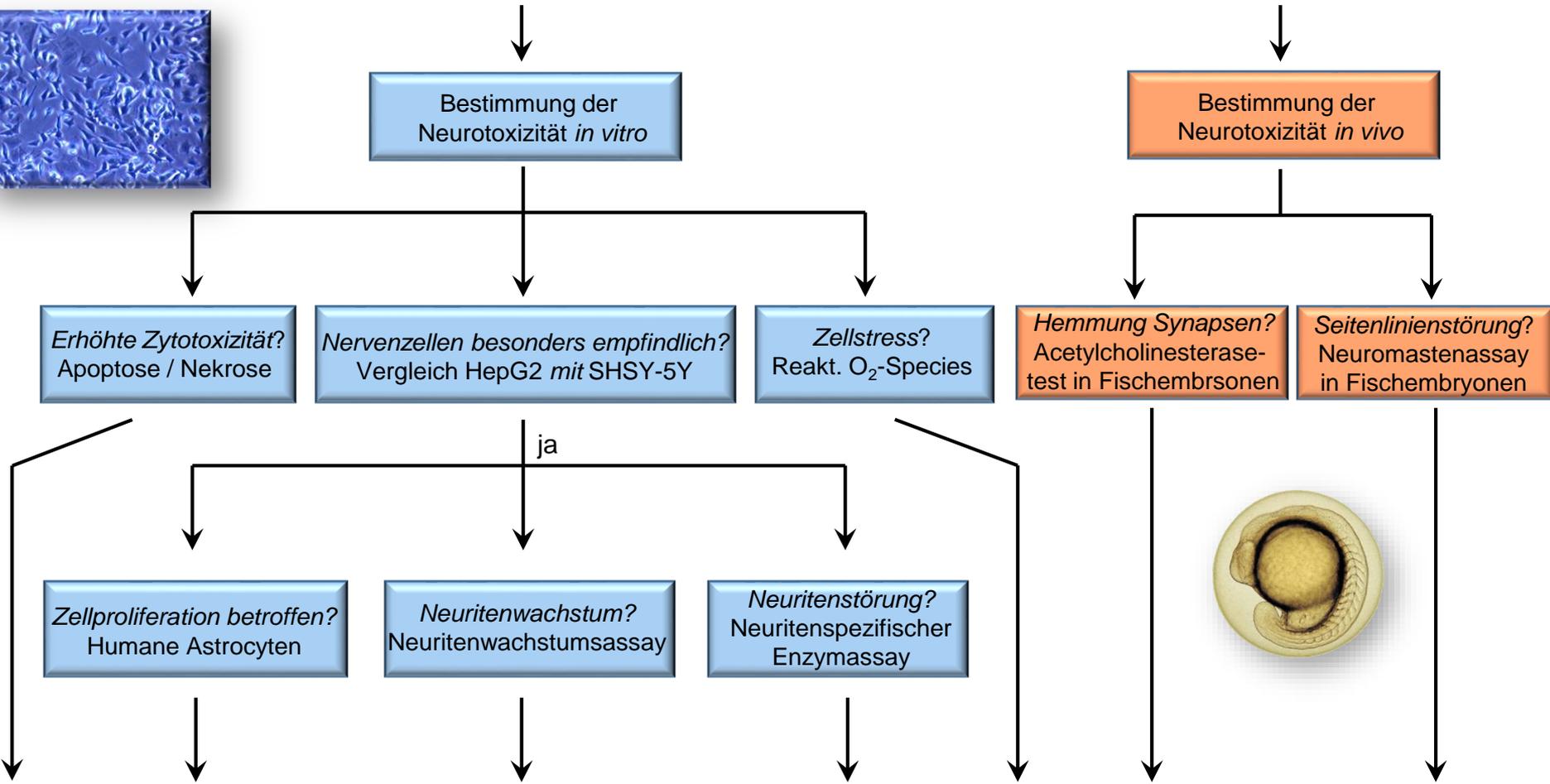
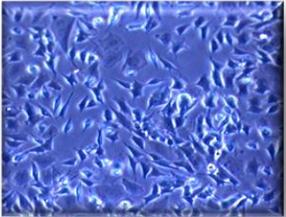
1: Rods and cones, 2: Outer nuclear layer, 3: Outer plexiform layer, 4: Inner nuclear layer, 5: Inner plexiform layer, 6: Ganglion cell layer

Neurotoxizität *in vivo* in Embryonen des Zebrahärlings

	FET (EC ₁₀)	Seitenlinie (LOEC)	AChE	Riechen	Retina
Cypermethrin	Lösungsprobleme	Kein Effekt	Aktivierung		
2,4-Dinitrotoluol	3,98 mg/L	1 mg/L	Kein Effekt		
Perfluoroktansäure	LC: 550 mg/L	No effect	Kein Effekt		
Perfluoroktansulfonsäure	6,6 mg/L	1.66 mg/L	Kein Effekt		
4-Nonylphenol	0,1 mg/L	0.144 mg/L	Kein Effekt		Kein Effekt bis EC ₁₀
2,4-Dichlorphenol	1,6 mg/L	Kein Effekt	Kein Effekt		
Dichlorvos	2,8 mg/L	0.75 mg/L	EC ₁₀ : 76 % ↓		
Koffein	24,2 mg/L	Kein Effekt	Kein Effekt		

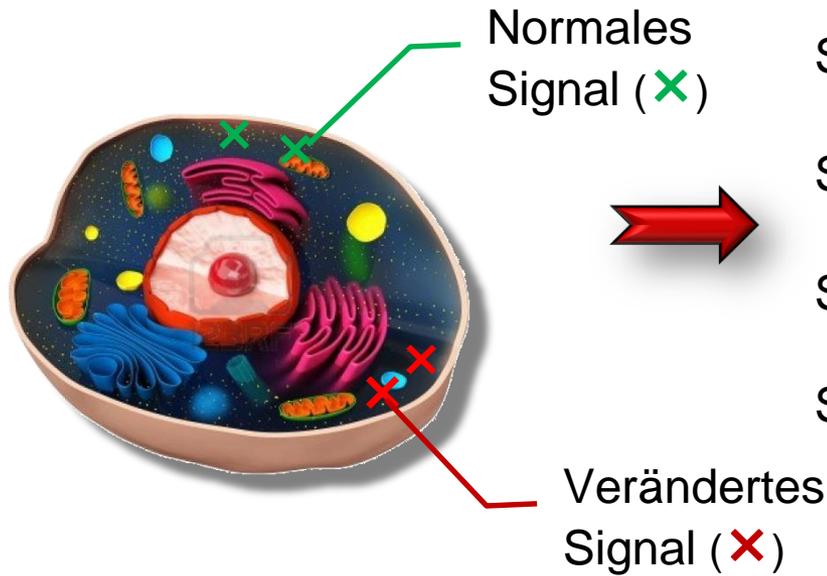


Bestimmung der Neurotoxizität

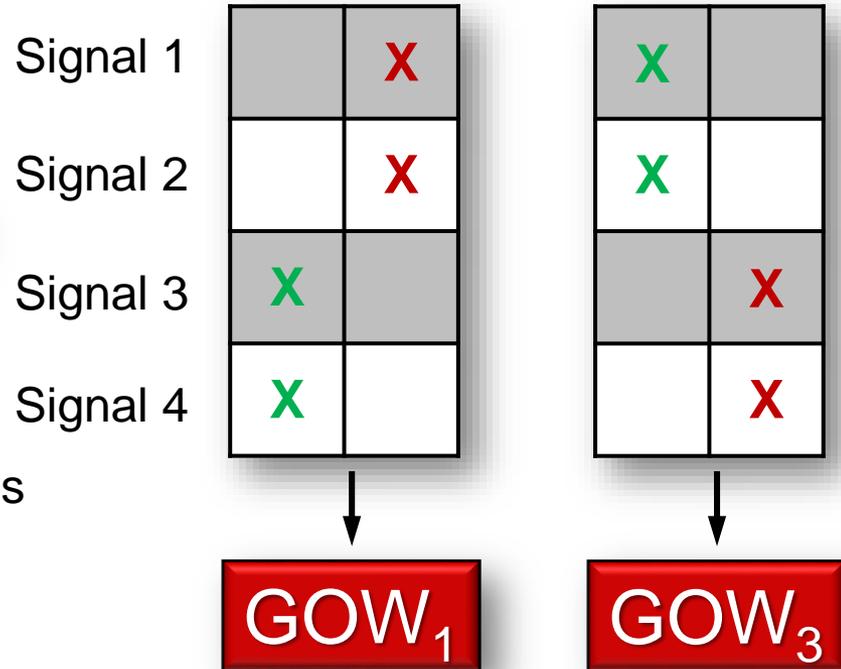


Neurotoxizität: ja/ nein? → Bewertung im GOW-Konzept

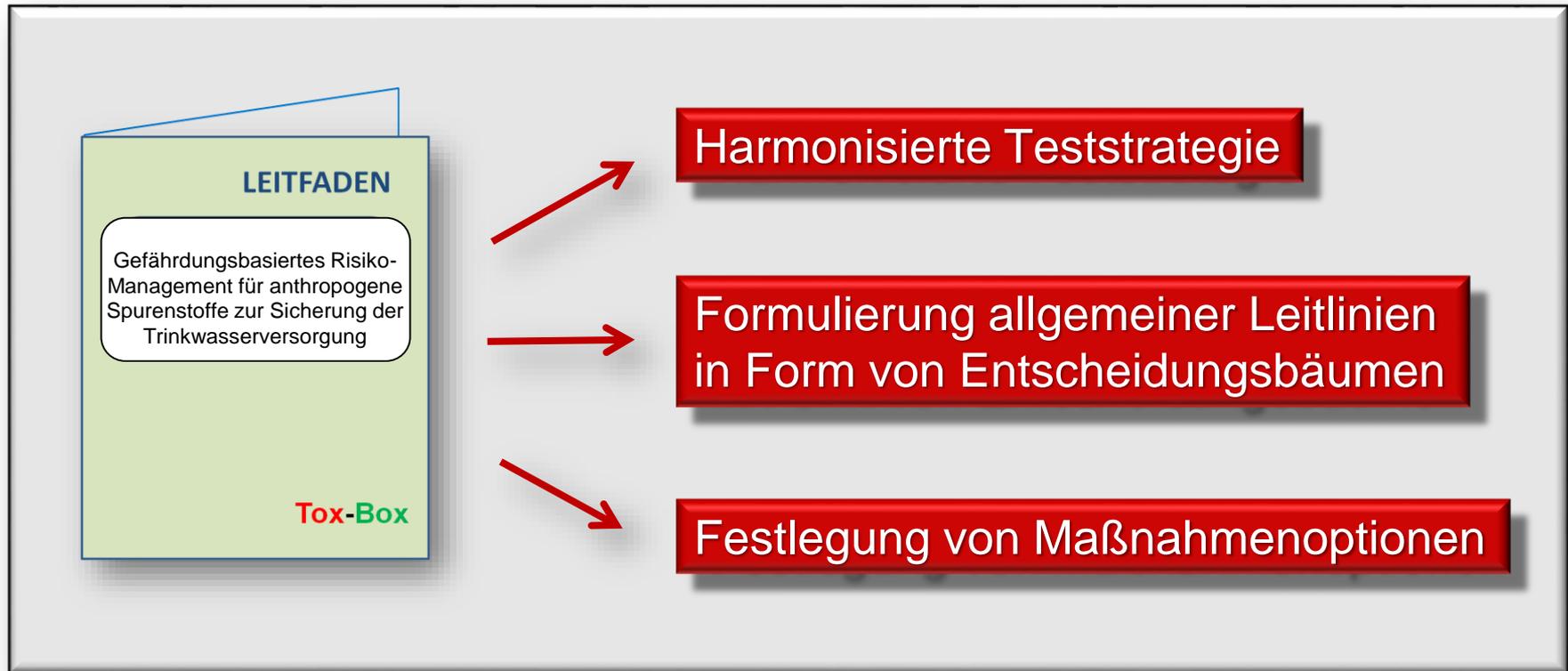
Bewertung im Rahmen des GOW-Konzepts



Wirkungsmechanismus



Weiterentwicklung des GOW-Konzepts



Die Anwendung...?

→ Ereignisbezogen – schnell

- unmittelbare **Gefährdung der menschlichen Gesundheit** abschätzbar
- **Einzelsubstanztestung** notwendig zur Identifizierung des **Wirkmechanismus**



→ Regulatorisch – (vorerst) dauerhaft

- Minimierungsgebot, z.B. **Handlungsempfehlungen** auch ohne rechtsverbindlich gesetzte Standards

Handlungsoptionen

- **Vorgelagerter Regelungsbereich**
 - REACH, Zulassungsverfahren für Arzneimittel (AM) und Pflanzenschutzmittel (PSM)

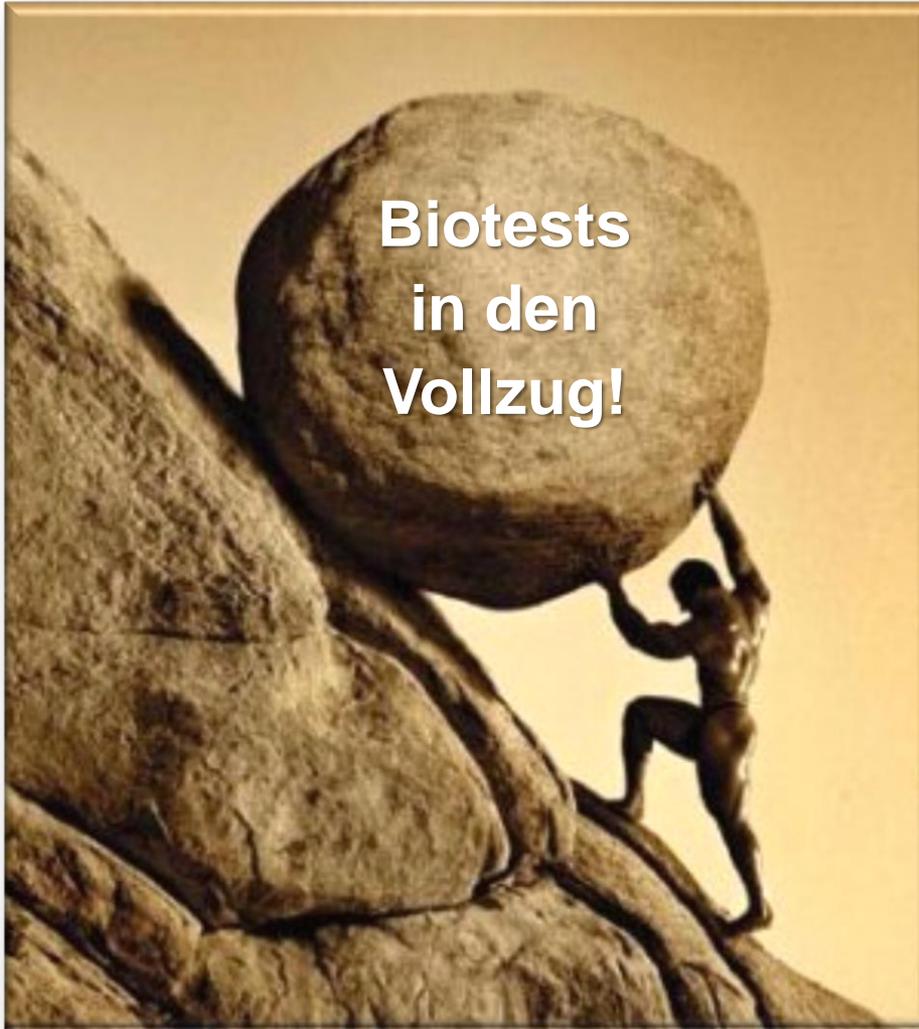
- **Gesamthygienisches Konzept für Trinkwasser**
 - Vorsorgeprinzip, Minimierungsgebot, Ressourcenschutz

- **Risikokompetente Bürger**

**Bioassays sind nicht das Problem,
Bioassays sind die Lösung!**



**Durch ihre Nutzung können wir
toxische Risiken vorhersagen,
verstehen und kommunizieren.**



**Biotests
in den
Vollzug!**

**Danke für Ihre
Aufmerksamkeit!!**