

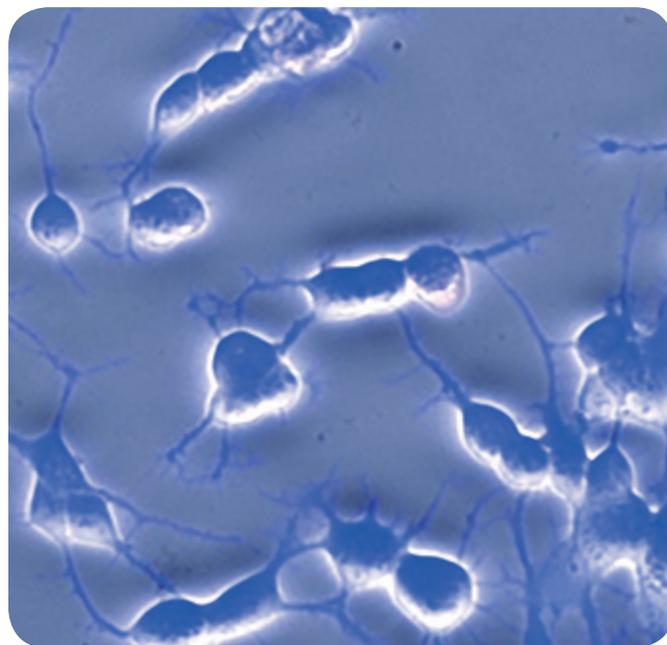


## RiSKWa-Statuspapier

Methoden zur (öko-)toxikologischen  
Bewertung von Spurenstoffen  
im Wasserkreislauf

Ergebnisse des Querschnittsthemas  
„(Öko-)Toxikologie“

Tamara Grummt, Rita Triebskorn, Jörg Oehlmann,  
Thomas Braunbeck, Oliver Happel



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Fazit

RiSKWa hat gezeigt, dass wirkungsbasierte (öko)toxikologische Tests essentielle Elemente im Risikomanagement von Spurenstoffen im Wasserkreislauf sind. Das vorliegende Statuspapier dokumentiert in diesem Zusammenhang ausführlich die am besten etablierten toxikologischen und ökotoxikologischen Verfahren zur Risikobewertung im Bereich Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser im Kontext von gesetzlichen Bezügen. Die vorgestellten Verfahren erlauben die wirkungsbasierte Erfassung sowohl allgemeiner als auch spezifisch wirkender stofflicher Belastung in den genannten Medien. Sie stellen damit auch eine wichtige Grundlage für eine wirkungsbasierte Bewertung der Effizienz von Abwasserreinigungsanlagen dar. Die Tests können unter anderem für die Bewertung der Wirksamkeit weitgehender Abwasserreinigungstechniken sowie von technischen Verfahren für Misch- und Regenwasserbehandlung eingesetzt werden. In RiSKWa konnte mit Hilfe wirkungsbasierter ökotoxikologischer Tests belegt werden, dass die vierte Reinigungsstufe auf Kläranlagen zusätzlich zu der analytisch erwiesenen Reduktion von stofflichen Belastungen zu einer deutlichen Verbesserung des ökologischen Gewässerzustandes im Vorfluter führt.

Neben einer ausführlichen Betrachtung von Grundlagen zur Vor- und Aufbereitung von Umweltproben für wirkungsbasierte Tests werden Biotests und Biomarker im Sinne einer Tool-Box für verschiedene Anwendungsfelder vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile beschrieben. In einer abschließenden detaillierten Tabelle sind schließlich die in RiSKWa eingesetzten wirkungsbasierten Methoden zusammengefasst. Damit liefert das Statuspapier wichtige Grundlagen und eine Entscheidungshilfe für die Auswahl wirkungsbasierter Tests in der wasserwirtschaftlichen Praxis.

<b>1</b>	<b>Vorwort</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Probenvorbereitung und Anreicherungsverfahren</b>	<b>3</b>
2.1	Probenvorbereitung	3
2.2	Anreicherungsverfahren	6
2.3	Zusammenfassung wichtiger Randbedingungen	10
<b>3</b>	<b>Toxikologische Testverfahren für die Trinkwasserbewertung</b>	<b>11</b>
3.1	Der gesundheitliche Orientierungswert (GOW) als Ausgangspunkt	11
3.2	Endpunkte der Bewertung	11
3.3	Ausblick zur Bewertung von Trinkwasser	13
3.4	Ausblick zur Bewertung technischer Anlagen zur Trinkwasseraufbereitung	14
<b>4</b>	<b>Ökotoxikologische Testverfahren</b>	<b>16</b>
4.1	Laborbasierte <i>In-vitro</i> - und <i>In-vivo</i> -Testsysteme	16
4.2	Biomarker	21
<b>5</b>	<b>Methodenübersicht in RiSKWa</b>	<b>24</b>
5.1	Eingesetzte Methoden – Toxikologie	24
5.2	Eingesetzte Methoden – Ökotoxikologie	27
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>Tabellarische Methodenübersicht unter anwendungsbezogenen Aspekten</b>	<b>26</b>
	<b>Impressum</b>	<b>37</b>

# 1 Vorwort

Wirkungsbezogene Daten sind essentielle Voraussetzungen für eine Bewertung des Risikos, das von Spurenstoffen im Wasserkreislauf ausgehen kann. Mit Hilfe (öko-)toxikologischer Wirktests erfolgt eine stoffbezogene Bewertung relevanter Chemikalien hinsichtlich ihrer Toxizität für Mensch und Umwelt. Ökotoxikologische Wirkstudien dienen darüber hinaus auch dazu, retrospektiv eine Bewertung von mehrfach durch Spurenstoffe belasteten Umweltmatrices, wie Abwasser, Oberflächenwasser oder Sediment, hinsichtlich ihrer Qualität zu beurteilen. Sowohl toxikologische als auch ökotoxikologische Wirktests liefern dadurch die notwendige wissenschaftliche Grundlage für ein erfolgreiches Risikomanagement.

Für die Risikocharakterisierung im Bereich der Trinkwasserbewertung kommen vorwiegend *In-vitro*-Biotestsysteme zum Einsatz. Darüber hinaus werden ökotoxikologische Wirkungen mit Hilfe laborbasierter und meist standardisierter *In-vivo*-Biotests als auch durch Biomarker nachgewiesen, welche den Gesundheitszustand der Organismen beschreiben. *In-vitro*-Tests werden in der ökotoxikologischen Wirkungscharakterisierung zusätzlich für den Nachweis spezifischer Wirkungsmechanismen (*mode of action* – MoA) von Einzelsubstanzen, in Substanzmischungen oder komplexen Umweltproben eingesetzt. In beiden Fällen steht ein sehr breites Methodenspektrum zur Verfügung, wobei zunehmend zellbiologische und molekularbiologische Ansätze zum Einsatz kommen. Die Vielfalt der Methoden und die Interpretation der Ergebnisse in verschiedenen Kontexten führen mitunter auch zu unterschiedlichen Bewertungen, was für die risikoregulierenden Behörden und die Öffentlichkeit oft nicht nachvollziehbar ist. Vor diesem Hintergrund und mit Blick auf Kosten-Nutzen-Aspekte sowie die künftige Akzeptanz wirkungsbasierter Analysen für Maßnahmen zur Minimierung anthropogener Spurenstoffe haben die Transparenz der Ergebniserhebung und deren Bewertung eine zentrale Rolle im Gesamtprozess des Risikomanagements.

Im Querschnittsthema (*Öko*-)Toxikologie wurde aus diesem Grund eine Gesamtübersicht des Methodenspektrums erstellt, das im Rahmen der BMBF-Fördermaßnahme *Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)* zum Einsatz kam. Der Arbeitsgruppe war es ein Anliegen, die Methoden und Verfahren, die zur wirkungsbasierten Bewertung eingesetzt werden, nach einem einheitlichen Schema zu dokumentieren. Dabei sind die Methoden mit ihren gesetzlichen Bezügen und matrixbezogenen Verknüpfungen dargestellt.

Diese Auflistung erlaubt im Vergleich der Methoden untereinander zu entscheiden, welche Verfahren problembezogen eingesetzt und inwieweit entsprechende Bewertungen abgeleitet werden können. Gleichzeitig wird deutlich, welche Harmonisierungen beim Einsatz der Methoden in der Praxis und in der wissenschaftlichen Weiterentwicklung der Teststrategie notwendig sind. Die vorliegende Zusammenstellung ist ein Schritt, den toxikologischen Testverfahren einen klar begründeten Platz im Risikomanagement zu geben.

Im Folgenden werden zunächst Grundlagen zur Vor- und Aufbereitung von Umweltproben für laborbasierte toxikologische und ökotoxikologische Wirktests beschrieben. Danach werden Informationen zu toxikologischen Testverfahren für die Beurteilung von Trinkwasser sowie zu laborbasierten ökotoxikologischen Testverfahren und zum Einsatz von Biomarkern zur Gesundheitsdiagnostik exponierter Organismen vorgestellt. In der abschließenden Tabelle sind die in RiSKWa eingesetzten wirkungsbasierten Methoden zusammengefasst.

## 2.1 Probenvorbereitung

Die toxikologische Untersuchung von wasserlöslichen Einzelchemikalien, die als Reinstoffe verfügbar sind, stellt in der Regel keine speziellen Anforderungen an die Probenvorbereitung. Durch die Herstellung von Standards und Verdünnungen können die gewünschten Testkonzentrationen reproduzierbar und genau erhalten werden. In der Literatur sind zu den etablierten toxikologischen Testverfahren ausführliche Arbeitsanweisungen oder Normen vorhanden, die eine vereinheitlichte Arbeitsweise ermöglichen. Für schwerwasserlösliche Substanzen geben DIN EN ISO 5667-16 (1999) sowie OECD (2000) Hinweise zum Einsatz von Lösungsvermittlern und zur Probenvorbereitung.

Für Umweltproben können mitunter spezielle Vorbereitungsschritte erforderlich werden, um eine Kompatibilität mit toxikologischen Verfahren herzustellen. Sofern bei den Untersuchungen eine Konzentrationslücke zwischen der vorhandenen Konzentration bekannter Schadstoffe und den Wirkschwellen im Testsystem besteht, können prinzipiell vier Lösungswege verfolgt werden:

### 1) Eingesetzte Stoffgehalte in den Toxizitätstests erhöhen:

Diese Möglichkeit bietet sich bei Versuchen an, bei denen nicht mit den tatsächlichen Gehalten im Spurenbereich, sondern durch Dotierung mit deutlich erhöhten Gehalten (Milligramm-pro-Liter-Bereich) in Laborversuchen gearbeitet werden kann. Es ist aber zu prüfen, inwieweit noch die Praxisnähe der veränderten Verfahren gegeben ist. Die maximale Dotierung hängt stark von den Randbedingungen des technischen Verfahrens ab und muss fallspezifisch ermittelt werden. Im Fall der toxikologischen Bewertung nativer Wasserproben scheidet diese Möglichkeit aus.

### 2) Auswahl geeigneter Testmethoden:

Durch die Auswahl des geeigneten Testsystems (z.B. chronische Toxizität statt akuter Toxizität) kann sich die Ansprechempfindlichkeit erhöhen, aber auch der Endpunkt bzw. die resultierende Aussage verändern.

### 3) Verbesserte Empfindlichkeit der toxikologischen Verfahren:

Bei einigen toxikologischen Testsystemen kann über eine Veränderung des Versuchsprotokolls eine verbesserte Empfindlichkeit erzielt werden (z.B. Vorinkubation, verlängerte Inkubationszeit). Ein Beispiel ist die Untersuchung von Azofarbstoffen im Ames-Test nach Prival et al. (1984), die eine reduktive Aktivierung der Azofarbstoffe ermöglicht. Welche Möglichkeiten der Empfindlichkeitssteigerung genutzt werden können, hängt von den jeweiligen Testsystemen ab. Ist die strikte Einhaltung gesetzlicher/normativer Vorgaben in der Versuchsdurchführung erforderlich, kann dies ein Ausschlusskriterium für empfindlichere Varianten sein. Prinzipiell ist die Änderung eines etablierten Versuchsprotokolls aber kritisch zu sehen, da hierüber die Vergleichbarkeit verloren gehen kann.

### 4) Verwendung von Anreicherungsverfahren:

Über Anreicherungsverfahren werden die in der Probe enthaltenen Schadstoffe soweit aufkonzentriert, dass deren Wirkschwelle im Testsystem erreicht wird. Anreicherungsverfahren der chemischen Analytik gehören zur täglichen Praxis in der Spurenstoffbestimmung und können auch für die Methodenentwicklung bei toxikologischen Fragestellungen als Vorlagen dienen. Im Gegensatz zur chemischen Analytik ist bei der toxikologischen Testung jedoch auf die Kompatibilität der eingesetzten Materialien mit den biologischen Testsystemen zu achten. So ist z.B. ein Konzentrat in reinem Dichlormethan oder Acetonitril für toxikologische Tests ungeeignet, und es muss ein

Lösungsmittelwechsel zu einem geeigneten Lösemittel wie Methanol, Ethanol, Aceton oder DMSO erfolgen.

Bevor näher auf die Möglichkeiten und Grenzen unterschiedlicher Anreicherungsverfahren eingegangen wird, sollen einige Informationen zu den möglichen Probestufen gegeben werden. Es können grob drei Schwierigkeitsgrade unterschieden werden, die ein unterschiedliches Vorgehen erfordern. Dabei sind unabhängig von den toxikologischen Testsystemen die allgemeinen Kriterien *Stoffkonzentration*, *Matrixzusammensetzung*, *repräsentative Blindprobe*, *Positivprobe über das Gesamtverfahren* zu beachten.

#### **Stufe I: Testsubstanz ist als Einzelstoff erhältlich**

Die einfachste Variante ist die Testung eines als Reinsubstanz vorliegenden Einzelstoffs. In diesem Fall können die Stoffkonzentration und die verwendete Matrix dem jeweiligen toxikologischen Verfahren optimal angepasst werden. Bei Einzelstofftestungen werden in den Richtlinien mitunter sehr hohe Gehalte (z.B. bis zu 5 mg/Platte im Ames-Test) vorgeschrieben. Blindkontrollen sind leicht durch die Untersuchung der Matrix ohne Stoffdosierung durchzuführen. Die Bewertung bei Einzelstofftestungen kann bei den etablierten Testsystemen nach den vorhandenen Richtlinien/Normen durchgeführt werden.

#### **Stufe II: Testsubstanz bzw. Substanzgemisch wird über einen Prozess generiert**

Soll untersucht werden, wie sich toxikologische Effekte einzelner Wasserinhaltsstoffe während eines Prozesses (physikalisch, chemisch und biologisch) verändern, so kann dies mittels Versuchen in Labor- oder Pilotanlagen durchgeführt werden. Die Ausgangsverbindung kann in der Regel analytisch erfasst und toxikologisch per Einzelstofftestung bewertet werden. Wird dieser Einzelstoff jedoch

transformiert, so liegen in den meisten Fällen keine umfassenden analytischen und toxikologischen Daten zu den Transformationsprodukten vor. Aus diesem Grund ist die toxikologische Testung der Gesamtprobe wünschenswert, da hierüber falsch-negative Aussagen aufgrund nicht beachteter Transformationsprodukte minimiert werden. Bei der Durchführung der Experimente ist es oft möglich, erhöhte Ausgangsgehalte der Testsubstanzen einzusetzen, so dass die Wirkschwellen in den toxikologischen Testsystemen erreicht werden. Sofern die erforderlichen Mindestgehalte zur Überschreitung der Wirkschwelle nicht in der Probe vorliegen, muss ein passendes Anreicherungsverfahren eingesetzt werden. Generell sollten die Versuche auch in reiner Wassermatrix (d.h. ohne Stoffdotierung) durchgeführt werden, so dass über diese Blindprobe durch das Verfahren bedingte falsch-positive Effekte ausgeschlossen werden können. Diese Arbeitsweise wird auch normalerweise in den Prüfrichtlinien bzw. in OECD (2000) gefordert. Die Bewertung der Testergebnisse ist im Vergleich zur Einzelstofftestung anspruchsvoller, da über den angewandten Prozess oft eine Mischung aus mehreren unbekanntem Transformationsprodukten generiert wird, und es können bei technischen Prozessen vielfältige Versuchsvarianten vorliegen. Für das Gesamtverfahren sollte durch Mitführen geeigneter Referenzsubstanzen und Negativkontrollen eine Qualitätskontrolle erfolgen.

#### **Stufe III: Toxikologische Untersuchung nativer Wasser- oder Abwasserproben**

Soll beispielsweise Abwasser oder ein Oberflächengewässer toxikologisch bewertet werden, kann dies bei einigen Toxizitätstests eine umfassende Probenvorbereitung erfordern. So liegen die Stoffgehalte (gen-)toxischer Verbindungen in den nativen Proben oft im Spurenbereich ( $< 1 \mu\text{g/L}$ ), die erforderliche Wirkschwelle eines Tests (z.B. Gentoxizität) kann jedoch auch für bekannte Re-

ferenzsubstanzen im Milligramm-pro-Liter-Bereich liegen. Obwohl die Testsysteme unterschiedliche Wirkschwellen besitzen, ist davon auszugehen, dass Tests zur Gentoxizität einen um drei bis fünf Größenordnungen höheren Stoffgehalt zur Überschreitung ihrer Wirkschwelle in Bezug auf die native Probe benötigen. Soll die Gentoxizität solcher Proben untersucht werden, müssen Anreicherungsverfahren mit großen Anreicherungsfaktoren angewandt werden. Ähnliches gilt für die Erfassung zytotoxischer Effekte. Im Gegensatz dazu können aber auch Beispiele genannt werden, die bereits bei Spurengehalten einen toxikologischen Effekt anzeigen können (z.B. endokrine Wirkungen).

Bei der Anwendung von Anreicherungsverfahren für Proben der Stufe II und III müssen primär folgende Punkte berücksichtigt werden:

### 1) Wiederfindung

Die genaue Zusammensetzung und die Stoffeigenschaften potenzieller Schadstoffe sind in veränderten oder nativen Proben nicht bekannt, weshalb die Anreicherungs-methode umfassend sein muss. Dies bedeutet, dass für möglichst alle Verbindungsklassen eine sehr gute Wiederfindung erzielt werden muss. Als Verbindungsklassen sind beispielsweise unpolare, polare, anionische und kationische, aromatische, flüchtige, nichtflüchtige und makromolekulare Verbindungen zu nennen. Weiterhin ist zu beachten, dass sich unter diesen Randbedingungen die Wiederfindungen und Anreicherungsfaktoren nur über Modellsubstanzen abschätzen lassen. In der chemischen Spurenanalytik von Wasserkontaminanten sind Anreicherungsverfahren etablierte Werkzeuge zur Empfindlichkeitssteigerung und zur Entfernung unerwünschter Matrixbestandteile. Die Anzahl der unterschiedlichen Methoden und Materialien resultiert aus den vielfältigen Substanzeigenschaften der Analyte. Aus der Vielzahl der in der chemi-

schen Analytik eingesetzten Methoden wird deutlich, dass es auch in der toxikologischen Testung nicht die perfekte Einzelmethode geben kann, die alle Anforderungen erfüllt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Erfolg der Anreicherungs-methode über die analytische Bestimmung der Wiederfindungen von Modellsubstanzen und der toxikologischen Testung von angereicherten Positivsubstanzen überprüft werden sollte.

### 2) Matrixeinfluss

Sollen z.B. Untersuchungen zur Gentoxizität durchgeführt werden, so werden aufgrund der Wirkschwellen im Milligramm-pro-Liter Bereich große Anreicherungsfaktoren (100-fach bis 1000-fach) notwendig. In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass beispielsweise der Gehalt des toxischen Spurenstoffs von 1 µg/L auf 1 mg/L gebracht wird, gleichzeitig aber auch der Gehalt an anderen Matrixkomponenten (z.B. Huminstoffen) stark erhöht wird (z.B. von 1 mg/L auf 1000 mg/L). Liegt zudem eine *umfassende* Anreicherung vor, werden auch die anorganischen Wasserinhaltsstoffe angereichert. In diesem Fall können leicht Salzgehalte im Gramm-pro-Liter-Bereich im Konzentrat auftreten. In den Konzentraten kann es zu Ausfällungen kommen, die anorganische Salze (z.B. Calciumcarbonat) und organische Verbindungen betreffen können. Es besteht dann die Gefahr eines Substanzverlustes durch Ausfällung oder Mitfällung. Aufgrund einer starken Aufkonzentration der Wassermatrix kann es in den toxikologischen Testsystemen zu unerwünschten Effekten kommen (z.B. Empfindlichkeitsveränderungen durch Matrixbestandteile, Überschreitung der zulässigen Osmolalität durch den hohen Salzgehalt).

Bei der Untersuchung nativer Wasserproben in Kombination mit Anreicherungsversuchen kann die Generierung von Blindproben problematisch sein:

- Es ist zu klären, welches Wasser als Referenz (Blindprobe) verwendet werden kann (z.B. Trinkwasser, Reinstwasser, spezielles Modellwasser).
- Für die Charakterisierung des Gesamtverfahrens ist zur Generierung einer Blindprobe eine Wassermatrix notwendig, die keine positiven Effekte in den toxikologischen Testsystemen verursacht (kein falsch-positives Ergebnis).
- Nach einer Dotierung dieser Matrix mit bekannten Referenzsubstanzen und dem Durchlaufen des Gesamtverfahrens muss die Wirkung im Testsystem dem Anreicherungsfaktor gemäß entsprechen, d.h. ein richtig positives Ergebnis mit korrekter Wirkhöhe ergeben.

### 3) Kompatibilität der Materialien

Neben der erfolgreichen Anreicherung muss auch die Kompatibilität der Anreicherungsverfahren mit den toxikologischen Testsystemen gegeben sein. Es dürfen keine Materialien und Chemikalien eingesetzt werden, die zu einem falsch-positiven oder falsch-negativen Resultat führen. Insbesondere muss der Einfluss von organischen Lösungsmitteln kritisch geprüft werden (z.B. im Extrakt nach Festphasenanreicherung). Die maximal zulässigen Lösungsmittelanteile variieren je nach Testsystem und müssen ggf. in Vorversuchen ermittelt werden. Akzeptable Lösungsmittel für toxikologische Testsysteme sind beispielsweise Methanol, Ethanol, Aceton und DMSO, wobei deren zulässige Maximalgehalte oftmals im unteren einstelligen Prozentbereich liegen. In offenen Systemen ist bei längeren Expositionsdauern auf die Flüchtigkeit der Lösemittel zu achten. In Ökotoxizitätstests empfiehlt die OECD (2000) eine maximale Lösemittelkonzentration von einem Zehntel der NOEC (no observed effect concentration) oder alternativ, wenn entsprechende Toxizitätsdaten fehlen, von 0,1 mL/L.

## 2.2 Anreicherungsverfahren

Im folgenden Abschnitt werden die Grundzüge von Anreicherungsverfahren näher beschrieben. Es werden auch Randbedingungen aufgeführt, die in der Kombination mit toxikologischen Testsystemen beachtet werden müssen.

### Anreicherung per Festphasen-Extraktion (SPE)

#### Praktisches Vorgehen:

Die Probe (z.B. 1000 mL) mit definiertem pH-Wert wird langsam durch eine vorkonditionierte Kartusche gegeben, in der sich ein Adsorptionsmaterial (z.B. 500 mg) befindet, an dem die Analyte adsorbieren. Es handelt sich hierbei oft um ein oberflächenfunktionalisiertes Polymermaterial. Die Auswahl des richtigen Adsorbentmaterials hat einen großen Einfluss auf den Erfolg der Anreicherung und muss auf die zu erwartenden Analyte (unpolar, polar, sauer, basisch) und den vorliegenden pH-Wert abgestimmt sein. Sind die Stoffeigenschaften unklar oder stark unterschiedlich, so ist die Verwendung von mehreren Materialien zu prüfen. In diesem Fall kann die Toxizität der einzelnen Fraktionen auch separat bestimmt werden (vgl. auch das Konzept der TIE = Toxicity Identification Evaluation, z.B. Markle, 2005). Anschließend werden nach einem Trocknungsschritt die adsorbierten Verbindungen mittels weniger Milliliter eines organischen Lösungsmittels (z.B. 5 mL) oder eines Puffers mit bestimmtem pH-Wert wieder vom Austauschermaterial eluiert. Mit dem hier gewählten Elutionsvolumen wird eine 200-fache Anreicherung erzielt. An dieser Stelle kann ein Lösungsmittelwechsel erfolgen. Das organische Konzentrat muss nun so weit verdünnt werden, bis dass kein Störeinfluss auf das nachfolgende Testsystem mehr besteht. Beispielsweise toleriert der Ames-Test einen Ethanolgehalt von bis zu 4 %, was bedeutet, dass das Konzentrat 25-fach verdünnt werden muss. Nach diesem notwendigen Schritt bleibt ein 8-facher Gesamtanreicherungsfaktor übrig.

Um den Anreicherungsfaktor zu verbessern, kann nach der Elution das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom eingeeengt werden. Auf diese Weise werden höhere Anreicherungsfaktoren erhalten. Wird das Lösungsmittel-extrakt im obigen Beispiel von 5 mL auf 1 mL gebracht, so liegt nun ein 40-facher Gesamtanreicherungsfaktor vor. Für eine transparente Methodenbeschreibung ist der Gesamtanreicherungsfaktor grundsätzlich zu nennen, um die Relevanz der Befunde nachvollziehen zu können, die bei sehr hohen Anreicherungsfaktoren stark eingeschränkt ist. Sofern die Analyte flüchtig sind, können beim Abblasen des Lösungsmittels Verluste auftreten, was zu falsch-negativen Testergebnissen führen kann. Das Einengen bis zur Trockene und die Wiederaufnahme in einem anderen Lösungsmittel bzw. Wasser ist eine weitere Option (= kompletter Lösungsmittelwechsel). Es ist darauf hinzuweisen, dass die Verwendung reinen Wassers oft nicht zur quantitativen Rücklösung führt (z.B. bei unpolaren Molekülen). In diesen Fällen ist ein gewisser Anteil an Lösungsmittel im Wasser bzw. zunächst die Vorlösung mit einer gewissen Menge an organischem Lösungsmittel notwendig. Alternativ kann auch in das SPE-Extrakt ein schwerflüchtiger Keeper zugegeben werden (z.B. DMSO oder Wasser), der ein definiertes Endvolumen einstellt und weitgehend einen Substanzverlust durch Wandsorption verhindert.

#### **Weitere Randbedingungen der Festphasenanreicherung:**

Unpolare Verbindungen können sehr gut mit Hilfe der SPE-Technik angereichert werden. Deutlich schlechtere Wiederfindungsraten werden bei stark polaren oder ionischen Verbindungen erhalten. In diesen Fällen kann die Nutzung einer Festphase mit polaren oder ionischen Gruppen von Vorteil sein. Dieses wiederum wird jedoch wieder schlechtere Eigenschaften für nicht-ionische Verbindungen aufweisen. Da die zu erwartenden Analyte zu unterschiedlichen Stoffklassen gehören können, ist mit einem einzigen Festphasenmaterial nur ein Kompromiss in den Wiederfindun-

gen möglich. Auch die vielfältigen SPE-Methoden der chemischen Analytik zeigen, dass es nicht das eine perfekte Festphasenmaterial für alle Stoffgruppen gibt.

Um das anreicherbare Substanzspektrum zu erhöhen, können auch mehrere Austauschermaterialien zur Anreicherung (sequenziell oder als Mischung) eingesetzt werden. Über die Kombination von unterschiedlichen Adsorbentien kann ein breites Spektrum an Substanzen erfasst werden. Für eine erfolgreiche Anreicherung müssen die adsorbierten Substanzen jedoch auch wieder vom Festbett-austauscher eluiert werden, was mitunter der kritische Schritt bei dieser Vorgehensweise sein kann. Zur Elution unpolarer Verbindungen werden Lösungsmittel, für Anionen und Kationen werden Salzlösungen mit definierten pH-Werten (sauer oder basisch) benötigt. Hierbei müssen Wechselwirkungen der Elutionsmittel untereinander, sowie deren Einfluss auf die nachfolgenden toxikologischen Testsysteme berücksichtigt werden.

Als großer Vorteil der SPE-Technik ist neben der Anreicherung der Analyte die gleichzeitige Abreicherung oder Entfernung der anorganischen Salzfracht zu nennen (Standardionen aus der Wassermatrix). Dieses Argument ist jedoch nur dann zulässig, wenn auf diese Stoffgruppen bei der toxikologischen Untersuchung verzichtet werden kann, d.h. wenn nicht mit stark polaren oder ionischen Schadstoffen gerechnet werden muss (z.B. Bromat, Chromat, Azid, Cyanid, Arsenspezies, Schwermetalle).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die nachfolgenden toxikologischen Testverfahren der notwendige Einsatz von Lösungsmitteln zur Elution der Analyte vom Festphasenmaterial kritisch zu sehen ist. Die üblicherweise im analytischen Bereich bewährten Lösungsmittel sind für die Kopplung mit toxikologischen Testsystemen ungeeignet oder nur in Grenzen einsetzbar. Hier sind in gewissem Umfang z.B. Methanol, Ethanol, Aceton oder DMSO tolerier-

bar. Weiterhin muss beachtet werden, dass über den Lösungsmittelwechsel (Abblasen des Elutions-/Lösungsmittels und Wiederaufnahme in DMSO/Wasser) flüchtige oder stark adsorptive Komponenten verloren gehen können.

### Anreicherung per Vakuumkonzentration

Eine weitere Möglichkeit der Anreicherung von Verbindungen ist die Entfernung des Wassers über seine Flüchtigkeit. Als prinzipielle Verfahren können hier das Verdunsten, Kochen, Verdampfen im Unterdruck und die Gefriertrocknung (Sublimation) genannt werden. Eine Wasserentfernung über eine Verdunstung dauert in der Praxis zu lange und das schnellere Verfahren über das Kochen des Wassers unter Normaldruck stellt eine hohe thermische Beanspruchung für die Probe dar. Aus diesem Grund sind Vakuum-Verfahren zielführender, da bereits bei niedrigen Temperaturen der Dampfdruck des Wassers erreicht wird. Typische Ausführungsformen dieser Technik sind Rotationsverdampfer und Vakuumzentrifugen, bei denen im Unterdruck und bei moderaten Temperaturen eine zügige Entfernung des Wassers erreicht wird. Beim Rotationsverdampfer wird über eine Drehbewegung des Probenkolbens eine erhöhte Oberfläche für die Verdampfung erzeugt, was zudem Siedeverzüge verhindert. Der Wärmeeintrag erfolgt über ein beheiztes Wasserbad. Im Falle der Vakuumzentrifuge werden Siedeverzüge über die Zentrifugalkraft unterbunden. Der Wärmeeintrag erfolgt bei dieser Technik beispielsweise über Infrarotstrahler. Durch Nutzung einer Kältefalle und einer leistungsstarken Vakuumpumpe lässt sich eine zügige Wasserentfernung selbst bei Proben-temperaturen unter 10 °C erreichen, weshalb dieses Verfahren als sehr schonend eingestuft werden kann.

Eine verwandte Technik ist die Gefriertrocknung, bei der die Wasserentfernung über den Prozess der Sublimation erfolgt. Die Gefriertrocknung wird sowohl in der Probenvorbereitung zur chemischen Analytik, als

auch in großtechnischen Prozessen erfolgreich eingesetzt. Es handelt sich um einen schonenden Prozess, der für empfindliche Verbindungen geeignet ist. Als Nachteil der Gefriertrocknung ist die geringe Sublimationsgeschwindigkeit des Wassers zu nennen. Damit eine größere Wassermenge in einer überschaubaren Zeit entfernt werden kann, wird die Probe über eine möglichst große Oberfläche verteilt. Zur Anreicherung von Proben im Literbereich sind große Schalen erforderlich. Wird in einer solchen Schale bis zu einer geringen Restmenge oder bis zur Trockene die Gefriertrocknung durchgeführt, muss das Konzentrat bzw. der Rückstand wieder zurückgewonnen werden. Mit zunehmender Oberflächengröße steigt jedoch die Gefahr des Substanzverlustes durch Adsorptionseffekte.

### Weitere Randbedingungen der Vakuumkonzentration

Die Vakuumkonzentration hat den Vorteil, dass alle Komponenten der Probe im Konzentrat enthalten bleiben, sofern sie nicht leicht flüchtig sind. Insbesondere können stark polare und ionische Verbindungen quantitativ angereichert werden, was über SPE-Techniken nur mit Spezialmaterialien bzw. großem Aufwand möglich ist. Als weiterer Vorteil kann angeführt werden, dass bei Nutzung eines Rotationsverdampfers oder einer Vakuumzentrifuge keine kritischen Chemikalien und Materialien mit der Probe in Kontakt kommen. Infolgedessen liegt auch ein rein wässriges Konzentrat vor, weshalb keine negativen Effekte durch organische Lösungsmittel auftreten. Wird beispielsweise eine Probe von 1000 mL auf ein Endvolumen von 20 mL gebracht, kann ein 50-facher Anreicherungsfaktor erzielt werden. Im Gegensatz zur Festphasenextraktion entfällt der weitere notwendige Verdünnungsschritt, und die Probe kann direkt in das toxikologische Testsystem gegeben werden.

Neben den bislang genannten positiven Eigenschaften der Vakuumkonzentration muss aber auch erwähnt werden, dass es über die Anreicherung der Salze in

der Probe zu Ausfällungen kommen kann. Besonders bei stark kalkhaltigen Wässern tritt mit zunehmender Aufkonzentration eine Trübung und Ausfällung von z.B. Calciumcarbonat auf. Sofern die Salze aus der Probe ausfallen, verringert dies die Salzfracht in der Lösung. Als unerwünschter Nebeneffekt können jedoch auch Mitfällungen auftreten, die zu einem Substanzverlust führen. Wenn Löslichkeitsprodukte überschritten werden, kann es auch zu einer direkten Ausfällung von Verbindungen kommen (z.B. kann Oxalsäure als typisches Ozonungsprodukt mit Calcium zu schwerlöslichem Calciumoxalat reagieren und ausfallen).

Leicht lösliche Salze (z.B. Chloride und Nitrate) verbleiben im Konzentrat und führen zu einer deutlichen Erhöhung der Ionenstärke. Wird der Anreicherungsfaktor zu hoch gewählt, kann dies zu einer so großen Osmolalität im Konzentrat führen, dass dieses bei biologischen Testsystemen nicht mehr angewandt werden kann. Der tolerierbare Wert ist vom Testsystem abhängig und muss bei der Methodenentwicklung experimentell bestimmt werden. Zur Verringerung der Salzfracht des Konzentrats können Mischbett-Ionenaustauscher eingesetzt werden, die über ihre H<sup>+</sup>- und OH<sup>-</sup>-Form im Austausch Wasser abgeben. Die Nutzung dieses Verfahrens ist jedoch nur dann zulässig, wenn sichergestellt werden kann, dass keine Testverbindungen über den Ionenaustauschprozess entfernt werden. Aus der Nutzung von Ionentauschern für die chemische Analytik ist bekannt, dass die auf Polymeren basierenden Austauscherharze über sekundäre Wechselwirkungen auch mit aromatischen Verbindungen interagieren; zusätzlich können Hilfsstoffe (Plasticiser) und verbliebene Oligo- bzw. Monomere aus dem Produktionsprozess der Polymere abgegeben werden, die toxikologisch relevant sein können und daher das Testergebnis beeinflussen können. Aus diesem Grund ist der Einsatz dieses Verfahrens zur Entsalzung von Wasserproben mit unbekanntem Testsubstanzen als kritisch einzustufen. In jedem Fall ist es ratsam, die Austauscherkapazität an den Salzgehalt

des Wassers anzupassen, um nicht mit einer Überkapazität ungewollt einen Substanzverlust zu verursachen.

### Anreicherung per Membranfiltration

Neben der SPE- und Vakuumtechnik soll auf die Möglichkeit der Anreicherung per Membranverfahren hingewiesen werden. Bei Nutzung von Umkehrosmosemembranen (RO) wird im Idealfall nur Wasser durch die Membran gelassen. Größere Moleküle und Ionen werden hingegen zurückgehalten. Der Prozess wird großtechnisch zur Entsalzung von Wasser eingesetzt, wobei in diesem Fall das Permeat das Produkt ist. Wird die Technik für die Anreicherung genutzt, wird hingegen das Konzentrat verwendet und das Permeat verworfen. Um eine erhöhte Anreicherung zu erzielen, wird die Anlage im Kreislaufprozess geführt, wobei das Konzentrat wieder zurück in den Probenbehälter geleitet wird. Theoretisch sind hierbei Anreicherungen bis zum Totvolumen der Anlage möglich. In einer für ein Forschungsvorhaben entwickelten Laboranlage konnten beispielsweise 10 Liter Wasserprobe bis zum Anlagentotvolumen von 300 mL eingengt werden, was einer 33-fachen Anreicherung entspricht (Happel et al. 2013). Mit zunehmender Wasserentfernung steigt der Salzgehalt im Konzentrat deutlich an. Dies kann zu Ausfällungen von z.B. Calciumcarbonat und Calciumsulfat führen, was eine Verblockung der Membran zur Folge hat. Zur Verhinderung dieses Effektes kann vor der Membrananreicherung ein Kationentausch durchgeführt werden. Speth et al. (2008) nutzten eine solche Technik, um mit der entsalzten, aufkonzentrierten Probe toxikologische Tests durchzuführen.

Die drei vorgestellten Konzepte der Festphasenanreicherung, Vakuum-Konzentration und Umkehrosmose wurden in dem Forschungsvorhaben *„Entstehung, Vorhersage und Bewertung von Transformationsprodukten anthropogener Spurenstoffe bei der oxidativen Trinkwasseraufbereitung am Fallbeispiel PSM-Me-*

*taboliten*“ für kleine Laborversuche etabliert und auf ihre Eignung hin untersucht. Im Verlaufe der Versuche hat sich gezeigt, dass die Anreicherung mittels Umkehrosmose bei einigen Substanzen zu geringen Wiederfindungen führt, wobei Adsorptionsprozesse an der RO-Membran als Ursache vermutet wurden. Auch die Entsalzung an stark sauren Kationenaustauschern wurde getestet. Hier hat sich gezeigt, dass einige Substanzen durch den Ionentauscher entfernt wurden, obwohl es sich um keine Kationen handelte. Es müssen daher noch andere Wechselwirkungen vorgelegen haben. Im Fortgang dieses Projekts wurde daher beschlossen, als Anreicherungsverfahren die Festphasenextraktion und die Vakuum-Konzentration parallel bei allen Proben einzusetzen.

### 2.3 Zusammenfassung wichtiger Randbedingungen

Zur erfolgreichen Durchführung toxikologischer Tests müssen oft mehrere Randbedingungen berücksichtigt werden. Bereits die Form der Proben kann ausschlaggebend für das Methodendesign des Tests, aber auch für die Belastbarkeit der Ergebnisse sein. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden drei Stufen eingeführt, wobei Reinsubstanzen der Stufe I, Transformationsprodukte aus Anlagen der Stufe II und native Wasserproben der Stufe III zugeordnet wurden. Werden Wirkschwellen der Testsysteme in Proben nicht erreicht, müssen zusätzliche Probenvorbereitungsschritte (z.B. Anreicherung) oder methodische Veränderungen (z.B. verlängerte Inkubationszeiten) am Testsystem vorgenommen werden. In diesen Fällen muss von standardisierten Vorschriften abgewichen werden, was ggf. die Aussagekraft der Ergebnisse mindert. Bei Anreicherungsverfahren ist zu beachten, dass es zu Substanzverlusten kommen kann und über Lösungsmittel oder Adsorbentmaterialien unerwünschte Effekte auftreten können. Das Mitführen von Blindproben über das Gesamtverfahren ist für die Stufen I und II vom Versuchsdesign möglich

und sollte standardmäßig durchgeführt werden. Für Proben der Stufe III (z.B. native Wasserprobe) sind direkte Blindproben (d.h. mit der identischen Wassermatrix ohne die toxische Substanz) nicht verfügbar. In diesen Fällen müssen andere repräsentative Blindproben gefunden werden (d.h. mit vergleichbarer Matrix, aber ohne effektauslösende Substanzen). Werden geeignete Blindproben über das Gesamtverfahren mitgeführt, können falsch positive Resultate aufgedeckt werden. Ergänzend hierzu sind für Tests der Stufen II und III geeignete Positivkontrollen über das Gesamtverfahren mitzuführen, über die Matrixeffekte in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve oder falsch-negative Resultate festgestellt werden können.

## Toxikologische Testverfahren 3 für die Trinkwasserbewertung

### 3.1 Der gesundheitliche Orientierungswert (GOW) als Ausgangspunkt

Die Trinkwasserverordnung (TrinkwV) fordert ein Wasser für den menschlichen Gebrauch, das durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit nicht besorgen lässt. Darin kommt ein Qualitätsanspruch zum Ausdruck, der nicht allein auf die Abwehr bekannter und wissenschaftlich quantifizierbarer Gefährdungspotenziale abstellt, sondern zugleich die Vorsorge gegen solche Gefährdungspotenziale einfordert.

Eine toxikologische Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen im klassischen Sinne kann aufgrund der mangelnden Datenlage nicht vorgenommen werden. Mit der Empfehlung des Umweltbundesamtes (UBA) „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ (2003) existiert ein theoretischer Ansatz zur Ableitung des gesundheitlichen Orientierungswertes (GOW), der auf den verfügbaren Daten für spezifische Wirkmechanismen (u. a. Gentoxizität, Neurotoxizität, Immuntoxizität) basiert. Der GOW ist ein Vorsorgewert zum Schutz der menschlichen Gesundheit und wird immer so niedrig festgelegt, dass eine zunehmende Vervollständigung der toxikologischen Daten in der Regel zu demselben oder zu einem höheren, aber nie zu einem niedrigeren Wert führt. Abbildung 1 zeigt die hierarchische Festlegung des GOW. Auch bei Fehlen toxikologischer Daten genügt der GOW = 0,1 µg/L der Mindestanforderung in § 6 (1) TrinkwV 2001, demgemäß selbst von lebenslangem Genuss eines möglicherweise belasteten Trinkwassers kein Anlass für eine gesundheitliche Besorgung ausgehen darf.

Es gilt heute als anerkannt, dass die Kombination von Ames-Test und Mikrokernstest nahezu 90 % der *in vivo* gentoxischen Nagetierkanzerogene sicher erfasst.

Da sich aus der Höhe des GOW (abhängig von der Datenlage und dem Wirkmechanismus in einer Spannweite von 0,01 µg/L bis 3 µg/L) auch die jeweiligen Maßnahmen im Risikomanagement ergeben, wurde im Verbundprojekt TOX-BOX ein methodisches Instrumentarium zur Erhebung toxikologischer Daten mittels hierarchischer Teststrategien für die jeweiligen Endpunkte entwickelt.

Für die bewertungsrelevanten Endpunkte im GOW-Konzept wurden *In-vitro*-Teststrategien entwickelt. Teststrategien müssen zum Nachweis von Gefährdungspotenzialen hierarchisch strukturiert sein, weil man davon ausgeht, dass ein Testsystem allein nicht ausreicht, das mögliche toxikologische Potenzial einer Substanz ausreichend sicher voraussagen zu können. Mit zwei bis drei *In-vitro*-Testverfahren innerhalb eines Endpunktes sollen primäre Wirkmechanismen hinreichend sicher identifiziert werden. In Bezug zum theoretischen GOW-Konzept werden experimentelle Daten zum entsprechenden Endpunkt erhoben. Die Festlegung des GOW erhält dadurch eine höhere wissenschaftliche Basis.

### 3.2 Endpunkte der Bewertung

#### Endpunkt Gentoxizität

Für den Endpunkt Gentoxizität werden der Einsatz der bakteriellen Testsysteme umu-Test, Ames-Test und Mikrokernstest empfohlen. Die Testverfahren folgen in ihrer Durchführung ISO-Vorschriften bzw. OECD-Prüfrichtlinien. Besonderes Augenmerk wird auf die Berücksichtigung eines adäquaten Metabolismus gelegt, um eine Aussage hinsichtlich der Humanrelevanz erhobener Befunde treffen zu können. Das heißt in der Anwendung der Einsatz von spezifischen Teststämmen in den bakteriellen Testverfahren und humanifizierter Säugerzellkulturen im Mikrokernstest. Für den Mikrokernstest gilt, dass die Durchführung im mikros-

kopischen Verfahren und im Durchflussszytometer als gleichwertig zu betrachten ist.

### Endpunkt endokrine Wirkungen

Für den Endpunkt endokrine Wirkungen wird eine Teststrategie empfohlen, die aus Rezeptor-vermittelten Tests (z. B. CALUX oder Yeast Screen) und dem H295R-Steroidogenesis-Assay bestehen. Vor Durchführung der ersten Schritte sollte die Testsubstanz, sofern die chemische Struktur bekannt ist, mittels ihrer Strukturmerkmale über QSAR-Programme bewertet werden. Diese können Voraussagen über (potenziell) aktive Metabolite treffen und die Entschei-

dung über die Reihenfolge der Versuche in Bezug auf die metabolische Aktivierung der Probe (z. B. mit S9) vereinfachen. Die Rezeptor-vermittelten Tests werden vorgeschlagen, da sie einen hohen Probendurchsatz und eine schnelle Durchführung gewährleisten, aber dennoch einen möglichen Effekt der Substanz sensitiv nachweisen können. Sofern die Einzelsubstanzen in dem Testsystem nicht metabolisiert werden, wird zusätzlich die metabolische Aktivierung der Probe durch einen S9-Mix empfohlen. So können auch zusätzliche Informationen zu einer möglichen humantoxikologischen Relevanz erhalten werden. Parallel dazu wird ein nicht Rezeptor-vermittelter Test empfohlen. Substanzen, die ihre endokrine Aktivität nicht über Rezeptoren

<b>Gentoxisch &amp; relevanter Metabolismus?</b>	<b>JA</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>
<b>Gentoxisch?</b>		<b>JA /</b> keine Daten	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>
<b>Immun- und/oder Neurotoxisch?</b>			<b>JA /</b> keine Daten	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>
<b>Subchronische Toxizität?</b>				<b>JA /</b> keine Daten	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>
<b>Chronische Toxizität?</b>					<b>JA /</b> keine Daten	<b>NEIN</b>
<b>Gesundheitlicher Orientierungswert: µg/L</b>	<div style="background-color: #e67e22; padding: 10px; text-align: center;"> <b>Besorgnisbereich</b> </div>				<b>3,0 µg/L (GOW<sub>5</sub>)</b>	<b>&gt; 3,0 µg/L</b>
	↓	↓	↓	↓		
	<b>≤ 0,01 µg/L (GOW<sub>0</sub>)</b>	<b>0,1 µg/L (GOW<sub>1</sub>)</b>	<b>0,3 µg/L (GOW<sub>3</sub>)</b>	<b>1,0 µg/L (GOW<sub>4</sub>)</b>		
	<b>Vorsorgebereich</b>					

Abb. 1: Bewertung teil- oder nicht-bewertbarer Stoffe im Trinkwasser nach dem GOW-Prinzip. (Gemäß Empfehlung des Umweltbundesamtes 2003)

vermitteln, können über diesen Test trotzdem noch, z. B. durch die Beeinflussung der Steroidogenese, nachgewiesen werden. Diese Tests bieten zudem die Möglichkeit, tiefergehende Mechanismus-spezifische Wirkweisen aufzuklären.

Mit den jeweiligen Testsystemen sollten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sowie minimal wirksame Konzentrationen (LOEC) ermittelt werden können, die dann in das GOW-Konzept einfließen. Sofern die angehängten Arbeitsanweisungen keine genaueren Angaben machen, sollten die zytotoxischen Effekte der Proben in den getesteten Konzentrationen jeweils nicht über 20 % liegen.

### Endpunkt Neurotoxizität

Für den Endpunkt Neurotoxizität wurde eine dreistufige Teststrategie entwickelt. Dabei besteht die erste Stufe aus relativ einfachen und unspezifischen Verfahren zur Toxizitätsprüfung und zum Nachweis von Vorläuferereignissen („precursor events“). Die dritte Stufe bestätigt oder verwirft die in der zweiten Stufe angezeigten neurotoxischen Verdachtsmomente durch spezifische Nachweisverfahren. Nachfolgend werden die wesentlichen *In-vitro*-Testsysteme benannt. Die detaillierte Beschreibung der umfangreichen Testprotokolle kann im TOX-BOX-Leitfaden „Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung“ eingesehen werden.

Die in der ersten Teststufe durchgeführten Testverfahren an den Blutzelllinien Jurkat und U-937 zum Nachweis der Zytotoxizität der chemischen Substanzen, differenziert in Nekrose und Apoptose, liefern durch Ermittlung von  $EC_{10}$ - bzw.  $EC_{50}$ -Werten und der niedrigsten apoptotisch wirksamen Konzentrationen Informationen zur Stärke der Zytotoxizität. Zur Charakterisierung der ablaufenden zytotoxischen Mechanismen werden in dieser Teststufe Veränderungen des Redox-

Gleichgewichts durch ROS-Nachweis und Veränderungen des Anteils an reduziertem Glutathion sowie weiterer Apoptoseparameter wie MMP-Verlust und Caspasenaktivierung erfasst. Veränderungen dieser sogenannten Vorläuferereignisse („precursor events“) ermöglichen eine erste Abschätzung des toxischen Potenzials und auffälliger toxischer Mechanismen.

In der zweiten Teststufe werden vergleichende Untersuchungen zur Zellmorphologie und Nekrose mit SH-SY5Y-Neuroblastomzellen und mit Hep G2-Leberkarzinomzellen durchgeführt. Untersuchungen zur Apoptose, der Induktion von oxidativem Stress und von Veränderungen des GSH-Gehaltes in Zellen liefern weitere Daten zur Beurteilung stärkerer oder auffälliger Wirkungen der chemischen Substanzen auf Neuroblastomzellen und damit Hinweise auf mögliche neurotoxische Wirkungen.

In der dritten Teststufe werden weiterführende Untersuchungen an SH-SY5Y-Zellen sowie an primären humanen Astrozyten durchgeführt. In die *In-vitro*-Teststrategie werden deshalb Untersuchungen an primären humanen Astrozyten zu zytotoxischen und morphologischen Veränderungen einbezogen. An den Neuroblastomzellen der SH-SY5Y-Zelllinie werden Untersuchungen zur Beeinflussung der Neuritendifferenzierung und der intrazellulären Signaltransduktion untersucht.

### Ableitung eines GOW

Zur Ableitung eines GOW werden die endpunktbezogenen Testergebnisse im Sinne einer Ja-/Nein-Entscheidung herangezogen und in seiner Höhe als numerischer Wert festgelegt (s. Abb. 1).

## 3.3 Ausblick zur Bewertung von Trinkwasser

Eine direkte (gen-)toxikologische Bewertung von Trinkwasser bzw. von behandeltem Wasser ist mit

den im PRiMaT-Projekt entwickelten Methoden aus Sicht der Autoren nicht möglich. Es handelt sich hier um Proben der Stufe III. Es wird davon ausgegangen, dass typischerweise die Gehalte organischer Wasserkontaminanten unter 1 µg/L liegen. Durchläuft ein solches Wasser eine Aufbereitung und bilden sich hierdurch mehrere Transformationsprodukte, liegen die Einzelgehalte nochmals niedriger. Auch mit den im Projekt erarbeiteten beiden Anreicherungsverfahren werden maximal nur ca. 50 µg/L erreicht. Im Vergleich zu den einzusetzenden Gehalten an Positivsubstanzen in (gen-)toxikologischen Testsystemen im unteren Milligramm-pro-Liter-Bereich ist zu bezweifeln, dass Gehalte von < 50 µg/L die Wirkschwellen überschreiten. Insofern ist mit falsch-negativen Aussagen zu rechnen. Ein Auswege zur Schließung dieser Konzentrationslücke ist die Anwendung von Probenvorbereitungsverfahren mit großen Anreicherungsfaktoren (1000-fach und höher). Die Herausforderung an das Anreicherungsverfahren besteht darin, eine umfassende 1000-fache Anreicherung aller möglichen Wasserinhaltsstoffe zu erreichen (unpolare, polare, neutrale, kationische und anionische Verbindungen). Zudem muss das erhaltene Konzentrat dann auch kompatibel zu den nachfolgenden toxikologischen Testsystemen sein (Lösungsmittelanteil, Salzgehalt).

Abschließend soll noch auf die Problematik der Blind- und Positivkontrollen über das Gesamtverfahren bei Untersuchungen nach Stufe III eingegangen werden. Positivkontrollen lassen sich, so wie bei der Durchführung in Stufe II, durch Dotieren in die zu prüfende Wassermatrix generieren. Es ist dann ein positiver Befund zu erwarten, der eine dem Anreicherungsfaktor entsprechende Wirkung aufweist. In diesem Fall darf das Wasser ohne Dotierung keine oder nur eine geringe Wirkung im toxikologischen Test zeigen. Liegen hier erhöhte Wirkungen vor, muss eine andere Wassermatrix verwendet werden.

Für die Art der Blindproben können zwei Fälle unterschieden werden:

- a) Bei technischen Prozessen, in denen Transformationsprodukte erwartet werden, jedoch keine Substanzgehalte dotiert werden (z.B. reale großtechnische Anlagen), kann als Blindprobe das Wasser vor der Wasserbehandlung verwendet werden.
- b) Steht nur eine Wasserprobe zur Verfügung (z.B. Leitungswasser) und zeigt diese Probe eine Wirkung in den Tests, steht keine perfekte Blindprobe zur Verfügung. Es muss dann auf eine andere Wassermatrix ausgewichen werden, die ähnlich in ihrer Zusammensetzung ist, jedoch keine Wirkung zeigt.

Treten bei Blindproben in stark angereicherten Proben in allen Fällen Wirkungen auf, kann die Ursache des Effekts ggf. auch aus der aufkonzentrierten Wassermatrix, dem Anreicherungsmaterial oder den verwendeten Lösungsmitteln stammen. Hier ist zu bedenken, dass bei einer umfassenden 1000-fachen Anreicherung ein DOC-Gehalt von ca. 1000 mg/L und ein Salzgehalt von rund 200 g/L erzielt werden.

### 3.4 Ausblick zur Bewertung technischer Anlagen zur Trinkwasseraufbereitung

Sollen die Transformationsprodukte einer bekannten Wasserkontaminante, die in einer Wasserbehandlungsanlage auf einem biologischen, chemischen oder physikalischen Weg gebildet wurden, untersucht werden, können die Konzepte der Stufen I und II angewandt werden:

- Bei bekannten und als Reinsubstanzen zugänglichen Transformationsprodukten kann eine Einzelstofftestung bzw. Stoffbewertung aus Literaturdaten durchgeführt werden (Stufe I). Als Beispiel sei die Bewertung von *N,N*-Dimethylnitrosamin

(NDMA), einem Transformationsprodukt des PSM-Metaboliten *N,N*-Dimethylsufamid (DMS) im Prozess der Ozonung angeführt. Aus den vorhandenen toxikologischen Daten zu diesem Stoff konnte ein GOW-Wert von 0,01 µg/L abgeleitet werden. Die Bewertung der Aufbereitungsstufe in Bezug auf das NDMA-Bildungspotenzial erfolgt hier über chemische Analytik.

- In vielen Fällen sind die gebildeten Transformationsprodukte von Wasserkontaminanten nicht in ihrer Zusammensetzung und in ihren Gehalten bekannt. Eine umfassende Aufklärung und Quantifizierung aller Transformationsprodukte ist in den meisten Fällen nicht möglich. Insofern kann die Bewertung der technischen Anlage nicht über Konzepte der Stufe I durchgeführt werden. Bei unbekanntem Substanzgemischen wird daher die toxikologische Testung der gesamten Wasserprobe empfohlen. Um Wirkschwellen zu erreichen, müssen über Dotierungen erhöhte Konzentrationen erzielt werden. Es ist dabei fallabhängig zu prüfen oder abzuschätzen, ob der Aufbereitungsprozess bei erhöhten Stoffgehalten noch die gleichen Transformationsprodukte in gleichen relativen Anteilen bildet. Mit den im PRiMaT-Projekt erarbeiteten Kombinationen aus Wasserbehandlung, optionaler Anreicherung und anschließender toxikologischer Testung liegt nun eine Methodik vor, die Bewertungen technischer Anlagen für Proben der Stufe II durchführen zu können.

## 4 Ökotoxikologische Testverfahren

### 4.1 Laborbasierte *In-vitro*- und *In-vivo*-Testsysteme

Ähnlich wie in der Humantoxikologie werden auch in der Ökotoxikologie laborbasierte und oft standardisierte Biotestverfahren eingesetzt, um **prospektiv** das mit der Präsenz von Chemikalien in der Umwelt verbundene Risiko zu bewerten. Hierzu existieren standardisierte Protokolle im Bereich von z. B. REACH, dem Arzneimittelgesetz oder dem Pflanzenschutzgesetz, nach denen die Ökotoxizität eingestuft wird. Die Testsubstanz wird dabei als Einzelstoff geprüft (entspricht Stufe I gemäß der im Kapitel 2 eingeführten Systematik). Grundlage der ökotoxikologischen Umweltrisikobewertung sind die Konzentrationen, bei denen in laborbasierten *In-vivo*-Tests Veränderungen bei den erfassten Parametern (sogenannte Endpunkte) im Vergleich zu einer unbelasteten Kontrolle auftreten. Als Effektkonzentrationen werden bei Akuttests mit einer maximalen Dauer von 96 h die  $LC_{50}$  (letale Konzentration für 50% der geprüften Individuen) oder die  $EC_{50}$  (Konzentration, bei der 50% der geprüften Individuen einen Effekt zeigen), bei chronischen Tests die NOEC (*no observed effect concentration* als höchste im Test eingesetzte Konzentration ohne signifikanter Abweichung von der unbelasteten Kontrolle) oder alternativ die  $EC_{10}$  (Konzentration, bei der 10% der geprüften Individuen einen Effekt zeigen) ermittelt. Zur Ableitung von sicheren Konzentrationen für die Umwelt (z.B. PNEC – *predicted no effect concentration* oder UQN – Umweltqualitätsnorm für Gewässer) werden die Effektkonzentrationen mit Sicherheitsfaktoren (*assessment factors*) verrechnet, die, abhängig von der Testdauer und dem Testdesign, zwischen 1000 und 10 variieren. Bei sogenannten Higher-tier-Tests, z.B. Mesokosmen als Modellökosysteme mit komplexen Lebensgemeinschaften, sind niedrigere Sicherheitsfaktoren üblich.

Die Ergebnisse aus *In-vitro*-Tests (Assays) werden bisher in der ökotoxikologischen Umweltrisikobewer-

tung grundsätzlich nicht für die Ableitung von sicheren Konzentrationen von Einzelstoffen für die Umwelt herangezogen. Sie spielen jedoch eine wichtige Rolle, wenn es darum geht, unerwünschte Stoffeigenschaften, wie beispielsweise bei den CMR-Stoffen (*carcinogenic, mutagenic and toxic to reproduction*), zu denen auch endokrine Disruptoren zählen, zu erfassen. Daneben ermöglichen sie eine zielgerichtete Auswahl von *In-vivo*-Tests, wenn zuvor mit *In-vitro*-Assays spezifische Wirkmechanismen ermittelt wurden. Dieses Vorgehen wird auch als *intelligent testing strategy* (ITS) bezeichnet.

Die **retrospektive Umweltbewertung** hebt sich von der humantoxikologischen Vorgehensweise ab. Hier werden komplexe Umweltmatrices, wie Abwasser, Oberflächenwasser oder Sedimente, die bereits stofflich belastet sind, auf der Basis der u.a. in Tabelle 1 gelisteten Biotests hinsichtlich des Gefährdungspotenzials bewertet, dem exponierte Organismen ausgesetzt sind. Die Ergebnisse der Biotests werden vergleichend relativ zu Positiv- bzw. Negativstandards, Positiv- bzw. Negativkontrollproben oder Referenzproben beurteilt. Neben der Bewertung von Einzelstoffen (Stufe I) können mit Hilfe der Biotests Substanzen bzw. Substanzgemische analysiert werden, die über einen Prozess generiert werden (Stufe II), z.B. Transformationsprodukte, die bei der Ozonung von Abwasser gebildet werden, und es ist eine Wirksamkeits- und Effizienzbewertung von Technologien möglich, wie beispielsweise die vergleichende ökotoxikologische Bewertung von weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren über die Untersuchung nativer Abwasserproben (Stufe III), wie sie im Rahmen der RiSKWa-Projekte Schussen-Aktivplus und TransRisk erfolgte (vgl. hierzu Kapitel 5).

Für die ökotoxikologische Bewertung weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren können sowohl die Ergebnisse von *In-vitro*- als auch von *In-vivo*-Tests herangezogen werden. Als Referenz zur Beurteilung der Effizienz des weitergehenden Verfahrens dient

typischerweise die konventionelle Abwasserbehandlung. Im Unterschied zu Untersuchungen der Stufe I können einzelne chronische *In-vivo*-Tests jedoch nicht uneingeschränkt für die Bewertung weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren eingesetzt werden, weil die Testspezies auch sensitiv auf Nährstoffe (Stickstoffverbindungen, Phosphor), erhöhte Salzgehalte und abfiltrierbare Schwebstoffe im Abwasser reagieren. Diese Reaktionen können die Auswirkungen von Mikroverunreinigungen überlagern, so dass ohne zusätzliche Untersuchungen nicht eindeutig zu klären ist, ob eine Beeinflussung der untersuchten Parameter (z.B. Biomasse, Wachstum und Fortpflanzung) auf die Elimination toxischer Substanzen bzw. Bildung potenziell toxischer Transformationsprodukte (TP) oder auf andere Eigenschaften des Abwassers (beispielsweise Nährstoffgehalt) zurückzuführen ist. Eine entsprechende Maskierung toxischer Wirkungen durch den Nährstoffgehalt des Abwassers kann beispielsweise im Wachstumshemmtest mit Algen und Wasserlinsen und im Reproduktionstest mit Daphnien auftreten.

Die Vorteile von *In-vitro*-Tests für die Abwasserbewertung bestehen darin, dass die Tests sensitiv, spezifisch für einen gegebenen Wirkmechanismus (MoA) sowie einfach und kostengünstig anzuwenden und damit für Routineuntersuchungen geeignet sind. Andererseits ist die ökologische Relevanz der Befunde von *In-vitro*-Tests eingeschränkt, da lediglich Wirkpotenziale, aber keine Effekte bei intakten Organismen erfasst werden. Zudem reduziert die hohe Spezifität der *In-vitro*-Tests die Möglichkeiten des Nachweises von TP, und es sind umfangreiche Testbatterien erforderlich, damit eine ausreichende Zahl relevanter Wirkmechanismen abgebildet werden kann.

### ***In-vitro*-Testsysteme**

In RiSKWa wurde ein breites Spektrum von ***In-vitro*-Assays** eingesetzt, mit deren Hilfe mutagene und gentoxische Aktivitäten, endokrine Wirkpotenziale, Di-

oxin-ähnliche Wirkungen und zytotoxische Aktivitäten abgebildet werden können:

- Zur Erfassung mutagener und gentoxischer Aktivitäten hat sich der Ames-Fluktuationstests gemäß ISO-Richtlinie 11350 bewährt, der einen größeren Probendurchsatz gegenüber der Plattenvariante gemäß OECD-Richtlinie 471 oder DIN 38415-4 ermöglicht. Neben den in der ISO-Richtlinie genannten Stämmen des Bakteriums *Salmonella typhimurium* sollte speziell für die Untersuchung ozonter Abwässer der Stamm YG7081 berücksichtigt werden, weil dieser sensitiv gegenüber alkylierenden Stoffen und Nitrosaminen reagiert, die während der Ozonung von Abwässern gebildet werden können. Zusätzlich oder als Alternativen zum Ames-Fluktuationstest können andere Gen-toxizitätsassays, wie der umu-Test (ISO-Richtlinie 13829), der Comet-Assay mit humanen Zelllinien (kein standardisiertes Verfahren) oder der Mikrokerntest mit Wirbeltier- oder Säugerzelllinien (OECD-Richtlinie 487, ISO-Richtlinie 21427-2) eingesetzt werden. Für alle genannten Tests ist eine Anreicherung der Proben notwendig, vorzugsweise über Festphasenextraktion (SPE, vgl. Kapitel 2).
- Unter den endokrinen Aktivitäten stand in der Vergangenheit die Erfassung rezeptorvermittelter östrogenen Wirkpotenziale über rekombinante Hefe-Reporterassays (z.B. YES, L-YES), Proliferationsassays (z.B. E-Screen) oder Reporterassays auf Basis von humanen Zelllinien (z.B. ER-Calux, MVLN-Assay) im Vordergrund. In RiSKWa wurden jedoch auch agonistische (rezeptoraktivierende) Aktivitäten an weiteren nukleären Rezeptoren, wie dem Androgenrezeptor, sowie antagonistische (rezeptorhemmende) Wirkpotenziale am Östrogenrezeptor  $\alpha$  und am Androgenrezeptor über Hefeassays (YAS, YAES, YAAS) und Reporterassays mit humanen Zelllinien (z.B. AR-Calux, MDA-kb2-Assay) erfasst. Nicht rezeptor-

torvermittelte (= funktionale) endokrine Aktivitäten lassen sich über eine Beeinflussung der Steroidbiosynthese ermitteln, wofür der Steroidogenese-Assay mit H295R-Zellen gemäß OECD-Richtlinie 456 zur Verfügung steht, der jedoch vorzugsweise für die Untersuchung von Einzelstoffen und nicht für komplexe Umweltproben eingesetzt wird. Für Zelllinien-basierte Testsysteme ist eine Anreicherung der Proben notwendig, während mit den Hefe-basierten Assays auch native Proben untersucht werden können. In diesen Fällen zeigte sich bei den RiSKWa-Untersuchungen, dass die anti-östrogene und anti-androgene Aktivität in angereicherten Umweltproben (Oberflächenwasser und Abwasser) in der Regel geringer als in den nativen Proben war, was darauf hindeutet, dass die gewählten SPE-Verfahren nur eingeschränkt in der Lage waren, die für die antagonistischen Aktivitäten verantwortlichen Stoffe anzureichern.

- Die Erfassung Dioxin-ähnlicher Wirkung erfolgte in RiSKWa mit Hilfe eines rekombinanten Hefe-Reportergenassays (YDS – *yeast dioxin screen*) und über die Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-Dealkylase (EROD) in Säuger-Zelllinien. Auch in diesem Fall müssen die Proben zuvor angereichert werden, um eine ausreichende Ansprechempfindlichkeit der Biotests zu gewährleisten, selbst wenn im Hefeassay eine Testung nativer Proben prinzipiell möglich ist.
- Zytotoxische Aktivitäten lassen sich mit Hilfe von Vitalitätstests mit Säuger- (z.B. GH3) oder anderen Wirbeltierzelllinien (z.B. RTL-W1) oder über die Hemmung der Biolumineszenz und des Wachstums bei Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*) gemäß ISO-Richtlinie 11348-3 (Microtox-Assay) erfassen. Für den Microtox-Assay hat sich im Rahmen der RiSKWa-Projekte besonders die für das 96-Well-Mikrotiterplattenformat entwickelte Variante von Escher et al. (2008) bewährt, die einen erhöhten

Probendurchsatz ermöglicht. Mit diesem Test lassen sich native und angereicherte Proben analysieren.

### **In-vivo-Testsysteme**

Neben *In-vitro*-Assays wurden in den RiSKWa-Projekten zahlreiche **In-vivo-Tests** mit Repräsentanten unterschiedlicher trophischer Ebenen (Primärproduzenten, Konsumenten erster und höherer Ordnung), unterschiedlicher Habitats (pelagisch, benthisch) und taxonomischer Gruppen (Bakterien, Algen, höhere Pflanzen, Wirbellose, Fische) aus Oberflächengewässern durchgeführt. Hierbei handelte es sich, mit Ausnahme des im Projekt Sichere Ruhr eingesetzten Wachstumshemmtest mit Zebrauscheln (*Dreissena polymorpha*), um standardisierte Verfahren auf der Basis internationaler Richtlinien, in denen die Durchführung der ökotoxikologischen Studien im Detail festgelegt wird.

Zumeist wurden die Biotests in den Projekten für die Testung von Einzelsubstanzen (Stufe I) oder von unterschiedlich behandelten Abwasserproben (Stufen II und III) bzw. von Sediment- und Wasserproben aus Oberflächengewässern im Labor eingesetzt. In den Projekten SchussenAktivplus und TransRisk wurden jedoch *In-vivo*-Biotests auch zur Testung von Oberflächenwasser und Abwässern direkt am Gewässer bzw. auf den Kläranlagen eingesetzt (*on site*), wobei das zu untersuchende (Ab-)Wasser kontinuierlich die Testgefäße mit den Organismen durchströmte. Der prinzipielle Vorteil einer Testung *on site* im Durchflusssystem ist, dass nicht nur punktuelle Belastungen des Abwassers erfasst, sondern insbesondere die Wirkung chronischer Schadstoffbelastungen und temporärer Konzentrationsschwankungen berücksichtigt und somit Veränderungen in der Zusammensetzung des Abwassers über den Zeitverlauf integriert werden können. Dagegen verändert sich die Zusammensetzung einer Abwasserprobe bei der Testung im Labor be-

reits nach kurzer Zeit, so dass häufige Erneuerungen des Testmediums erforderlich sind, um eine möglichst konstante Exposition gegenüber dem unveränderten Abwasser zu gewährleisten.

Folgende *In-vivo*-Tests wurden eingesetzt:

- Hemmung der Enzymaktivität beim Bakterium *Arthrobacter globiformis* über 1 h gemäß ISO-Richtlinie 18187. Dieser für die Testung von Feststoffen (Sediment, Boden und Abfälle) entwickelte Assay erfasst die Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität der Bakterien unter dem Einfluss von toxischen Substanzen über die Umsetzung des Redox-Farbstoffs Resazurin. Er wurde im Projekt TransRisk für die Untersuchung von Einzelstoffen eingesetzt (Virostatikum Aciclovir und zwei TP).
- Wachstumshemmtests mit Algen, z.B. mit den Grünalgen *Raphidocelis subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus*, wurden auf Basis der OECD-Richtlinie 201 in zahlreichen RiSKWa-Projekten für die Testung von Einzelstoffen und komplexen Umweltproben (Abwasser, Gülle-Eluate) eingesetzt. Als Endpunkte werden über einen Versuchsverlauf von 72 h die Wachstumsrate (*growth rate*) und der Biomassezuwachs (*yield*) ermittelt. Der Test eignet sich nicht für Untersuchungen im Durchfluss. Bei der Testung von Abwasserproben ist weiterhin zu beachten, dass bei erhöhten Gehalten an Pflanzennährstoffen hemmende Effekte anderer Abwasserkonstituenten, wie Mikroschadstoffe, auf das Algenwachstum maskiert werden können.
- Auch beim Wachstumshemmtest mit der Wasserlinse *Lemna spec.*, einem Vertreter der Blütenpflanzen, können die in Abwasserproben auftretenden Pflanzennährstoffe zu einer so starken Wachstumsförderung führen, dass die toxischen Wirkungen von Mikroschadstoffen teilweise oder vollständig kompensiert werden. Das Testverfahren gemäß OECD-Richtlinie 221 mit einer Testdauer von 7 d wurde unter anderem in den Projekten SchussenAktivplus, Sichere Ruhr und TransRisk für Abwasserproben und die kombinierte Testung von Sedimenten und Wasserproben aus Oberflächengewässern eingesetzt. Es eignet sich sowohl für (semi-)statische Expositionen als auch für Untersuchungen im Durchfluss und ermöglicht die integrative Erfassung von phytotoxischen Wirkungen.
- Tests mit Wasserflöhen (*Daphnia spec.*) wurden als Akuttests mit einer Dauer von 24 h bis 96 h gemäß OECD-Richtlinie 202 und als chronischer Reproduktionstest über 21 d gemäß OECD-Richtlinie 211 in den RiSKWa-Projekten ASKURIS, RiskA-GuA, RISK-IDENT, Sichere Ruhr und TransRisk für die Einzelstoffprüfung und die Testung komplexer Umweltproben (Abwasser, Gülle-Eluate) eingesetzt. Weil sich bereits für konventionell gereinigtes kommunales Abwasser in der Regel keine erhöhte Mortalität im akuten Daphnientest feststellen lässt, reicht die Sensitivität dieses Verfahrens für eine Bewertung der weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren zumeist nicht aus. Dagegen zeigte sich im chronischen Daphnientest (OECD-Richtlinie 211) eine oft stark erhöhte Fortpflanzungsrate in Proben aus der konventionellen Abwasserbehandlung im Vergleich zur Kontrolle im standardisierten Daphnienmedium. Diese signifikant erhöhte Fortpflanzungsleistung ist vermutlich auf ein Überangebot an Schwebstoffen und gelösten Partikeln zurückzuführen, die den sich filtrierend ernährenden Daphnien als zusätzliche Nahrungsquellen dienen. Vor allem nach Filtrationsschritten bei der weitergehenden Abwasserbehandlung (Sand- oder Aktivkohlefiltration) sank dagegen die Reproduktionsleistung als Folge der Elimination von Schwebstoffen und gelösten Partikeln ab, ohne dass die Werte für die Kontrolle im standardisierten Daphnienmedium unterschritten wurden. Diese

Befunde zeigen, dass in ähnlicher Weise, wie zuvor für die Algen- und *Lemna*-Tests dargestellt, die Befunde für den chronischen Daphnientest nicht nur durch toxische Wasserinhaltsstoffe beeinflusst werden, sondern ein erhöhtes Nahrungsangebot im Abwasser zu einer Maskierung toxischer Effekte führen kann. Der chronische Daphnientest kann als (semi-)statischer oder als Durchflusstest durchgeführt werden.

- Der Wachstums- und Reproduktionstest mit dem Glanzwurm *Lumbriculus variegatus* wurde gemäß der OECD-Richtlinie 225 über eine Versuchsdauer von 28 d in den Projekten SchussenAktivplus, Sichere Ruhr und TransRisk für die Testung von Abwässern und kombinierten Wasser- und Sedimentproben aus Oberflächengewässern eingesetzt. Als Endpunkte des Tests, der im statischen Design und im Durchflusssystem durchgeführt werden kann, werden die Zahl der Würmer und deren Biomasse erfasst und ausgewertet. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass *Lumbriculus* sensitiv auf TP reagiert, wie sie bei der Ozonung von Abwasser entstehen (Magdeburg et al. 2012; Stalter et al. 2010). Die Glanzwürmer reagieren allerdings auch empfindlich auf erhöhte Ammonium- und Nitritkonzentrationen in den Testmedien, so dass für die Interpretation der Ergebnisse eine parallele Erfassung dieser Parameter während des Versuchsverlaufs unabdingbar ist.
  - Der 28-tägige Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* wurde im April 2016 von der OECD als neue Richtlinie für die Chemikaliientestung verabschiedet. Er wurde in den RiSKWa-Projekten SchussenAktivplus, Sichere Ruhr, TOX-BOX und TransRisk für die Testung von Abwässern, (Roh-)Trinkwasser sowie von kombinierten Wasser- und Sedimentproben aus Oberflächengewässern eingesetzt. Als Endpunkt dient die Zahl der Embryonen in der Bruttasche
- der Schnecken, die bei einer Exposition gegenüber reproduktionstoxisch wirkenden Substanzen abnimmt, während östrogenartig wirkende Stoffe zu einer steigenden Embryonenzahl führen. Die Reaktion auf einen entsprechenden östrogenen Stimulus kann jedoch unterbleiben, wenn gleichzeitig (reproduktions-)toxische Stoffe in der zu untersuchenden Probe auftreten. Daher ist für eine Differenzierung der Reaktionen von *P. antipodarum* auf eine getestete Umweltprobe die parallele Erfassung endokriner Aktivitäten über *In-vitro*-Assays empfehlenswert. Auch dieser Test kann als (semi-)statischer oder als Durchflusstest durchgeführt werden.
- Im Projekt Sichere Ruhr wurde als nicht standardisiertes Verfahren ein Wachstumshemmtest mit der Zebrauschel *Dreissena polymorpha* zur Testung von Abwässern eingesetzt, mit dessen Hilfe negative Effekte auf das somatische Wachstum der Muscheln erfasst werden können. Aufgrund des geringen Standardisierungsgrads des Tests lassen sich derzeit keine belastbaren Aussagen über die Robustheit des Tests und eine mögliche Beeinflussung des Testergebnisses durch Randparameter bei der Abwassertestung machen.
  - Tests mit Fischen wurden in den RiSKWa-Projekten RISK-IDENT, SchussenAktivplus, Sichere Ruhr, TOX-BOX und TransRisk für die Testung von Einzelstoffen, Abwässern sowie von kombinierten Wasser- und Sedimentproben aus Oberflächengewässern mit statischem Design oder im Durchflusssystem eingesetzt. In allen genannten Projekten wurden Zebrabärblinge (*Danio rerio*) im Fischembryo-Akuttoxizitätstest (FET) über 96 h mit dem Endpunkt Mortalität gemäß OECD-Richtlinie 236 oder der Fish-Early-Life-Stage-Test (FELST) zur Erfassung von Entwicklungsanomalien gemäß OECD-Richtlinie 210 eingesetzt. Im Projekt SchussenAktivplus wurden zusätzlich Forellen für

den FET verwendet. Als typische Effekte einer Exposition gegenüber Abwasser- und anderen Umweltproben sowie gegenüber Einzelstoffen treten erhöhte Mortalitäten, Entwicklungsverzögerungen und teratogene Schäden (Missbildungen während der Embryonalentwicklung) auf. Zusätzlich zu den apikalen Endpunkten können in den Fischtests auch Biomarker, wie die Induktion von Vitellogenin auf Proteom- oder Transkriptomebene, erfasst werden. Da die Embryonen und Larven während ihrer Entwicklung besonders empfindlich auf Pathogene im Abwasser reagieren, sollten Abwasserproben vor der Testung im FET und FELST mikrofiltriert werden, um die Exposition gegenüber Bakterien und Pilzen zu reduzieren, die ansonsten ähnliche Effekte bei den Fischen wie toxische Substanzen in den Wasserproben verursachen können.

## 4.2 Biomarker

Quantifizierbare Änderungen suborganismischer Prozesse in Reaktion auf äußere Stressfaktoren, die *in vivo*, z.B. in Schadstoff-exponierten Biota auftreten, werden als „Biomarker“ bezeichnet. Je nach Definition schließt dies auch Verhaltensänderungen ein (van Gestel & van Brummelen, 1994). Biomarker zum Nachweis suborganismischer Effekte von Schadstoffexpositionen sind in zweierlei Hinsicht von besonderer Bedeutung:

1. Biomarker erlauben als Reaktionen von Organismen auf die in komplexen Umweltproben enthaltenen Schadstoffmischungen die Beurteilung der Aussagekraft und Relevanz der Befunde von *In-vitro*-Assays. So können beispielsweise über den Vergleich des Vitellogeningehalts im Blut exponierter Fische mit den über *In-vitro*-Assays (z.B. E-Screen oder den YES-Assay) ermittelten Konzentrationen an Östrogenäquivalenten (EEQ) in einer Wasserprobe kritische Werte für die Reaktionen der Organismen abgeleitet werden. In diesem Zu-

sammenhang kann auch gezeigt werden, inwiefern und in welcher Größenordnung die Anreicherung einer Umweltprobe für den entsprechenden Biotest vor dem Hintergrund der zu erwartenden Wirkung im Freilandorganismus gerechtfertigt ist. Korrespondierende Biotest-Biomarker-Paare sind Tabelle 1 zu entnehmen.

2. Um eine wirkungsbezogene und Vorsorge-orientierte Gütecharakterisierung von Wasserkörpern zu ermöglichen, wie sie die Europäische WRRL fordert, muss der Gesundheitszustand von in Gewässern abundanten Organismen bestimmt werden. Für diesen Zweck ist es essentiell, sowohl Biomarker, die spezifische Wirkmechanismen repräsentieren, als auch generelle Gesundheitsmarker, die z.B. die Integrität ganzer Organsysteme widerspiegeln, zu betrachten.

Da Biomarkeruntersuchungen künftig im o.g. Kontext von grundlegender Bedeutung sein werden, Standards für deren Durchführung bislang jedoch vielfach noch fehlen, wurden vom VDI zwei Richtlinien in Bearbeitung gegeben, die sich dieser Thematik bei Fischen widmen. Die bereits publizierte VDI-Richtlinie VDI 4230 Blatt 4 (2013) legt Standards für die Probenahme fest. Das zweite Papier, das bis Ende 2016 erscheinen wird (VDI 4230 Blatt 5 2016) widmet sich der Thematik „Fische als Wirkungsindikatoren“, wobei eine ausführliche Beschreibung aller in RiSKWa eingesetzten und in Tabelle 1 zusammengefassten Biomarker enthalten ist.

Generell können zwei Typen von Biomarkern unterschieden werden:

1. Biomarker für spezifische Wirkmechanismen, wie (a) die vermehrte Bildung von Mikrokernen im Erythrozyten von Fischen zum Nachweis genotoxischer Wirkungen, (b) die Hemmung der Acetyl-Cholinesterase im Gehirn zum Nachweis neurotoxischer

Tabelle 1: Korrespondierende Biotest-Biomarker-Paare

	Wirkmechanismus bzw. Wirkendpunkt	Biotests ( <i>In vitro</i> bzw. <i>In vivo</i> )	Biomarker-Untersuchung
<b>Toxische Wirkungen</b>	Gentoxizität	Ames-Test umu-Test Mikrokernstest (Zellkultur) P53-BLA	Mikrokernstests im Fischblut
	Neurotoxizität	AChE-Inhibitionsassay Rezeptorbindungsassays mit dem Acetylcholin- oder Noradrenalin-Rezeptor	Messung der AChE-Inhibition Gehirn
	Dioxinähnliche Toxizität	AhR-Calux Yeast Dioxin Screen (YDS)	CYP1A1-Messungen (EROD-Aktivität, PCR)
	Cytotoxizität, Entzündung	Neutralrottest mit RTL-W1-Zellen, GH3-Zellen nfKappaB-BLA Microtox-Test	Histo- und cytopathologische Untersuchungen
	Oxidativer Stress	ARE-c-32	Protektive Enzyme (Katalase, SOD), Lipidperoxide
	Proteotoxizität		Stressprotein HSP70
	Phytotoxizität	<i>Lemna</i> -Test Algentest Photosystem II-Inhibitionsassay	Messungen des Chlorophyllgehalts
	Entwicklungstoxizität	<i>Danio rerio</i> ELS-Test	FELST mit Forellen
	Verhalten	Daphnientest-Schwimmverhalten	Untersuchungen zum Schwimmverhalten
<b>Hormonartige Wirkungen</b>	Reproduktion	Reproduktionstests mit Daphnien, <i>Lumbriculus variegatus</i> , <i>Potamopyrgus antipodarum</i> und Fischen	Histopathologische Untersuchungen der Gonaden Gonadosomatischer Index Fertilität
	Östrogenität	YES E-Screen Reportergen-Assays (HeLa, MVLN etc., ER- bzw AR-basiert)	Messungen des Vitellogenin-gehalts (Aktivierung, Hemmung) Gnadenhistologie (Mischgonaden, Atresie) Gonadosomatischer Index Fertilität
	Anti-Östrogenität	YAES	Fertilität
	Androgenität	YAS	Geschlechterverhältnis
	Anti-Androgenität	YAAS	

Wirkungen, (c) die Induktion von CYP1A1 in der Leber als Indikator für dioxinähnliche Wirkungen bzw. aktivierte Biotransformationsaktivität, oder (d) Veränderungen in Gonaden bzw. die fehlerhafte Synthese von Vitellogenin zum Nachweis hormoneller Störungen.

2. Biomarker, die den generellen Gesundheits- bzw. Stresszustand von Organismen beschreiben. Zum Einsatz kommen in diesem Zusammenhang histologische bzw. zytologische Untersuchungen der Gewebe- und Zellintegrität (von z.B. Leber, Kieme oder Niere von Fischen) ebenso wie aus der Humanmedizin bekannte Biomarker, durch die die Aktivität verschiedener Stoffwechsellzyme oder Blutparameter überprüft werden. Auch oxidativer und proteintoxischer Stress, der vielerlei Ursachen haben kann, kann mittels entsprechender Biomarker (z.B. Stressproteine, Lipidperoxide) nachgewiesen werden. Wirkungen phytotoxischer Substanzen sind über Analysen des Chlorophyllgehalts oder von Photosynthese-Enzymen in Pflanzen nachweisbar.

## 5 Methodenübersicht in RiSKWa

### 5.1 Eingesetzte Methoden – Toxikologie

Im Rahmen des RiSKWa-Verbundprojekts TOX-BOX wurden hierarchische *In-vitro*-Teststrategien für die drei besonders relevanten Endpunkte Gentoxizität, Neurotoxizität und endokrine Wirkungen entwickelt und validiert. Sie ermöglichen eine bessere toxikologische Einstufung bisher nicht bewerteter anthropogener Spurenstoffe im Rahmen des theoretischen GOW-Konzeptes. Das detaillierte Vorgehen inklusive der verwendeten Methoden ist in Kapitel 3 „Toxikologische Testverfahren für die Trinkwasserbewertung“ ausführlich beschrieben.

Die Teststrategie besteht für den Endpunkt Gentoxizität aus dem Ames- oder dem umu-Test und dem Mikrokerntest (Mikroskopie oder Durchflusszytometrie). Für den Endpunkt Neurotoxizität wurde eine dreistufige Teststrategie entwickelt. Von der Überprüfung unspezifischer Toxizität mittels Nekrose- und Apoptosenachweisen über die neurotoxikologisch relevantere Gegenüberstellung der Toxizität auf Leber- und Nervenzellkulturen im RTCA hin zum Einsatz besonders komplexer und humanrelevanter *In-vitro*-Testsysteme, wie die Testung an primären humanen Astrozyten. Für den Endpunkt endokrine Wirkungen dienen Reporterassays wie der CALUX- oder der YES-Assay in Verbindung mit dem H295R-Steroidogenese-Assay zur toxikologischen Einstufung. Für alle Endpunkte wird die Testung auf sogenannte Vorläufermechanismen wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mitgeführt.

Im Rahmen des RiSKWa-Verbundprojekts PRiMaT wurden mit toxikologischen Testsystemen technische Prozesse der Trinkwasseraufbereitung untersucht. Im Projekt wurde der Fokus auf die Ozonung gelegt, da es bei dieser Technologie zur Reaktion mit Wasserinhaltsstoffen kommt, woraus oxidative Transformationsprodukte resultieren, die toxikologisch bedenklich sein können. Im Rahmen des Projekts wurden Ar-

beitsverfahren etabliert, die Aussagen zur Gentoxizität von dotierten Wasserproben vor und nach der Ozonung ermöglichen. Es war zu klären, ob es bei einer Reihe von aktuell diskutierten Wasserkontaminanten und Modellschubstanzen zu einer Zu- oder einer Abnahme von gentoxischen Effekten durch den Prozess der Ozonung kommt. Hierzu wurde in Laborversuchen Trinkwasser mit ausgewählten Verbindungen dotiert, ozont, angereichert und toxikologisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden eingesetzten Anreicherungsverfahren (SPE und Vakuumkonzentration) bei einem 50-fachen Anreicherungsfaktor kompatibel zu vier Gentox-Tests (Ames-Test, umuC-Test, Mikrokern-Test und Comet-Assay) und einem Zytotox-Test (V79) sind. Beide Anreicherungsverfahren wurden parallel durchgeführt, so dass ein breites Substanzspektrum erfasst werden konnte. Daneben wurden auch die nicht-angereicherten Proben in den toxikologischen Testsystemen untersucht, in denen alle gebildeten Transformationsprodukte enthalten waren. Als Blindprobe über das Gesamtverfahren wurde die ozonte Wassermatrix ohne Stoffdotierung eingesetzt. Zur Realisierung einer Positivkontrolle über das Gesamtverfahren wurde in die ozonte Wassermatrix eine angepasste Menge einer geeigneten testspezifischen Positivsubstanz dotiert, die über den Anreicherungsfaktor auf das nötige Konzentrationsniveau angehoben wurde, so dass die Wirkschwelle des Tests überschritten war. Für alle fünf untersuchten Testsysteme konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es zu keinen falsch-positiven Resultaten bei den Blindproben kam. Hieraus wird deutlich, dass die Anreicherungsverfahren mit ihren eingesetzten Materialien (Gefäße, Adsorber, Lösungsmittel) geeignet sind, um mit den Tests aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Im Rahmen des PRiMaT-Projekts konnten für alle Tests geeignete Positivsubstanzen identifiziert werden. Die Positivsubstanzen sind testspezifisch. Sie wurden mit einem Gehalt in die ozonte Wassermatrix dotiert, der nach dem zu erwartenden Anreicherungsfaktor einen typischen Messwert einer direkt dotierten Positivprobe ergibt. Die

Wiederfindungsraten der Positivsubstanzen beider Anreicherungsverfahren wurden über chemische Analytik bestimmt. Mit dieser Angabe und der Wirkung der direkten Dotierung in das Testmedium konnten Matrixeffekte durch die Wassermatrix erfasst werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Testung von Positivsubstanzen über das Gesamtverfahren in keinem Fall falsch-negative Ergebnisse erhalten wurden. Dies zeigt an, dass das verwendete Konzept für die Testung ozonter dotierter Wässer geeignet ist. Allerdings unterschied sich die Wirkschwelle zwischen direkter Dotierung und Anreicherung in einigen Testverfahren.

Die Versuche im PRiMaT-Projekt können der Stufe II zugeordnet werden, d.h. es liegt die Untersuchung eines technischen Prozesses vor, bei dem in einem Laborversuch mit dotiertem Testwasser Aussagen zur Zu- oder Abnahme gentoxischer Effekte aufgedeckt werden. Als Blindprobe kann nicht-dotiertes Testwasser vor oder nach der Ozonung verwendet werden. Zur Entscheidungsfindung des Versuchsdesigns war es im PRiMaT-Projekt zudem noch erforderlich, die weiteren Randbedingungen der Ozonung mit zu berücksichtigen. Beim Ozoneintrag gibt es Grenzen in der maximalen Dosis, weswegen auch die umsetzbare Stoffmenge nicht zu hoch liegen kann. Zudem wurde in den Versuchen dafür gesorgt, dass Ozon noch im stöchiometrischen Überschuss vorliegt, so dass noch eine Vergleichbarkeit mit den wasserwerkstypischen Bedingungen (z.B. 0,5 mg/L Ozondosis bei 1 µg/L Spurenstoffgehalt) vorhanden ist. Unter Berücksichtigung mehrerer Randbedingungen und der Auswertung von früheren Forschungsarbeiten wurden schließlich 5 mg/L Testsubstanz dotiert, die mit 10 mg/L Ozon umgesetzt wurden. Da diese Stoffgehalte wahrscheinlich noch nicht die Wirkschwellen der genutzten Testsysteme überschritten, wurden neben der direkten Untersuchung der ozonten Proben auch die beiden Anreicherungsverfahren (SPE und Vakuumkonzentration) eingesetzt. Über die 50-fache

Anreicherung können Gehalte an Transformationsprodukten im unteren Milligramm-pro-Liter-Bereich erzielt werden, was die Wirkschwellen in den Testsystemen überschreitet bzw. erreicht.

Die vom Ozonungsprozess vorgegebenen Randbedingungen und die hieraus bedingten Anreicherungsverfahren führen zu Unsicherheiten in der Interpretation der Ergebnisse, wie sie bei einer Einzelstofftestung (Stufe I) nicht auftreten. Es ist nicht klar, ob alle Transformationsprodukte über die Anreicherung erfasst werden und ob die Wirkschwellen der Tests erreicht werden. Nur beim Überschreiten der Wirkschwelle gewinnt der Test die nötige Aussagekraft, die Grundlage der toxikologischen Bewertung ist.

Aus den Erfahrungen zur toxikologischen Untersuchung ozonter Wässer, die mit bekannten Testsubstanzen dotiert waren, lassen sich folgende Anwendungsempfehlungen ableiten:

- Zur erfolgreichen Kopplung müssen die Randbedingungen aller verwendeten Methoden (Wasserbehandlungsverfahren, Anreicherung, Tox-Test) erfasst und aufeinander abgestimmt werden. Nur durch eine plausible Kette der Verfahrensschritte sind aussagekräftige Ergebnisse möglich.
- In vielen Fällen müssen Kompromisse bei der Kopplung mehrerer Verfahren akzeptiert werden (z.B. deutlich erhöhte Stoffgehalte im Prozess der Ozonung, Diskriminierung gewisser Substanzklassen bei Anreicherungsverfahren). Diese notwendigen Veränderungen müssen bei der Dokumentation der Methoden und der Ergebnisse klar benannt und bei der Diskussion der Resultate berücksichtigt werden.
- Blindproben der Matrix ohne Substanzdotierung und geeignete Positivsubstanzen (sowohl für das Anreicherungsverfahren als auch für den toxiko-

Tabelle 2: In den einzelnen RiSKWa-Projekten betrachtete Wirkendpunkte

Wirkmechanismus	ASKURIS	PRiMaT	RISK-IDENT	RiskAGuA	SAUBER+	SchussenAktivplus	TOX-BOX	TransRisk
<b>Toxische Wirkungen</b>								
Gentoxizität		●	●	●	●	●	●	●
Neurotoxizität	●					●	●	
Dioxinähnliche Toxizität/Biotransformation	●					●		●
Zytotoxizität, Gewebeintegrität, Entzündung			●			●	●	●
Proteotoxizität						●		
Phytotoxizität	●		●			●		●
Entwicklungstoxizität			●			●	●	●
Reproduktionstoxizität	●		●			●	●	●
Wachstum			●	●	●	●	●	●
Ökosystemintegrität						●		
Unspezifische Toxizität, Mortalität	●		●	●	●	●		●
<b>Hormonartige Wirkungen</b>								
Östrogenität						●	●	●
Anti-Östrogenität						●	●	●
Androgenität						●		●
Anti-Androgenität						●		●

logischen Endpunkt) sind mitzuführen. In einigen Fällen kann die typischerweise genutzte Positivsubstanz des Tox-Tests nicht über das Gesamtverfahren eingesetzt werden, so dass aus der Literatur alternative Substanzen gefunden werden müssen

## 5.2 Eingesetzte Methoden – Ökotoxikologie

Eine wirkungsbasierte Bewertung von Spurenstoffen (Stufe I) und/oder von mit Spurenstoffen belasteten Umweltmatrices (Stufen II und III) wurde vor allem in den drei RiSKWa-Projekten RISK-IDENT, SchussenAktivplus und TransRisk verfolgt. Einzelne Effektbezogene Aspekte wurden auch in den Projekten PRiMaT, ASKURIS, RiskAGuA und Sichere Ruhr betrachtet.

Die Projekte RISK-IDENT, SchussenAktivplus und TransRisk hatten eine wirkungsbasierte Erfolgskontrolle der Spurenstoffelimination durch verschiedene Abwasserreinigungstechnologien im Fokus.

Die in den drei Projekten eingesetzten Methoden sind in der Tabelle im Anhang zusammenfassend dargestellt. In dieser sind sowohl die durch die jeweiligen Tests abgedeckten Wirkendpunkte, ihre Einsatzbereiche (untersuchte Matrices und adressierte Schutzziele), die notwendige Probenvorbereitung, der Standardisierungsgrad der Tests, Bewertungskriterien sowie der gesetzliche Bezug gelistet.

In RISK-IDENT und TransRisk wurden Umweltproben im Labor mit Hilfe verschiedener *In-vitro*- und *In-vivo*-Biotestverfahren auf in den Proben vorhandene Wirkpotenziale hin untersucht. Hierbei standen gentoxische, zytotoxische, reproduktionstoxische und hormonelle Effekte im Vordergrund. Als *In-vitro*-Methoden kamen unter anderem bakterielle Testsysteme (gentoxische und zytotoxische Wirkungen), Hefe-basierte Tests (hormonelle und zytotoxische Wirkungen) sowie

Säugerzelllinien (gentoxische, zytotoxische und hormonelle Wirkungen) zum Einsatz. Als *In-vivo*-Verfahren wurden Wachstumshemmtests mit Algen und der Wasserlinse *Lemna spec.*, der akute und chronische Daphnientest, Reproduktionstests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* und dem Glanzwurm *Lumbriculus variegatus* sowie der Embryotest mit dem Zebraquärling eingesetzt.

Auch in SchussenAktivplus wurden ähnliche laborbasierten Verfahren benutzt, um die Effizienz verschiedener Abwassertechnologien (Pulveraktivkohle, Ozon mit Sand- oder Kohlefilter) für die Reduktion toxischer und hormoneller Wirkpotenziale im Abwasser zu überprüfen. In diesem Projekt wurden allerdings zusätzlich noch Untersuchungen zum Nachweis des Erfolgs einer großtechnischen Pulveraktivkohlestufe für das Ökosystem des Vorfluters Schussen durchgeführt. Hierzu wurden zusätzlich Proben von Oberflächenwasser und Sediment auf o.g. Wirkpotenziale hin untersucht. Um die direkten Auswirkungen der vierten Reinigungsstufe auf die Gewässerorganismen des betrachteten Vorfluters Schussen zu überprüfen, wurden Untersuchungen zum Gesundheitszustand von Fischen und Fischnährtieren durchgeführt. Als diagnostische Methoden kamen hierbei Biomarker zum Einsatz, die es erlauben, einerseits den generellen Gesundheitszustand von Organismen zu charakterisieren, aber darüber hinaus auch Rückschlüsse auf spezifische Belastungsfaktoren (z. B. gentoxische, dioxinähnliche oder östrogenartige Stoffe) ermöglichen.

Tabelle 2 zeigt, welche Wirkendpunkte in den verschiedenen RiSKWa-Projekten untersucht wurden.

In Tabelle 3 sind nochmals die wichtigsten Ergebnisse der wirkungsbasierten Untersuchungen zusammengefasst. Die detaillierten Resultate sind in den jeweiligen Abschlussberichten der Projekte aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der mit Wirkuntersuchungen in RiSKWa erzielten Ergebnisse

Projekt	Erzielte Ergebnisse
<b>PRiMaT</b>	Es wurde ein praktikables Testverfahren im Labormaßstab entwickelt, das Anreicherungsverfahren und Wirkungstest sinnvoll kombiniert. Bei der Ozonung ausgewählter Spurenstoffe wurde keine Bildung gentoxischer Transformationsprodukte nachgewiesen.
<b>RiskAGuA</b>	Das ökotoxikologische Potenzial nimmt über den Prozess der Fermentation ab.
<b>RISK-IDENT</b>	Anthropogene Spurenstoffe werden in üblichen Kläranlagen bei der biologischen Abwasserreinigung nicht vollständig abgebaut. Mittels standardisierter Wirkuntersuchungen (Algen-Wachstums-Hemmtest, Ames-Fluktuationstest und Daphnien-Reproduktionstest) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Restkonzentrationen als auch im Klärverlauf gebildete Transformationsprodukte ökotoxikologisch relevant sein können. Auch bei einem nicht toxischen Abwasser im Zulauf können Transformationsprodukte entstehen, die für Gewässerorganismen schädlich sind.
<b>SAUBER+</b>	<p>Unbehandeltes Rohabwasser aus zwei medizinischen Einrichtungen zeigte bis auf eine Hemmung der bakteriellen Lichtemission keine weiteren Anzeichen einer messbaren biologischen Schädwirkung. Diese im Rohabwasser beobachtete bakterientoxische Wirkung konnte in beiden Fällen bereits durch die Behandlung in einem Membranbioreaktor vollständig eliminiert werden. In den nachfolgenden Behandlungen mit granulierter Aktivkohle bzw. Ozon wurde keine Toxizität (Gentoxizität, Wachstumshemmung, Leuchthemmung) festgestellt.</p> <p>Eine deutliche Erhöhung der Toxizität (Bakterientoxizität und Gentoxizität) wurde dagegen nach der Behandlung eines der Abwässer mit UV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen. Diese Toxizität wurde auf das noch vorhandene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückgeführt und blieb bei weiteren Versuchsreihen aus.</p>
<b>SchussenAktivplus</b>	<p>Reduktion toxischer und hormoneller Wirkpotenziale im Abwasser durch Pulveraktivkohle, Ozon mit und ohne granulierter Aktivkohle und durch einen Retentionsbodenfilter um mehr als 80%.</p> <p>Positive Auswirkungen eines großtechnischen Pulveraktivkohlefilters auf die Fischgesundheit sowie auf Fischnährtiere nachweisbar.</p> <p>Plausible Zusammenhänge zwischen Ergebnissen aus chemischer Analytik, <i>In-vitro</i>-Tests und Biomarkerstudien.</p> <p>Nachweis der Relevanz von Antworten auf niedrigen biologischen Ebenen (Moleküle, Zellen) für ökosystemare Parameter (Lebensgemeinschaft des Makrozoobenthos).</p>

Projekt	Erzielte Ergebnisse
<b>TOX-BOX</b>	Erstellung eines Leitfadens zur Festschreibung von <i>In-vitro</i> -Teststrategien zur Erfassung von Gefährdungspotenzialen für die bewertungsrelevanten Endpunkte Gen- und Neurotoxizität und endokrine Wirkungen. Ableitung von gesundheitlichen Orientierungswerten.
<b>TransRisk</b>	<p>Entwicklung einer Probenaufbereitungsmethode für die <i>In-vitro</i>-Testung von Wasserproben.</p> <p>Untersuchung endokriner Wirkpotenziale in Zu- und Abläufen von Kläranlagen im Donauried: Elimination östrogenen und androgenen Aktivitäten <math>\geq 75\%</math> und anti-östrogenen Aktivitäten <math>\leq 60\%</math> gegenüber dem Zulauf. In einigen Grundwasserproben wurden anti-östrogene Aktivitäten detektiert.</p> <p>Reduktion toxischer und hormoneller Wirkpotenziale im Abwasser durch Ozon mit und ohne nachgeschalteten Filtersystemen; starke Zunahme mutagener und gentoxischer Wirkungen, die nicht durch einen nachfolgenden Biofilter, aber durch eine nachgeschaltete GAK-Filtration reduziert werden konnten.</p> <p>Entwicklung eines modularen Konzepts für die Effizienzbewertung weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren auf Basis chemisch-analytischer, ökotoxikologischer und mikrobiologischer Parameter.</p>

## 6 Literatur

DIN EN ISO 5667-16 (1999): Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren. Berlin: Beuth-Verlag.

Escher BI, Bramaz N, Mueller JF, Quayle P, Rutishauser S, Vermeirssen ELM (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. *J. Environ. Monit.* 10:612-621.

Happel O, Mertineit S, Brauch HJ, Wunderlich HG, Dölling E, Grummt T, Kramer M, Schmidt CK (2013). Entstehung, Vorhersage und Bewertung von Transformationsprodukten anthropogener Spurenstoffe bei der oxidativen Trinkwasseraufbereitung am Fallbeispiel PSM-Metabolite. Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser, Band 59. Karlsruhe. ISSN 1434-5765.

Magdeburg A, Stalter D, Oehlmann J (2012). Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species. *Chemosphere* 88:1008-1014.

Markle, PJ (2005). Toxicity identification evaluation. *Water Encyclopedia* 2:380-382. DOI: 10.1002/047147844X.wq675

OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Series on Testing and Assessment No. 23. Paris: Organization of Economic Co-operation and Development.

Prival MJ, Bell SJ, Mitchell VD, Peiperl MD, Vaughan VL (1984). Mutagenicity of benzidine and benzidine-congenor dyes and selected monoazo dyes in a modified *Salmonella* assay. *Mutat. Res.* 136:33-47.

Speth TF, Miltner RJ, Richardson SD, Simmons JE (2008). Integrated disinfection by-products mixtures research: Concentration by reverse osmosis membrane techniques of disinfection by-products from water disinfected by chlorination and ozonation/postchlorination. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71:1149-1164.

Stalter D, Magdeburg A, Oehlmann J (2010). Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an *in vivo* test battery. *Water Res.* 44:2610-2620.

Umweltbundesamt (2003). Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 46: 46 249-251

Van Gestel CA, Van Brummelen TC (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5(4):217-25.

VDI 4230 Blatt 4 (2013). Biologische Verfahren zur Erfassung von Umweltbelastungen (Bioindikation) - Passives Biomonitoring mit Fischen als Akkumulationsindikatoren – Probenahme. Berlin: Beuth-Verlag.

VDI 4230 Blatt 5 (2016). Biologische Verfahren zur Erfassung von Umweltbelastungen (Bioindikation). Fische als Wirkungsindikatoren. In Vorbereitung.

## Tabellarische Methodenübersicht unter 7 anwendungsbezogenen Aspekten

Die nachfolgende Übersicht gibt für den Anwender Hinweise, in welchem Bezug die einzelnen Testsysteme angewandt werden können. Die Zusammenstellung ist hilfreich, wenn entsprechende Maßnahmeoptionen festgelegt werden sollen, die wiederum wissenschaftlich ausreichend begründet und interpretiert werden müssen.

### (Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa- Verbund- projekt	Endpunkt	Standardisierungs- grad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
<b>ASKURIS</b>	Gentoxizität	Neuentwicklung		Qualitative Bewertung	Mensch	TrinkwV
	Acetylcholinesterase- Hemmung	ISO Richtlinie	DIN 38415 T 1	Qualitative Bewertung	Population/ Ökosystem	
	Aktivität der Glutathion- S-Transferase	Neuentwicklung		Qualitative Bewertung	Population/ Ökosystem	
	Lumineszenz	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 11348-1	LID	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Algenwachstumstest	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 15088	Qualitative Bewertung	Population/ Ökosystem	
	Reproduktion	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 10706	Qualitative Bewertung	Population/ Ökosystem	
<b>PRIMAT</b>	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 487 / ISO 21427	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	Publikation	Alkalischer Comet-Assay	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38415-3 und ISO 13829	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38415-3 und ISO 13830	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
<b>RiskAGuA</b>	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38412-33 und DIN EN ISO 8692 / Algen-Wachstumshemmtest	LID	Population/ Ökosystem	BBodSchG/V
	Immobilisation	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38412-30 und DIN EN ISO 6341 / Daphnien-Immobilisationstest	LID	Population/ Ökosystem	BBodSchG/V
	Lumineszenz	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 11348-1 / Lumineszenz-Hemmtest	LID	Population/ Ökosystem	BBodSchG/V
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38412-37 / Zellvermehrungshemmtest	LID	Population/ Ökosystem	BBodSchG/V
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 10712 / Zellvermehrungshemmtest	LID	Population/ Ökosystem	BBodSchG/V
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38415-3 und ISO 13829 / umu-Test	DLI	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350 / Ames-Fluktuationstest	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV

## (Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa- Verbund- projekt	Endpunkt	Standardisierungs- grad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
<b>RISK-IDENT</b>	Reproduktion	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 10706	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 8692	EC50/LC50/IC50 (akut)	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 8692	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 8692	LID	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Entwicklung	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 15088	EC50/LC50/IC50 (akut)	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Entwicklung	ISO/DIN-Richtlinie	DIN-EN-ISO 15088	LID	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	LID	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38415 T3	G-Wert		
	Endokrine Wirkung - (anti-)östrogen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	LID	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
<b>SAUBER+</b>	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 487	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Lumineszenz	Neuentwicklung	in Anlehnung an DIN EN ISO 11348-1	G-Wert	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Lumineszenz	Neuentwicklung	Publikation eingereicht (kintetischen Leuchtbakterien- hemmtest)	G-Wert	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Wachstum	Neuentwicklung	in Anlehnung an DIN 38412-37	G-Wert	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 487	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Lumineszenz	Neuentwicklung	in Anlehnung an DIN EN ISO 11348-1	EC50/LC50/IC50 (akut)	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Lumineszenz	Neuentwicklung	Publikation eingereicht (kintetischen Leuchtbakterien- hemmtest)	EC10 bzw. EC20 (chronisch)	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Wachstum	Neuentwicklung	in Anlehnung an DIN 38412-37	EC10 bzw. EC20 (chronisch)	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 487 / Mikronukleustest	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	TrinkwV
	Lumineszenz	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 11348-1 / Lumineszenz-Hemmtest	EC50/LC50/IC50 (akut)	Population/ Ökosystem	WHG (Oberflächen- wasserV, GrundwasserV)

(Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa-Verbundprojekt	Endpunkt	Standardisierungsgrad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
SAUBER+	Lumineszenz	Neuentwicklung	Publikation in Vorbereitung / Chronischer Lumineszenz-Hemmtest	EC10 bzw. EC20 (chronisch)	Population/Ökosystem	WHG (OberflächenwasserV, GrundwasserV)
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38412-37 / Zellvermehrungshemmtest	EC10 bzw. EC20 (chronisch)	Population/Ökosystem	WHG (OberflächenwasserV, GrundwasserV)

SchussenAktivplus	Reproduktion	OECD-Richtlinie	OECD 225	Ökologische Zustandsklasse	Population/Ökosystem	WRRL
	Phytotoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 221	Ökologische Zustandsklasse	Population/Ökosystem	WRRL
	Dioxinähnl. Wirkung	Publikation	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Dioxinähnl. Wirkung	Standardarbeitsanweisung (SOP)		Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Zytoxizität	Publikation	Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J. (2011): Water Res. 45, 1015-1024.	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 13829	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	Standardarbeitsanweisung (SOP)		Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)androgen	Standardarbeitsanweisung (SOP)		Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)androgen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/Ökosystem	WRRL
	Entwicklung	ISO/DIN-Richtlinie	DIN 38415-T 6, OECD 210	% Abweichung von Kontrolle	Population/Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	Richtlinienentwurf	OECD 242	Ökologische Zustandsklasse	Population/Ökosystem	WRRL
	Biomarker – Proteotoxizität – Stressproteine	Richtlinienentwurf	Biomarker Westernblot	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/Ökosystem	WRRL
	Entgiftungsenzyme	ISO/DIN-Richtlinie	Biomarker-Photometrie	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/Ökosystem	WRRL
	Histologie/H istopathologie	Richtlinienentwurf	Biomarker-Mikroskopie	Bewertungsfaktor	Population/Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	Richtlinienentwurf	Biomarker-Mikroskopie	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	ISO/DIN-Richtlinie	Biomarker-ELISA		Population/Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – andere	Publikation	Biomarker-Mikroskopie		Population/Ökosystem	WRRL

## (Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa- Verbund- projekt	Endpunkt	Standardisierungs- grad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
<b>Schussen- Aktivplus</b>	Neurotoxizität	Richtlinienentwurf	Biomarker-Photometrie	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Entwicklung	Publikation	Biomarker-Mikroskopie		Population/ Ökosystem	WRRL
	Biozönose	andere Richtlinie	ASTERICS/PERLODES- Verfahren	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
<b>Sichere Ruhr</b>	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	Ames-Test, ISO 11350, DIN 38415-4	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	WRRL
	Gentoxizität	Publikation	Comet-Assay, in Anlehnung an DIN EN 13784; Publikation: Singh et al. (1988): Exp. Cell Res., 175, 184-191	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	Standardarbeits- anweisung (SOP)	ER-Calux-Assay Fa. BioDetection Systems, NL	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	WRRL
	Zytoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	MTT-Test, DIN EN ISO 10993-5	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Zytoxizität	Standardarbeits- anweisung (SOP)	Multi-Tox-Test, Fa. Xenometrix, CH	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	OECD 221, ISO 20079		Population/ Ökosystem	WRRL
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 8692 (2005)	G-Wert	Population/ Ökosystem	WRRL
	Wachstum	Richtlinienentwurf	DIN AK 5.1 „Bioteste“ , ISO/WD Algal test - Microplate	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 6341	G-Wert	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 10706 (2000)	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Entwicklung	ISO/DIN-Richtlinie	DIN EN ISO 15088 (2009)	G-Wert	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	OECD-Richtlinie	OECD 225	Ökologische Zustands- klasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	Richtlinienentwurf	Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehl- mann, U., Oehlmann, J. (2007): Ecotoxicology 16(1), 169-182.	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Wachstum	Publikation	Stalter, D., Magdeburg, A., Oehlmann, J. (2010): Water Research 44(8), 2610-2620.	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 471	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität		Comet-Assay, in Anlehnung an DIN EN 13784; Publikation: Singh et al. (1988): Exp. Cell Res., 175, 184-191			
<b>TOX-BOX</b>	Entwicklung	OECD-Richtlinie	OECD 236	EC50/LC50/IC50 (akut)	Population/ Ökosystem	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewert- baren Stoffen im Bezug zur TrinkwV

(Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa-Verbundprojekt	Endpunkt	Standardisierungsgrad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
TOX-BOX	Gentoxizität	Neuentwicklung	Gündel et al. (2012): Ecotoxicology and Environmental Safety 76: 11-22	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Neurotoxizität: Neuromasten	Publikation	Stengel, D., Zindler, F., Braunbeck, T. (2016): Comp. Biochem. Physiol. 193C: 18-29.	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	
	Neurotoxizität: Retina	Publikation	Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I., Harris, W.A. (2005): J Cell Biol 171: 991-999	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	
	Neurotoxizität: oflakitorisches System	Publikation	Blechinger, S.R., Kusch, R.C., Haugo, K., Matz, C., Chivers, D.P., Krone, P.H. (2007): Toxicol Appl Pharmacol 224: 72-80.	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	
	Neurotoxizität: Acetylcholinesterase	Publikation	Kais, B., Stengel, D., Batel, A., Braunbeck, T. (2015): Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 16329-16339.	Qualitative Bewertung („positiv“)	Population/ Ökosystem	
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 487 / ISO 21427	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 476 / RL 440/200/B.17	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Gentoxizität	OECD-Richtlinie	OECD 471 / RL 440/200/B.14	Qualitative Bewertung („positiv“)	Mensch	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Endokrine Wirkung - (anti-)östroge	Richtlinienentwurf	SOP nach BDS Amsterdam	Toxizitätsäquivalente	Mensch	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Endokrine Wirkung - andere	OECD-Richtlinie	OECD 456	Bewertungsfaktor	Mensch	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Reproduktion	Publikation	Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J. (2007): Ecotoxicology 16(1), 169-182.	NOEC/LOEC (chronisch)	Population/ Ökosystem	Empfehlung des UBA zur Bewertung von nicht bewertbaren Stoffen im Bezug zur TrinkwV
	Gentoxizität	Neuentwicklung	Kinetik DNA-schadeninduzierter Lumineszenz	Bewertungsfaktor	Mensch	
	Wachstum	Publikation	Kinetik Absorbtion		Population/ Ökosystem	
	Zytotoxizität		Kinetik Absorbtion und GFP Fluoreszenz			

## (Öko-)toxikologische Methodenübersicht

RiSKWa- Verbund- projekt	Endpunkt	Standardisierungs- grad	Methode	Bewertungskriterium	Schutzziel	Gesetzlicher Bezug / Referenz
<b>TOX-BOX</b>	Zytotoxizität	kommerzielle An- wendung	Widerstandsmessung von Zellenpopulationen mittels Roche RTCA	Bewertungsfaktor	Mensch	
	Zytotoxizität	Publikation	Messung reaktiver Sauerstoff- species (ROS)	Bewertungsfaktor	Mensch	
	Neurotoxizität	Publikation	mikroskopische Auswertung der Zelldifferenzierung	Qualitative Bewertung (Veränderung, ja/nein)	Mensch	
	Gentoxizität	Publikation	Hellweg et al. (2003): J. Biomo- lec. Screen. 8:511-521.	EC50/LC50/IC50 (akut)	Mensch	REACH bzw. ChemG
	Zytoxizität	Publikation	Hellweg et al. (2007): Acta Astron. 60:525-533.	EC50/LC50/IC50 (akut)	Mensch	REACH bzw. ChemG

<b>TransRisk</b>	Dioxinähn. Wirkung	Publikation	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung – (anti-)östrogen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Endokrine Wirkung – (anti-)androgen	Richtlinienentwurf	Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Environ. Toxicol. Chem. 15 (3): 241-248.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Endokrine Wirkung – andere	Publikation	Inoue et al. (2009): Bull Environ Contam Toxicol 82:399-404.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Endokrine Wirkung - andere	Publikation	Inoue et al. (2009): Bull Environ Contam Toxicol 82:399-404.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 11350	Toxizitätsäquivalente	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 13829	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 13829	Toxizitätsäquivalente	Mensch	TrinkwV
	Gentoxizität	ISO/DIN-Richtlinie	ISO 13829	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	OECD-Richtlinie	OECD 225	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	OECD-Richtlinie	OECD 211	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Reproduktion	OECD-Richtlinie	OECD 242	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Resistenz - andere	Neuentwicklung	zu entwickeln	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Resistenz - andere	Neuentwicklung	zu entwickeln	EC10 bzw. EC20 (chronisch)	Population/ Ökosystem	REACH bzw. ChemG
	Wachstum	ISO/DIN-Richtlinie	OECD 221, ISO 20079	Ökologische Zustandsklasse	Population/ Ökosystem	WRRL
	Zytoxizität	Publikation	Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J. (2011): Water Res. 45, 1015-1024.	Toxizitätsäquivalente	Mensch	TrinkwV
	Zytoxizität	Publikation	Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J. (2011): Water Res. 45, 1015-1024.	Toxizitätsäquivalente	Population/ Ökosystem	WRRL

## IMPRESSUM

### Herausgeber:



DECHEMA e.V.  
Theodor-Heuss-Allee 25  
60486 Frankfurt am Main

### Ansprechpartner für die BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ RiSKWa:

Beim BMBF:  
Dr. Christian Alecke  
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
Referat 724 - Ressourcen und Nachhaltigkeit  
Heinemannstraße 2  
53175 Bonn  
Tel.: +49 (0)228 9957-3890  
Fax: +49 (0)228 9957-83890  
E-Mail: christian.alecke@bmbf.bund.de

Beim Projektträger:  
Dr. Verena Höcke  
Projektträger Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie  
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1  
76344 Eggenstein-Leopoldshafen  
Tel.: +49 (0)721 608-24932  
Fax: +49 (0)721 608-924932  
E-Mail: verena.hoecke@kit.edu

### Editor:

Wissenschaftliches Begleitvorhaben der BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ (RiSKWa)

Verantwortlich im Sinne des Presserecht:

Dr. Thomas Track  
DECHEMA e.V.  
Tel.: +49 (0)69 7564-427  
Fax: +49 (0)69 7564-117  
E-Mail: track@dechema.de

Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
Förderkennzeichen: 02WRS1271

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren des Leitfadens.  
Der Leitfaden ist nicht für den gewerblichen Vertrieb bestimmt.

Erschienen im Juni 2017

