



Biotestbatterie...

...volle Breitseite beim toxikologischen Effektnachweis

Anne Simon (a.simon@iww-online.de), Elke Dopp (e.dopp@iww-online.de)
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gGmbH

Abstract

Die klassische instrumentelle Analytik kann gezielt Einzelstoffe im Wasser detektieren. Eine Aussage über die Wirkung aller im Wasser vorkommenden Stoffe als Ganzes ist damit jedoch nicht möglich. Biotestbatterien, als Instrument der wirkungsbezogenen Analytik, erlauben durch den Einsatz verschiedener Bioassays letztendlich eine differenzierte Beurteilung der Toxizität von Wasserproben. Dabei bildet jeder einzelne Bioassay summarisch biologische Wirkungen ab, so dass ebenfalls Aussagen über bspw. Mischungstoxizitäten möglich werden.

Hintergrund

Mehr als 137 Millionen organische und anorganische Substanzen wurden bis Anfang 2018 beim Chemical Abstracts Service, einer Unterabteilung der American Chemical Society, katalogisiert (<https://www.cas.org/31.01.2018>), von denen mehrere Millionen kommerziell verfügbar sind. Während in einer gewöhnlichen Umweltprobe einige Tausend dieser Substanzen detektierbar sind, umfasst ein typisches Monitoringprogramm routinemäßig zwischen 10 und 100 Einzelsubstanzen (European Commission, 2013). Diese Identifizierung und Quantifizierung von Stoffen in wässrigen Systemen dient in der Regel einer Zustands- oder Prozessbewertung. Da die chemische Analytik jedoch nur einen Bruchteil der potentiell im Wasser vorkommenden Mikroschadstoffe untersuchen kann, müssen Stoffe ebenfalls hinsichtlich ihrer Wirkungen charakterisiert werden. Zudem muss ein Ansatz zur Reduzierung der Komplexität geschaffen werden, der gleichzeitig die Möglichkeiten beschränkt, dass Substanzen, die tatsächlich ein Risiko beherbergen oder Effekte verursachen, übersehen werden (Brack et al. 2016). Die wirkungsbezogene Analytik (WBA) stellt einen solchen Ansatz dar, der die bisherige Herangehensweise umkehrt. Anstatt eine möglichst umfassende chemische Analytik von Wasserproben durchzuführen, werden bioanalytische Methoden in Form von zellbasierten Bioassays und/oder organismischen Tests, eine sogenannte Biotestbatterie, zur Wirkungscharakterisierung vorangestellt. Dies kann an nativen Wasserproben und zusätzlich an angereicherten Proben geschehen. Dabei sind Prozesskontrollen bei der Anreicherung unbedingt erforderlich, um falsch positive Aussagen in den Bioassays zu vermeiden. Jeder einzelne Bioassay bildet summarisch biologische Wirkungen ab, wie zum Beispiel Zytotoxizität, Gentoxizität, oder endokrine Wirkungen über rezeptorgebundene Mechanismen. Werden signifikante Effekte in den Bioassays festgestellt, so erfolgt eine sequentielle Reduzierung der Komplexität der Probe durch Fraktionierung, erneute Durchführung der Biotests und Eliminierung der Fraktionen mit

geringer oder keiner biologischen Aktivität (Brack et al. 2016). Im Optimalfall gelingt es, die toxische Fraktion zu isolieren und den für die gemessene Wirkung verantwortlichen Schadstoff mittels instrumenteller Analytik zu identifizieren (Abbildung 1).

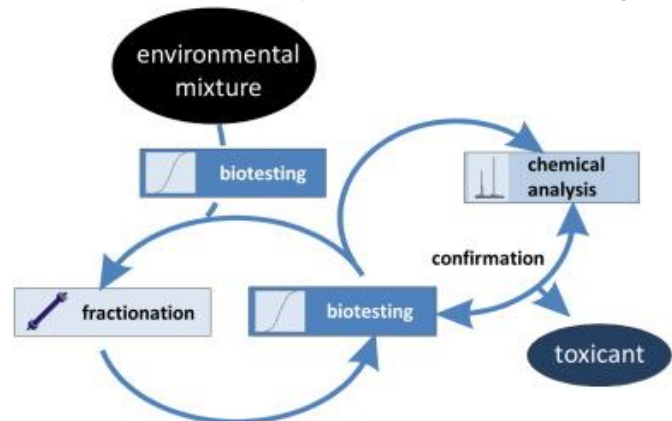


Abb. 1 Allgemeines Schema der wirkungsbezogenen Analytik (WBA) nach Brack et al. 2016.

Aus biologischer Sicht stellt die Zusammenstellung der Biotests eine große Herausforderung dar. Der Schlüssel jeder wirkungsbezogenen Studie ist die gezielte Formulierung des Problems und erfolgt aus der Integration allen relevanten Wissens aller Beteiligten (z.B. Wissenschaft, Behörden, Industrie). Die Biotestbatterie ist somit konzipiert als ein Instrument zur WBA, das am Ende eine differenzierte Beurteilung der Toxizität von Wasserproben erlaubt. Zur umfassenden Zustandsbewertung von Gewässern sollte in jedem Fall eine Kombination verschiedener Wirkungstests herangezogen werden, die dem Konzept des Adverse Outcome Pathway (AOP) folgen (Ankley et al. 2010). Der Grundgedanke des AOP-Konzepts liegt darin begründet, dass eine Kaskade zellulärer Ereignisse sequentiell negative Auswirkungen auf der Ebene der Individuen, auf ganze Populationen und schließlich auf das Ökosystem auslösen kann (Abbildung 2).

Der zelluläre Toxizitätspfad (in vitro) beginnt mit Ereignissen auf molekularer Ebene durch Interaktion einer Chemikalie mit einem biologischen Ziel, gefolgt von zellulären Reaktionen, bis hin zu Abwehr-/Reparaturmechanismen. Erst wenn die Abwehr versagt, stirbt die Zelle, was letztendlich über die Zytotoxizität bestimmt werden kann.

Bei der in vivo Testung (Organismen tests) sollten mehrere Trophieebenen untersucht werden, angefangen von Primärproduzenten wie der Grünalge und der Wasserlinse über Invertebraten bis hin zu Fischen bzw. Fischembryonen.

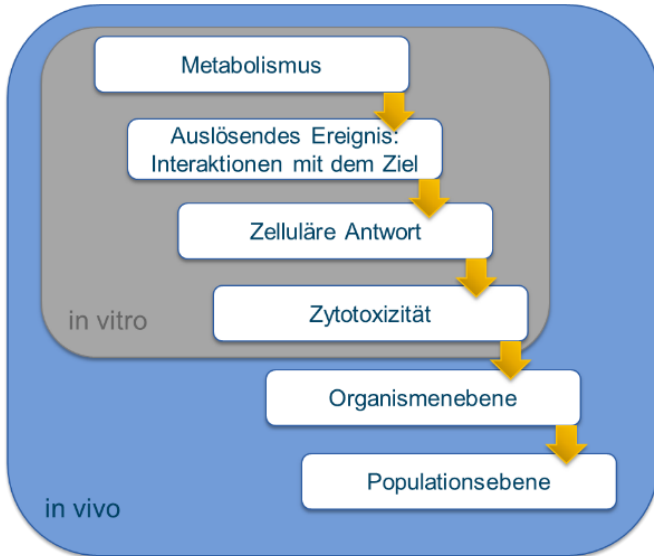


Abb. 2 Schlüsselereignisse des Adverse Outcome Pathway (AOP) Konzept, modifiziert nach Brack et al. 2016.

In jedem Fall sollten mehrere Tests auf unspezifische Toxizität und spezifische Wirkungen für die umfassende Zustandsbewertung von Wasserproben für die Biotestbatterie herangezogen werden. Optimaler Weise liefert die Biotestbatterie so differenzierte Toxizitätsprofile des Wassers in weitergehender Übereinstimmung mit den Ergebnissen der chemischen Wasseranalytik.

Beispiele aus der Praxis

In einem ersten, 2014 abgeschlossenen, Forschungsvorhaben zur Untersuchung der toxikologischen Relevanz von Transformationsprodukten aus der Ozonung von Kläranlagenabläufen in Nordrhein-Westfalen wurde bereits eine sehr umfangreiche Biotestbatterie angewandt (Az.: IV-7-042 600 001J). Insgesamt kamen 14 verschiedene biologische Testverfahren mit unterschiedlichen Endpunkten wie zum Beispiel der Zytotoxizität, Östrogenität, Gentoxizität, Phytotoxizität, sowie akute und chronische Toxizität von Invertebraten zum Einsatz (Abbildung 3).

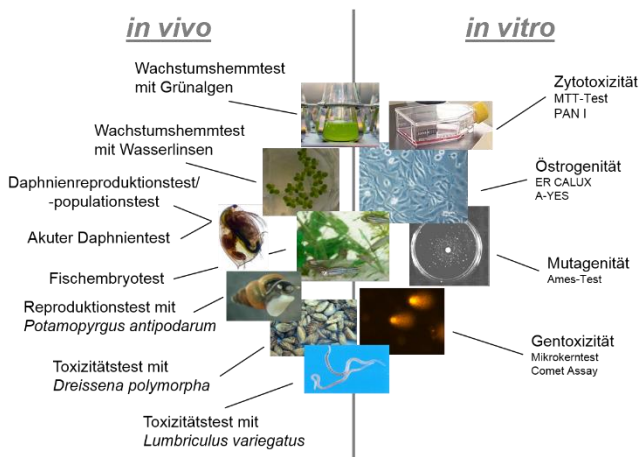


Abb. 3 Umfangreiche Biotestbatterie bestehend aus 14 verschiedenen biologischen Testverfahren

Die ausgewählte Biotestbatterie erwies sich generell als geeignetes Instrument für die Zustandsbewertung des Abwassers vor und nach Ozonung sowie nach einer nachgeschalteten biologischen Behandlungsstufe. Als einziger Untersuchungsparameter für den Gentoxizitätsnachweis erwies sich der Comet-Assay als nicht geeignet. Dies lag an der zum Teil unklaren Interpretation der Ergebnisse. Aus diesem Grund sollte zukünftig stattdessen oder zumindest ergänzend der Mikrokern-Test durchgeführt werden. Ebenso wurde deutlich, dass gegenläufige Trends für unterschiedliche Endpunkte auftreten können. Dies führte dazu, dass die im Projekt eingesetzte Biotestbatterie für den Vergleich der biologischen Wirkungen vor und nach Ozonung zu keinem eindeutigen Ergebnis führte. Hinzu kommt noch die Problematik in der Vergleichbarkeit von nativen Wasserproben und angereicherten Proben. So konnten in vereinzelt Fällen signifikante Unterschiede für die nativen Proben festgestellt werden; diese ließen sich jedoch nicht für jede angereicherte Probe reproduzieren. Die Ergebnisse zeigen neben der methodischen Weiterentwicklung, u.a. Anpassung an die Abwassermatrix, einzelner biologischer Testsysteme vor allem den Bedarf einer ganzheitlichen Interpretation aller Endpunkte der WBA auf. Dies gilt ebenfalls für die Kompatibilität von Anreicherungsverfahren mit in vitro und in vivo Testsystemen. Hierzu erfolgte im Herbst 2017 der Aufruf von Seiten des Umweltbundesamts zu einem Forschungsprojekt (FKZ 3717 26 326 0) das vielversprechende Ergebnisse zum einen speziell zur Anreicherung von Östrogenen und zum anderen zu einem gemeinsamen Anreicherungsverfahren für die chemische und biologische Analytik erwarten lässt. Zudem wurde in den letzten Jahren intensiv an der Validierung und Standardisierung von drei östrogenen rezeptorgebundenen Bioassays (ER CALUX, A-YES, YES) gearbeitet. Als Ergebnis erfolgt im Laufe des Jahres 2018 die Verabschiedung und Veröffentlichung dieser drei ISO-Normen (ISO/FDIS 19040-1, ISO/FDIS 19040-2, ISO/FDIS 19040-3).

In einem weiteren, 2017 abgeschlossenen, Forschungsvorhaben erfolgte die Erprobung einer Biotestbatterie zum Monitoring der Spurenstoffadsorption bei der weitergehenden Abwasserreinigung mit granulierter Aktivkohle (Az.: 17-04.02.01-04b/201). Der Fokus lag ausschließlich auf der Effektivität und Filtratqualität granulierter Aktivkohle (GAK) Festbettadsorber von drei unterschiedlichen Kläranlagen. Für die biologische Analytik wurden native Wasserproben eingesetzt, es erfolgte keine Anreicherung. Durch den Einsatz der Biotestbatterie ergab sich somit neben der rein chemischen Analytik organischer Einzelstoffe die Möglichkeit einer ganzheitlichen Betrachtung der Wasserqualität (Abbildung 4).

Die umfangreichen Untersuchungen an den drei Kläranlagen zeigten, dass der nach einer Adsorptionsstufe noch verbleibende Spurenstoffeintrag in die Vorfluter überwiegend unterhalb der toxikologischen Wirkschwellen lag. Die Überschreitungen der Wirkschwellen für Primärproduzenten (Algen, Wasserlinsen) und Süßwasserkrebse (Daphnien) erwiesen sich als Einzelbefunde und führten nicht zu einer verschlech-

terten Einstufung der Wasserqualität an den jeweiligen Kläranlagenabläufen. Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass Primärproduzenten empfindlich auf die Abwasserinhaltsstoffe im Zu- und Ablauf der GAK-Filter reagieren. Da sich bereits in den durchgeführten Algen- und Wasserlinsentests deutliche Unterschiede zwischen den Organismen gezeigt haben, ist zu empfehlen, weitere Pflanzentests zu betrachten. Makrophyten wie *Myriophyllum sp.* (Tausendblatt) oder *Glyceria maxima* (Wasserschwade), welche für die Pflanzenschutzmitteltestung im Gespräch sind, könnten eventuell noch sensibler reagieren und als Monitoringinstrument geeignet sein.

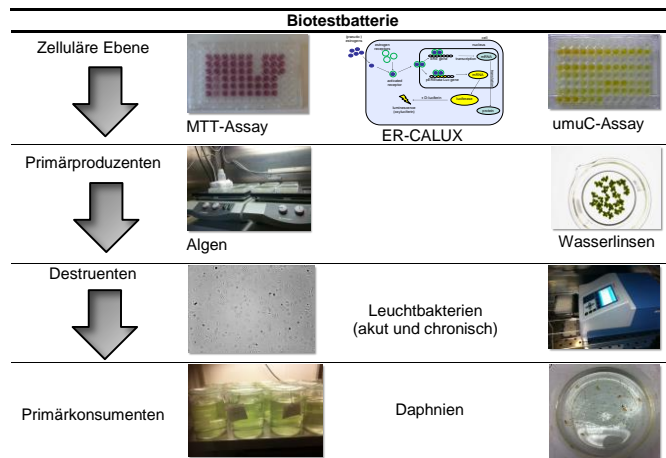


Abb. 4 Fließschema der verwendeten Biotests von der zellulären Ebene bis hin zu Primärkonsumenten.

Erste Schritte zu einer ergänzenden Analytik des chemischen und biologischen Spektrums sind bereits mit der WBA gemacht. Auch wenn die regulatorische Toxikologie noch einen weiten Weg vor sich hat, so erfolgen mit jedem Projekt neue Erkenntnisgewinne, die von Jahr zu Jahr das Untersuchungsspektrum der Gewässer verbessern lassen.

Literatur

- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., Villeneuve, D. L., **2010**. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(3): 730-741.
- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B. I., Hewitt, L. M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E. L., Schulze, T., Seiler, T.-B., Tindall, A. J., De Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Krauss, M., **2016**. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments—an in-depth overview. *Science of the Total Environment* 544: 1073-1118.
- European Commission, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12. August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union* 2013 (L 226/1).
- ISO/FDIS 19040-1, Water quality -- Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*)
- ISO/FDIS 19040-2, Water quality -- Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, *Arxula adenivorans*)
- ISO/FDIS 19040-3, Water quality -- Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay

Korrespondenzadresse

Dr. Anne Simon
 IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung
 gGmbH
 Geschäftsfeld Toxikologie
 Moritzstraße 26
 45476 Mülheim an der Ruhr
 Telefon: +49 208 40303 363
 E-Mail: a.simon@iww-online.de