# Bewertung von Spurenstoffen im Trinkwasser, die nicht unter die TrinkwV fallen

## (GOW-Konzept, Tox-Box Projekt)

*Tamara Grummt & Thomas Braunbeck*

Umwelt Bundesamt

Umweltbundesamt, Heinrich-Heine-Straße 12, D-08645 Bad Elster

Aquatische Ökologie & Toxikologie, Univ. Heidelberg, INF 504, D-69120 Heidelberg

# Wasser als wertvolles Gut

| Reservoir | Volumen (Mio. km³) | Anteil (%) | Erneuerung (a) |
|---|---|---|---|
| Gesamtmenge | 1386 | 100 | |
| Ozeane | 1350 | 97,3 | 3000 |
| Gletscher (v.a. Polkappen) | 29 | 2.1 * | |
| Aquifere (Grundwasser) [1] | 8 | 0.6 | 330 [4] - 5000 [5] |
| Seen | 0,28 | - | 3 |
| Flüsse | 0.01 | - | 0.031 |
| Bodenfeuchte [2] | 0.1 | - | 1 |
| Atmosphäre | 0.013 ** | - | 0.027 |
| **Süßwasser total** | **28 - 38 [3]** | **2.0 - 2.7 [3]** | |
| Biosphäre | 0,001 | - | |

1 Nutzung für Landwirtschaft >> Grundwassererneuerung; nach anderen Quellen: 23 Mio. km³ + 2 Mio. km³ Antarktika).
2 66 % der Kontinente sind als humid eingestuft.
3 Abhängig von Quelle
4 Für oberflächennahes Grundwasser.
5 Für tiefes Grundwasser (nicht in Wasserkreislauf eingeschlossen).
* Komplettes Abschmelzen würde mit einem Anstieg des Meeresspiegels um 68 m einhergehen.
** Mittlerer globaler Niederschlag: 1020 mm/a (520 000 km³) → Erneuerung alle 9.1 Tage (40 x Ersatz/a).

# Bereitstellung von Wasser – die Herausforderung für die Menschheit

Th. Braunbeck, Aquatische Ökologie & Toxikologie, Univ. Heidelberg

FONA Nachhaltiges Wassermanagement BMBF
Bundesministerium für Bildung und Forschung

# Wasser als wertvolles, aber gefährdetes Gut

Verbundprojekt TOX-BOX:

# Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung

Koordination: Dr. Tamara Grummt,

Umweltbundesamt Bad Elster

# Anthropogene Spurenstoffe

Chemische Analytik!

Toxikologische Sicherheit?

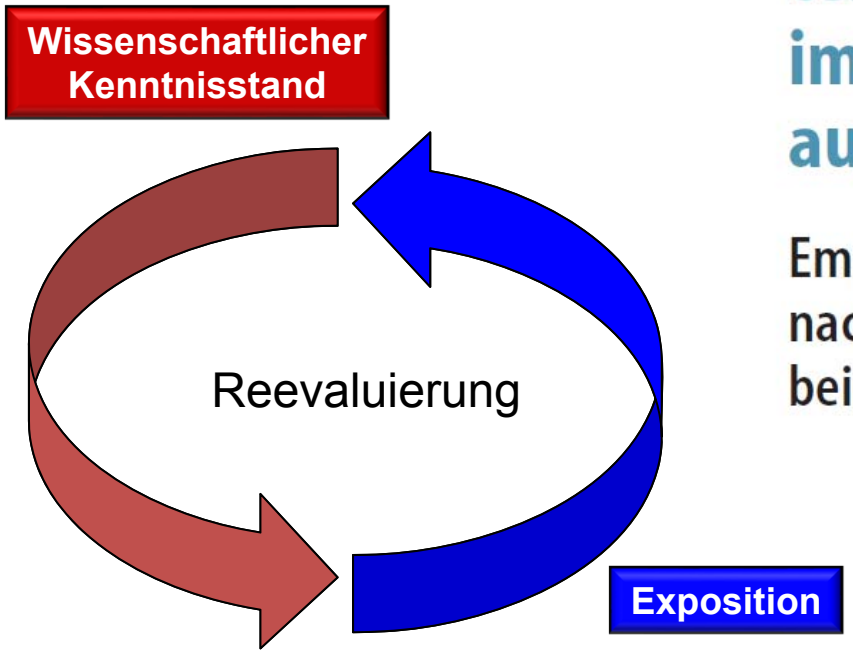
# Der Gesundheitliche Orientierungswert – das “GOW-Konzept”

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

**Empfehlung des Umweltbundesamtes**

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

Empfehlung des Umweltbundesamtes
nach Anhörung der Trinkwas
beim Umweltbund




+ Paradigmenwechsel in der Toxikologie: *in vitro*!

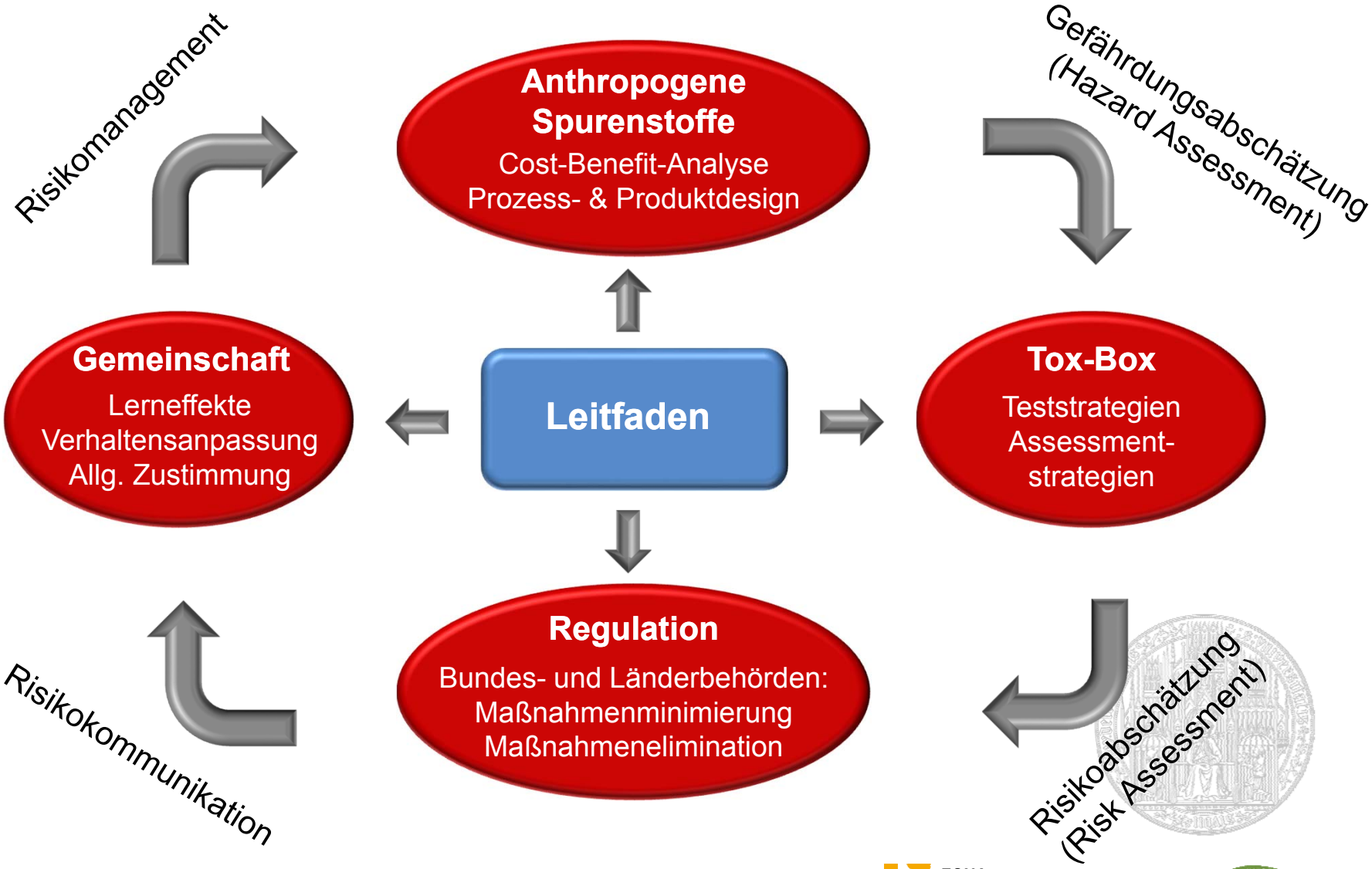
# Das Konzept des Gesundheitlichen Orientierungswerts (GOW)

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gentoxisch + metabolisch für den Menschen relevant?** | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Gentoxisch? | | Ja / keine Daten | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Immun- und/oder neurotoxisch? | | | Ja / keine Daten | Nein | Nein | Nein |
| Subchronische Toxizität? | | | | Ja / keine Daten | Nein | Nein |
| Chronische Toxizität? | | | | | Ja / keine Daten | Nein |
| Gesundheitlicher Orientierungswert (GOW; µg/L) | ≤ 0.01 µg/L ($GOW_0$) | 0.1 µg/L ($GOW_1$) | 0.3 µg/L ($GOW_3$) | 1.0 µg/L ($GOW_4$) | 3.0 µg/L ($GOW_5$) | > 3,0 µg/L |

**Besorgnisbereich**

**Vorsorgebereich**

# Die holistische Herangehensweise von Tox-Box an das GOW-Konzept

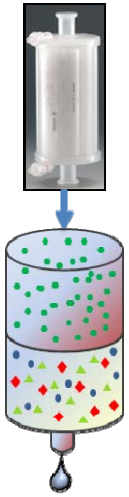


## Modul: Endokrine Effekte

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

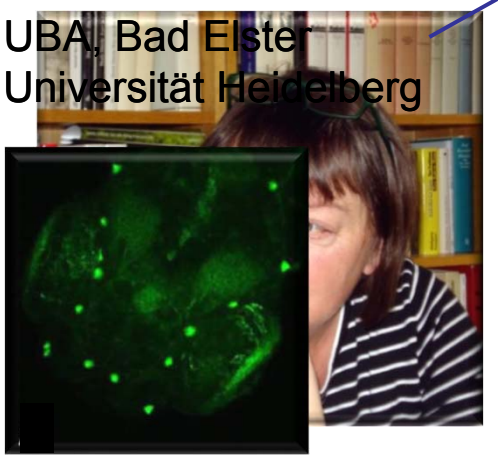
## Modul: Exposition

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



## Modul: Neurotoxizität

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

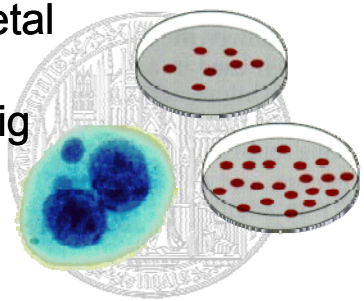


## Koordination

UBA, Bad Elster

## Modul: Gentoxizität

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



# Ziele des Tox-Box Projekts

(1) Auswahl der Testverfahren auf der Basis der umfangreichen Stoffprüfung für die einzelnen bewertungsrelevanten Endpunkte:

- Gentoxizität
- Neurotoxizität
- Endokrine Effekte

(2) Festschreibung der Testprotokolle und Festlegung der Bewertungskriterien

(3) Leitfaden zur hierarchischen Stoffbewertung und Festschreibung der Handlungsoptionen auf regulativer Ebene

# Die Tox-Box Substanzliste

1,1,1,2-Tetrachlorethan
1,2-Dibrom-3-chlorpropan
17α-Ethinylestradiol (EE2)
1-Acetyl-1-methyl-2-dimethyl-oxamoyl-2-phenyl-hydrazid (AMDOPH)
2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol (TMDD)
2,4-Dichlorphenol
2,4-Dinitrotoluol
2,6-Dichlorbenzamid
2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-f]chinolin
2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol
3,3-Dichlorbenzidin
3,4-Dichloranilin
4-Amino-3,3-dichlor-dinitrobiphenyl

Acesulfam
Aclonifen
Acridin
Amidotrizoesäure
AMPA
Atrazin
Benzo[a]pyren
Benzotriazol
Beta-Sitosterol
Bifenox
Bis(2-methoxyethyl)ether (Diglyme)
Bisphenol A
Bromierte Diphenylether
Carbamazepin
Carbamazepin-Epoxid
Carbendazim

Chloralkane, C 10-13
Citalopram
Coffein
Cyclophosphamid
Cypermethrin
Dichlorvos
Diclofenac
Dicofol
Diethylamin
Heptachlor-epoxid
Hexabromcyclo-dodecan
Hexachlorbenzol
Hexachlorbutadien
Iopamidol
Linuron
N-Nitrosodimethylamin
N-Nitrosomorpholin (NMOR)

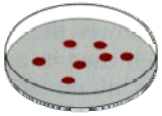
Nonylphenol
Perfluoroctansulfonat (PFOS)
Perfluoroktansäure (PFOA)
Phosphorsäure-tris-(2-chlorpropyl)-ester TCPP
Quinoxyfen
Resorcinol
Sotalol
Sulfamethoxazol
Sulfolan
Tertbutryn
TOSU
Tributylzinnoxid (TBTO)
Triphenylphosphin-oxid
Venlafaxin

# Das Tox-Box-Modul Gentoxizität

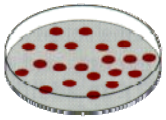
## *In vitro*-Kurzzeittests

### Bakterielle Tests

Ames I

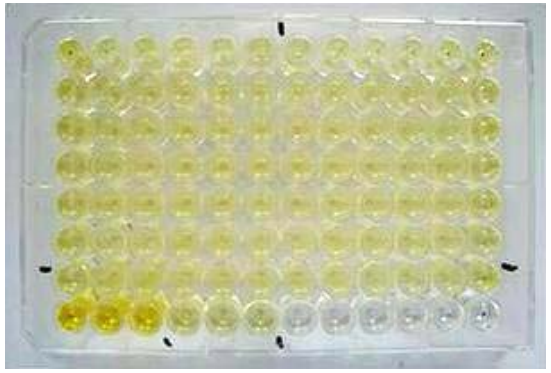


Kontrolle



Gentoxisch

umu-Test



### Cytotoxizitätstests

Plating efficiency

Apoptose

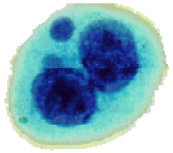
Neutralrottest

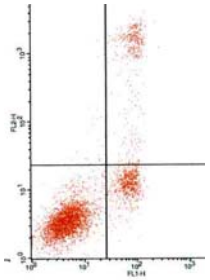
P53-Induktion

Reaktive Sauerstoff-spezies (ROS)

### Zellkulturtests

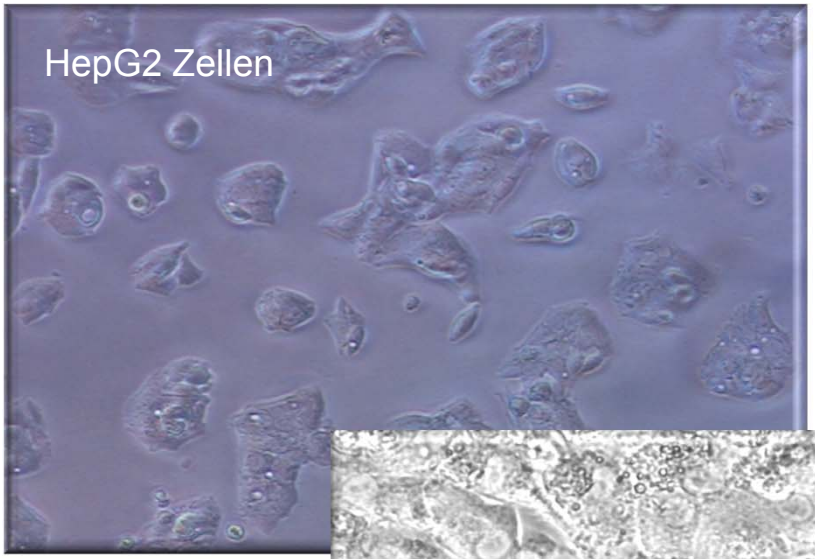
Mikrokerntest

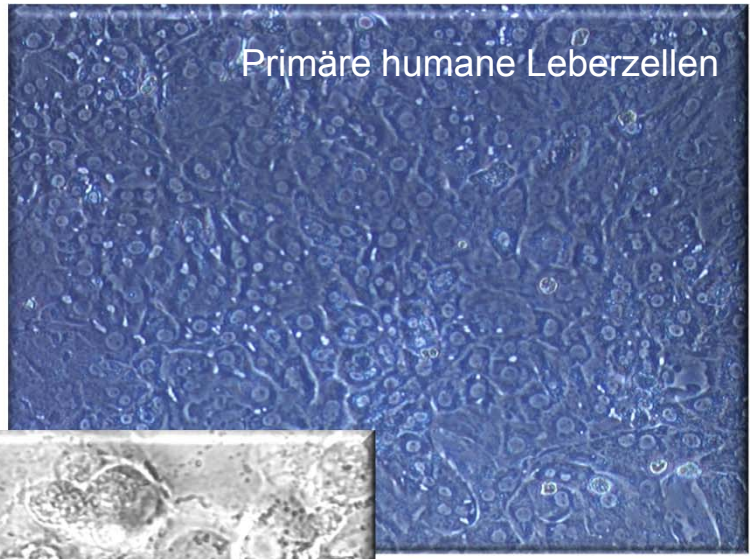


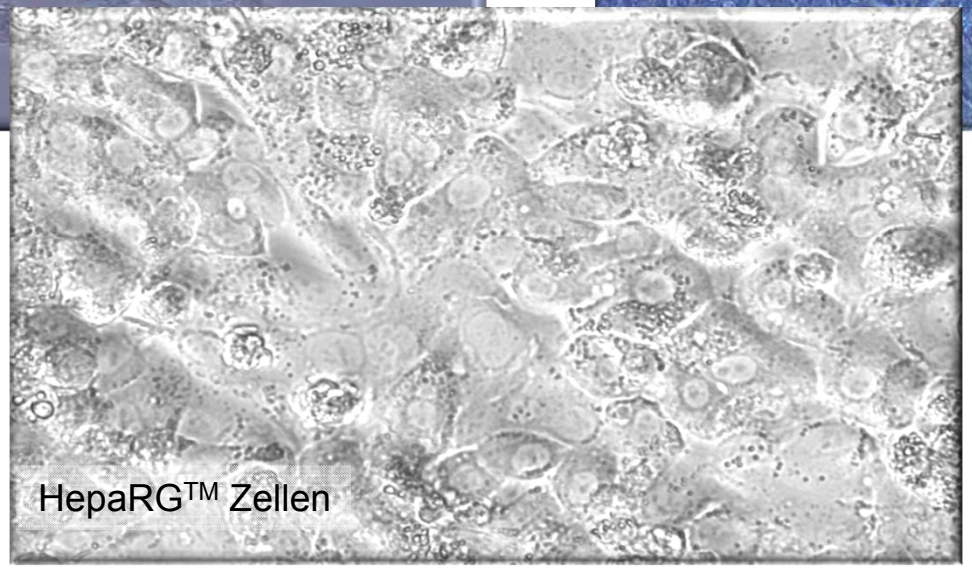


FACS

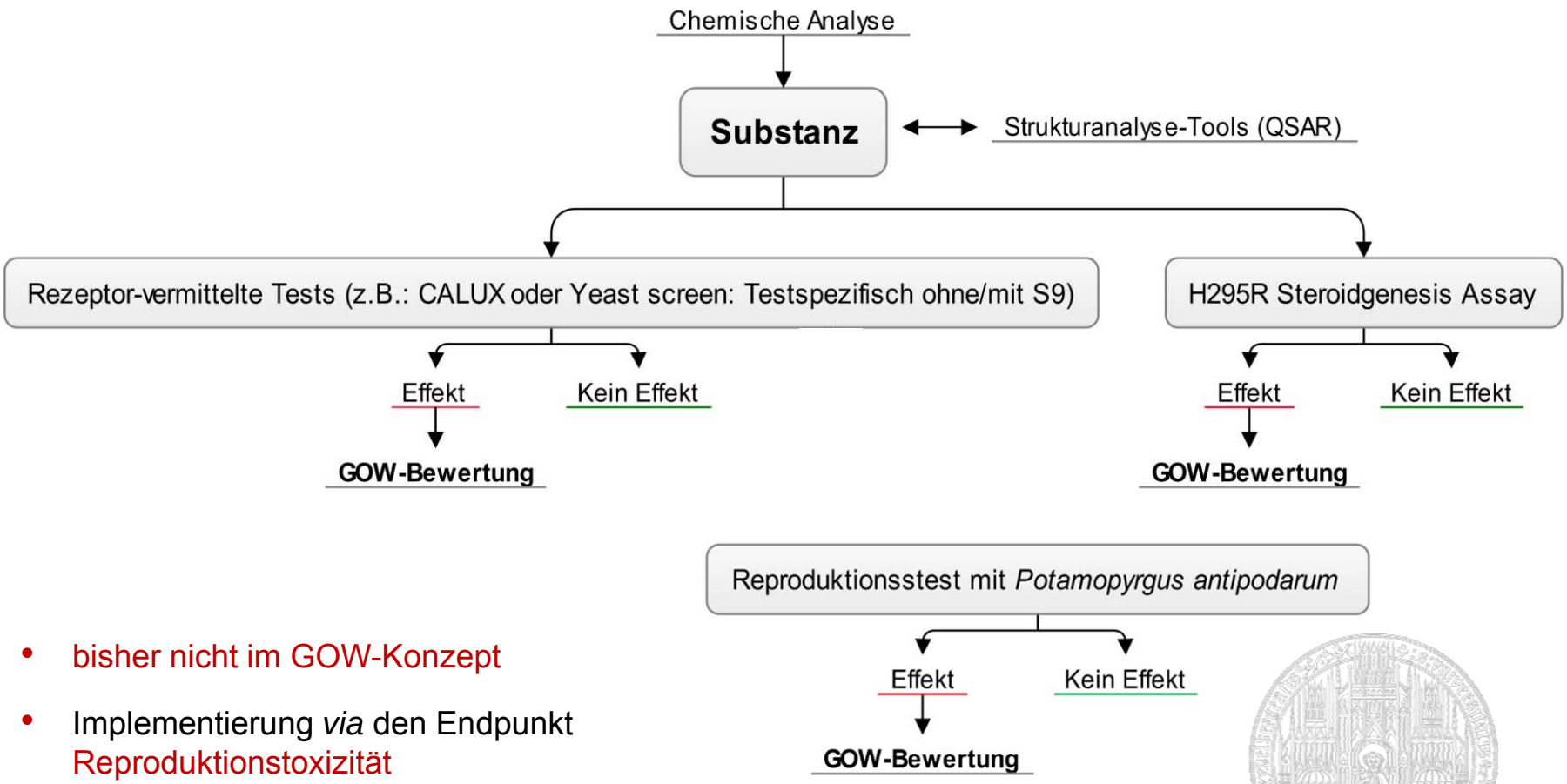
# Gentoxizität: Einbeziehung des humanrelevanten Metabolismus



# Das Tox-Box-Modul Endokrine Disruption




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

# Neurotoxizität im GOW-Konzept

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gentoxisch + metabolisch für den Menschen relevant?** | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Gentoxisch? | | Ja / keine Daten | Nein | Nein | Nein | Nein |
| Immun- und/oder **neurotoxisch**? | | | **Ja / keine Daten** | Nein | Nein | Nein |
| Subchronische Toxizität? | | | | Ja / keine Daten | Nein | Nein |
| Chronische Toxizität? | | | | | Ja / keine Daten | Nein |
| Gesundheitlicher Orientierungswert (GOW; µg/L) | ≤ 0.01 µg/L ($GOW_0$) | 0.1 µg/L ($GOW_1$) | **0.3 µg/L ($GOW_3$)** | 1.0 µg/L ($GOW_4$) | 3.0 µg/L ($GOW_5$) | > 3,0 µg/L |

**Besorgnisbereich**

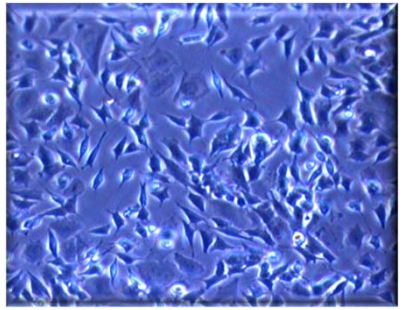
**Vorsorgebereich**

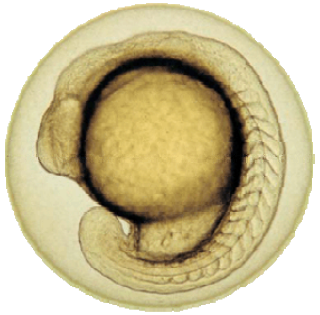
# Das Tox-Box-Modul Neurotoxizität

**Erfassung neurotoxischer Effekte**

↓ Erfassung von Neurotoxizität *in vitro*

↓ Erfassung von Neurotoxizität *in vivo*





Umweltbundesamt
Bad Elster

Universität
Heidelberg

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

**Exposition**
gegenüber trinkwasserrelevanten Substanzen

↓

**Level 1: Unspezifische Effekte** (**Zytotox.:** Nekrose/Apoptose/ROS/Glutathion)

↓

Zellsuspensionen / Blut

↓

**Level 2: Spezifisch neurotoxische Effekte *in vitro***

↓

Zielzellen: Nervensystem | Zum Vergleich: Leberzellen

↓

Identische Effekte in Zellen des Nervensystems und Leberzellen

→ **Keine Neurotoxizität**

Starke Effekte auf die neuronalen Zielzellen, aber geringe Effekte in Leberzellen

→ **Verdacht auf Neurotoxizität**

**Verlgeich**

↓

**Level 3: Bestätigung der Neurotoxizität über hochspezifische *In vitro*-Tests**

↓

**Bewertung des Potentials neurotoxischer Effekte im Rahmen des GOW-Konzepts**

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

**Jurkat:**
Humane T-Lymphocyten

**U 937:**
Hystiocyt. Lymphomazellen

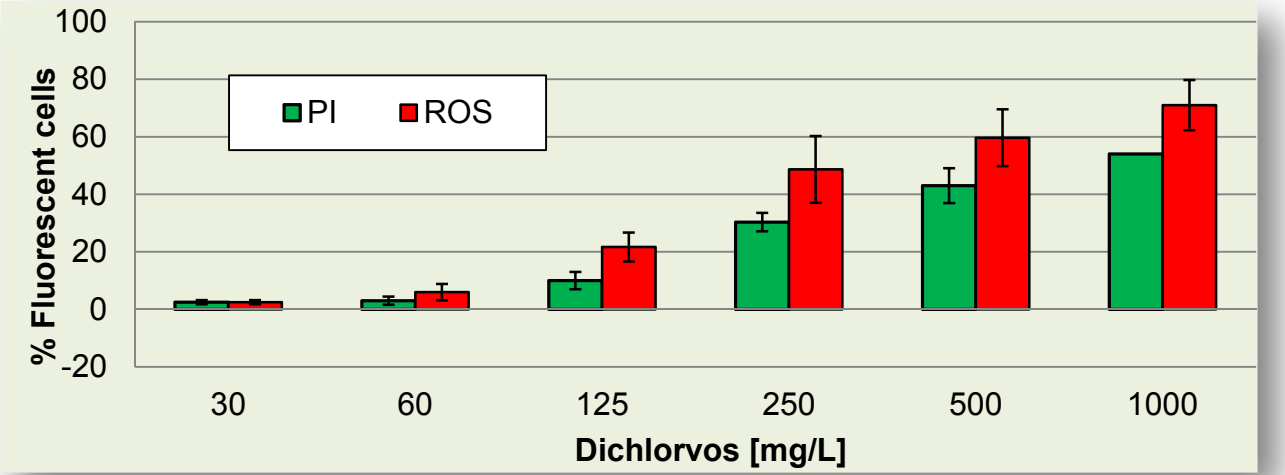
**Oxidativer Stress (ROS)** → große Bedeutung für Nervenzellen

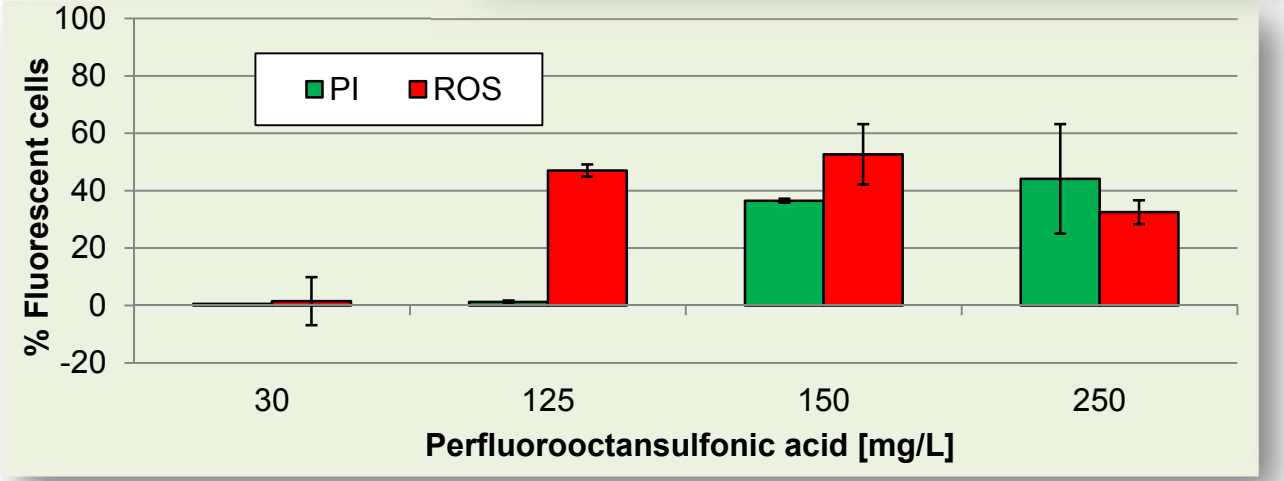
**Glutathionlevel**

Propidiumiodid-**Nekrosetest** → Ausschluss von Zytotoxizität

**Apoptosetest** → Ausschluss zytotoxischer Konzentrationen

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

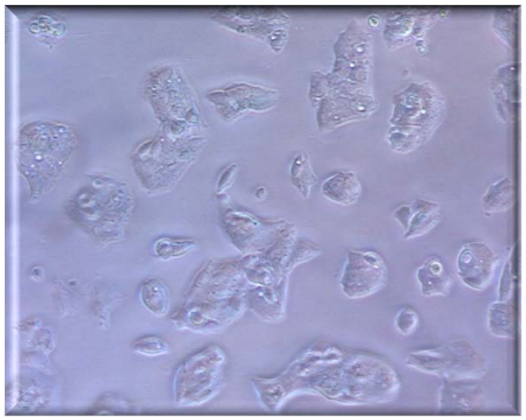


# *In vitro*-Neurotoxizität Level 2: Spezifische Effekte in versch. Zelllinien

Zunehmende Spezifität

**HepG2 – Leberzellen**

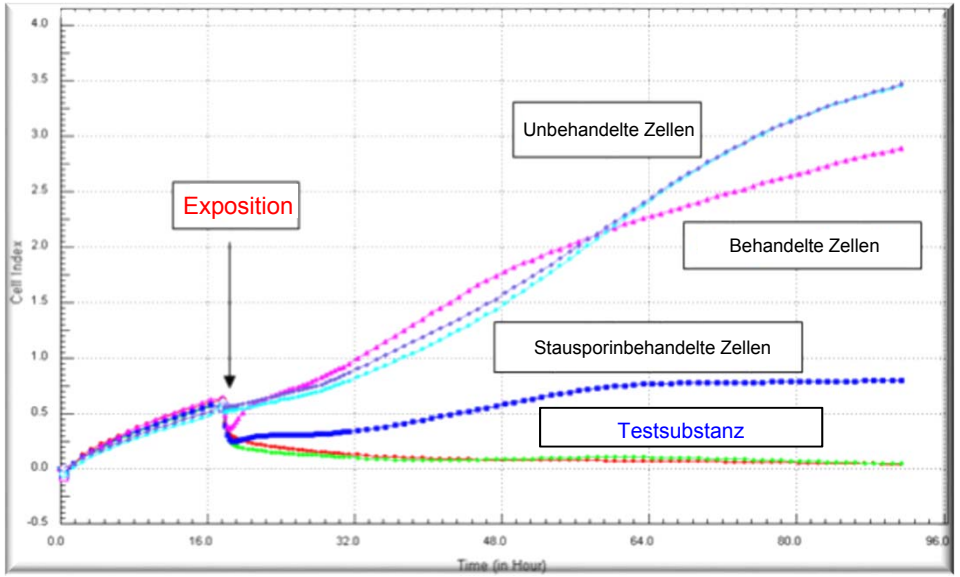


**SH-SY5Y – Neuroblastomzellen**

**Neurotoxizität**

# *In vitro*-Neurotoxizität Level 2: Neuronenspezifische Effekte

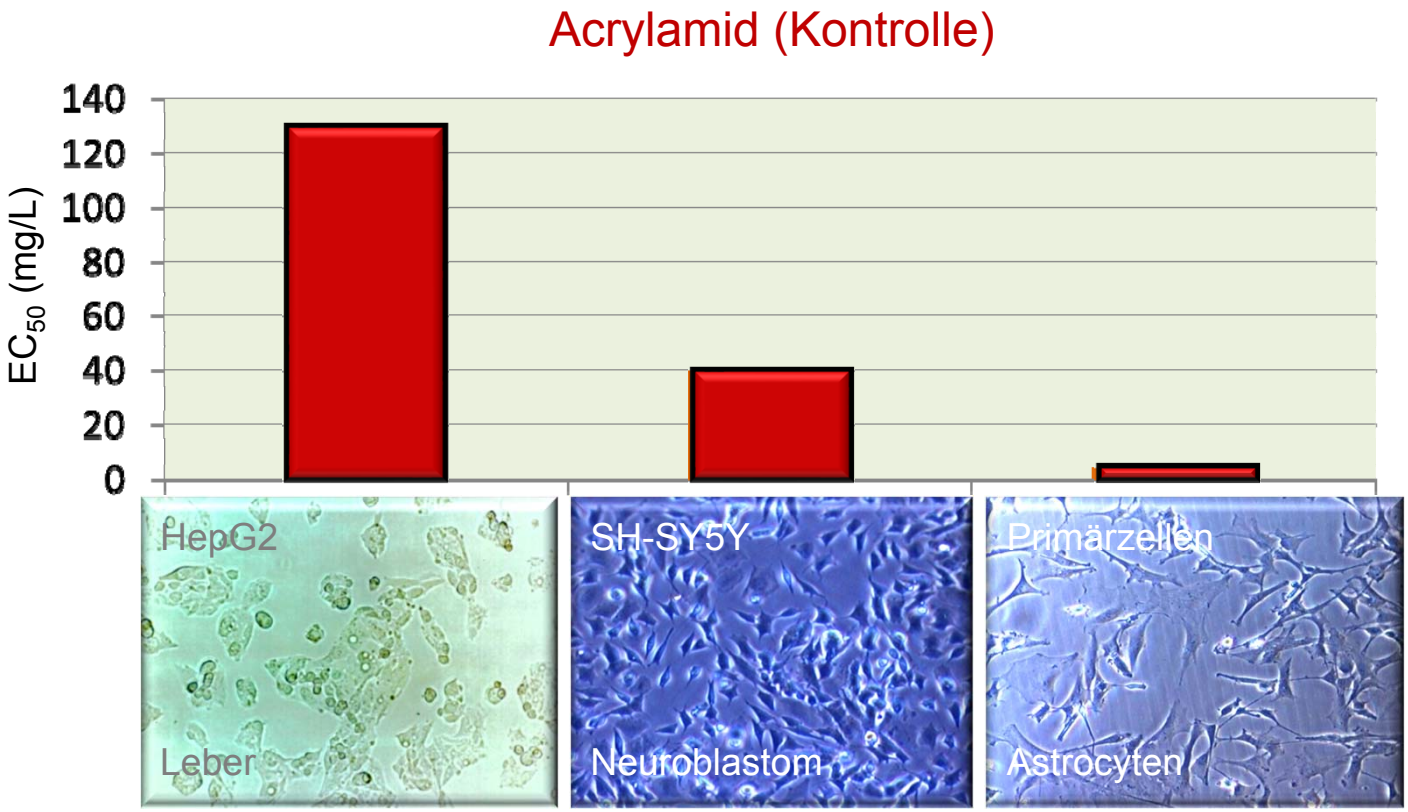
Real-time Zellanalyse




$EC_{50}$-Werte bei HepG2- und SHSY5Y-Zellen mit Real-time Zellanalyse

| | $EC_{50}$ HepG2 | $EC_{50}$ SH-SY5Y |
|---|---|---|
| Acrylamid (Kontrolle) | 130 | 40 |
| Dichlorvos | 17 | 8 |
| Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) | 66 | 170 |

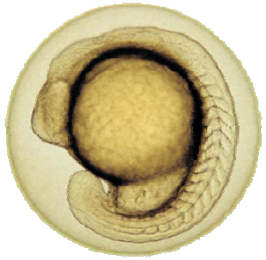
# *In vitro*-Neurotoxizität Level 3: Hochspezifische neurotoxische Effekte…

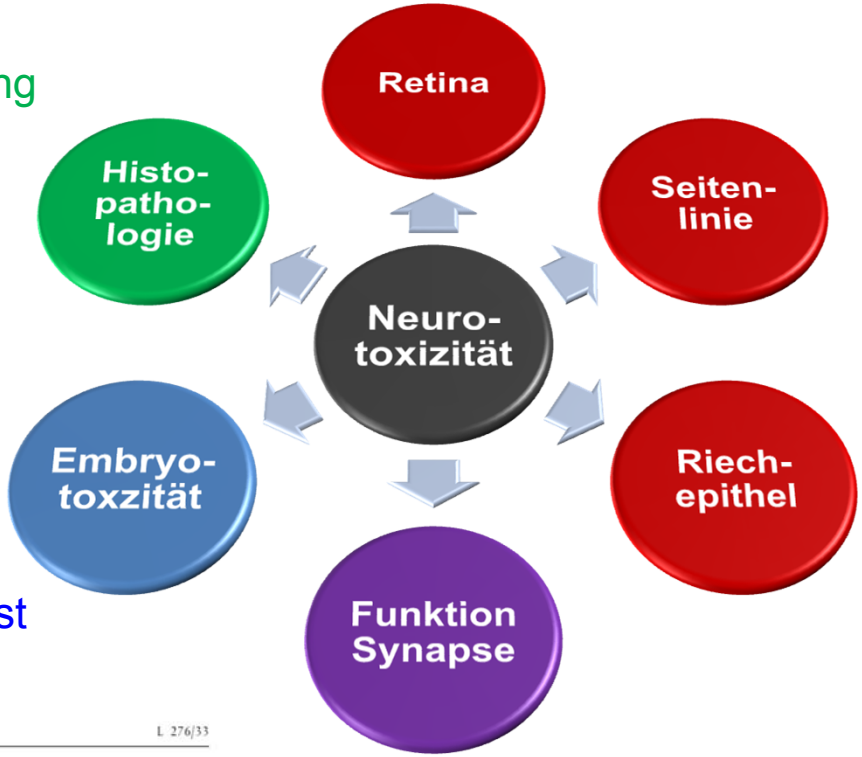


# Neurotoxizität *in vivo* in Embryonen des Zebrabärblings

## → Verifizierung der *In vitro*-Beobachtungen

HE-Färbung






Fluoreszenz-mikroskopie

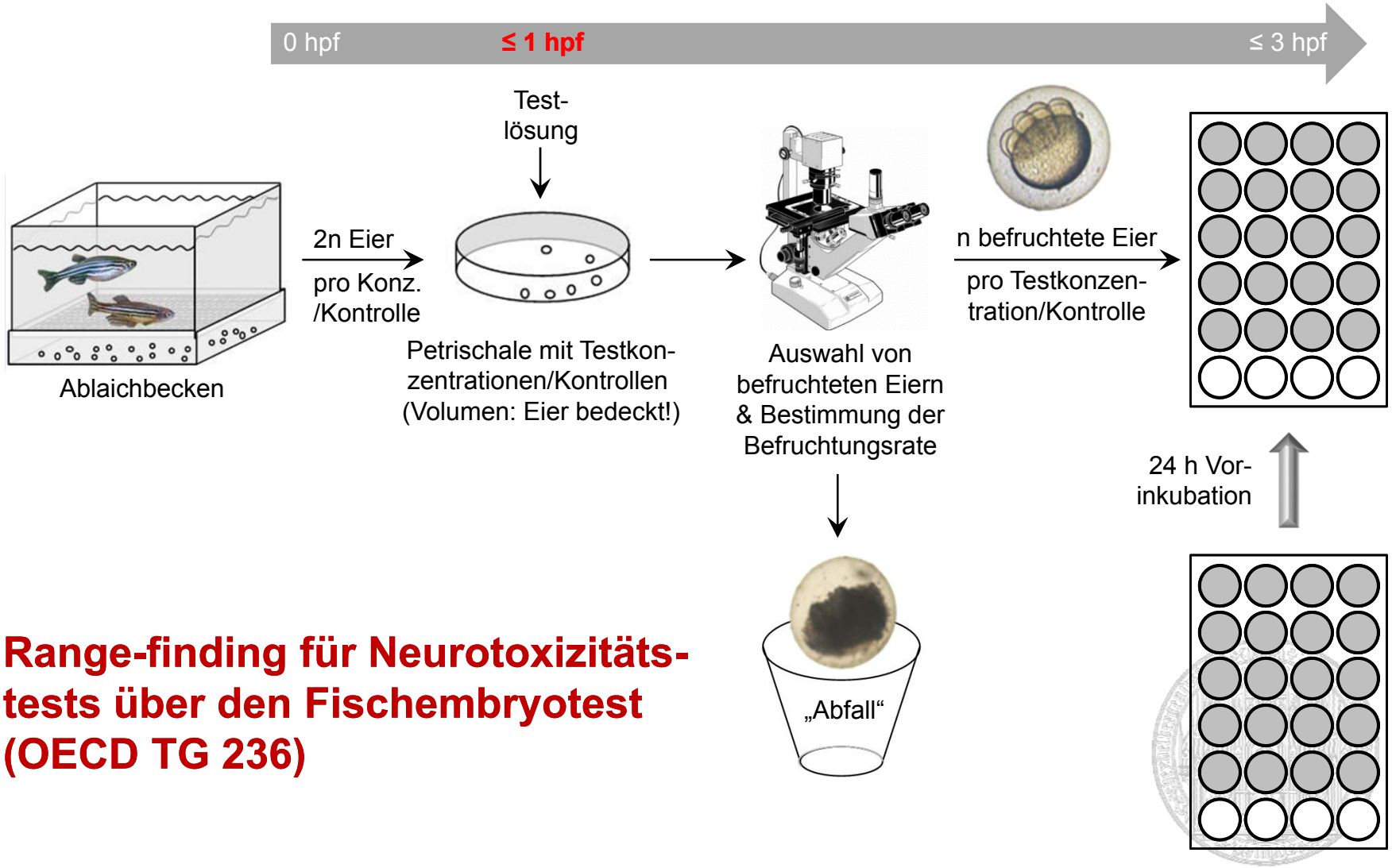
Fischembryotest (OECD 236)

20.10.2010 EN Official Journal of the European Union L 276/33

DIRECTIVES

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL
of 22 September 2010
on the protection of animals used for scientific purposes

Enzymkinetik (AcChE)



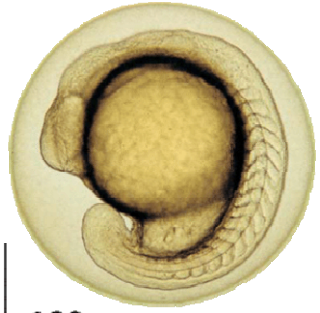

# Range-finding für Neurotoxizitäts-tests über den Fischembryotest (OECD TG 236)

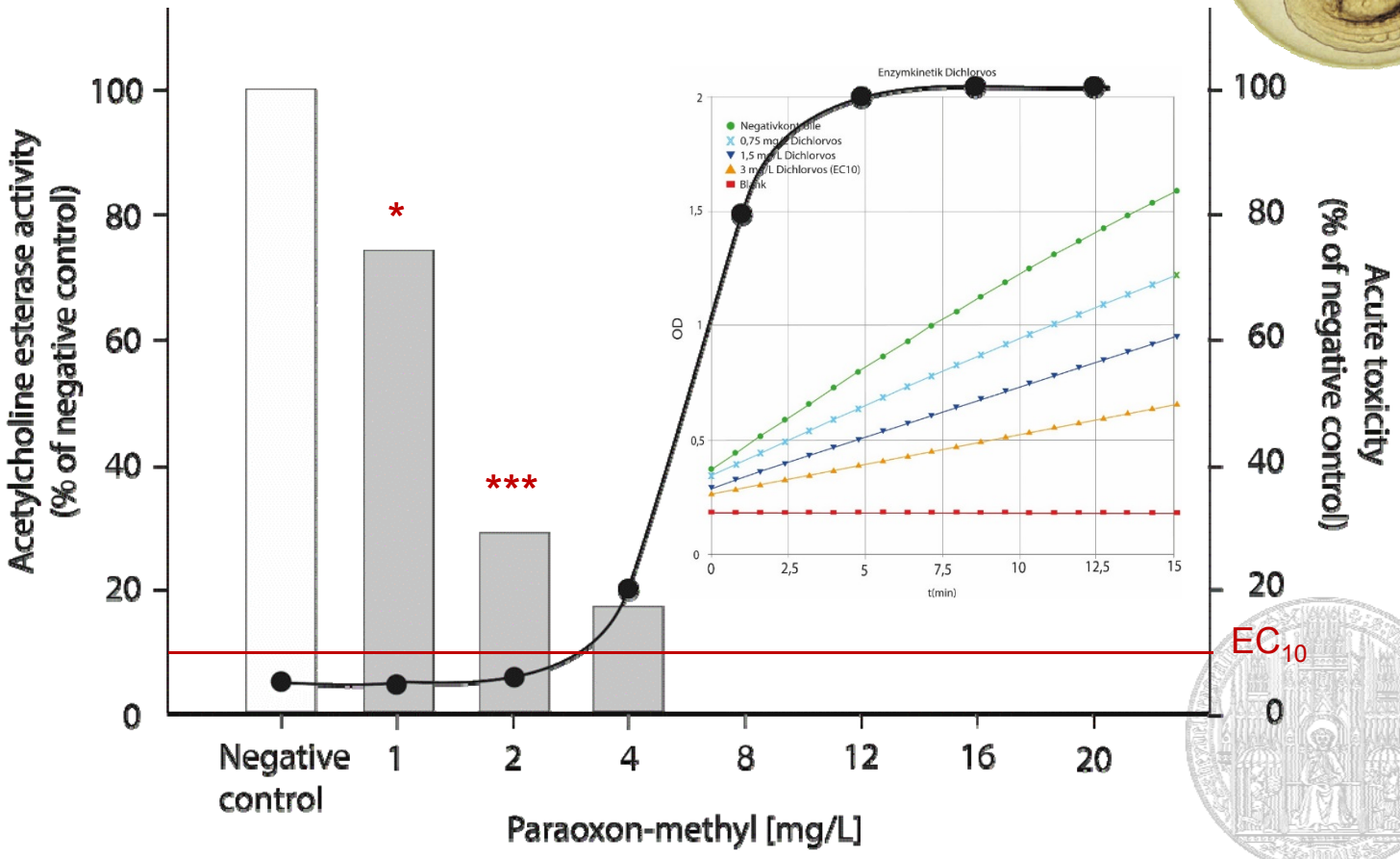
# Range-finding für Neurotoxizitäts-prüfungen über den Fischemrbyotest

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

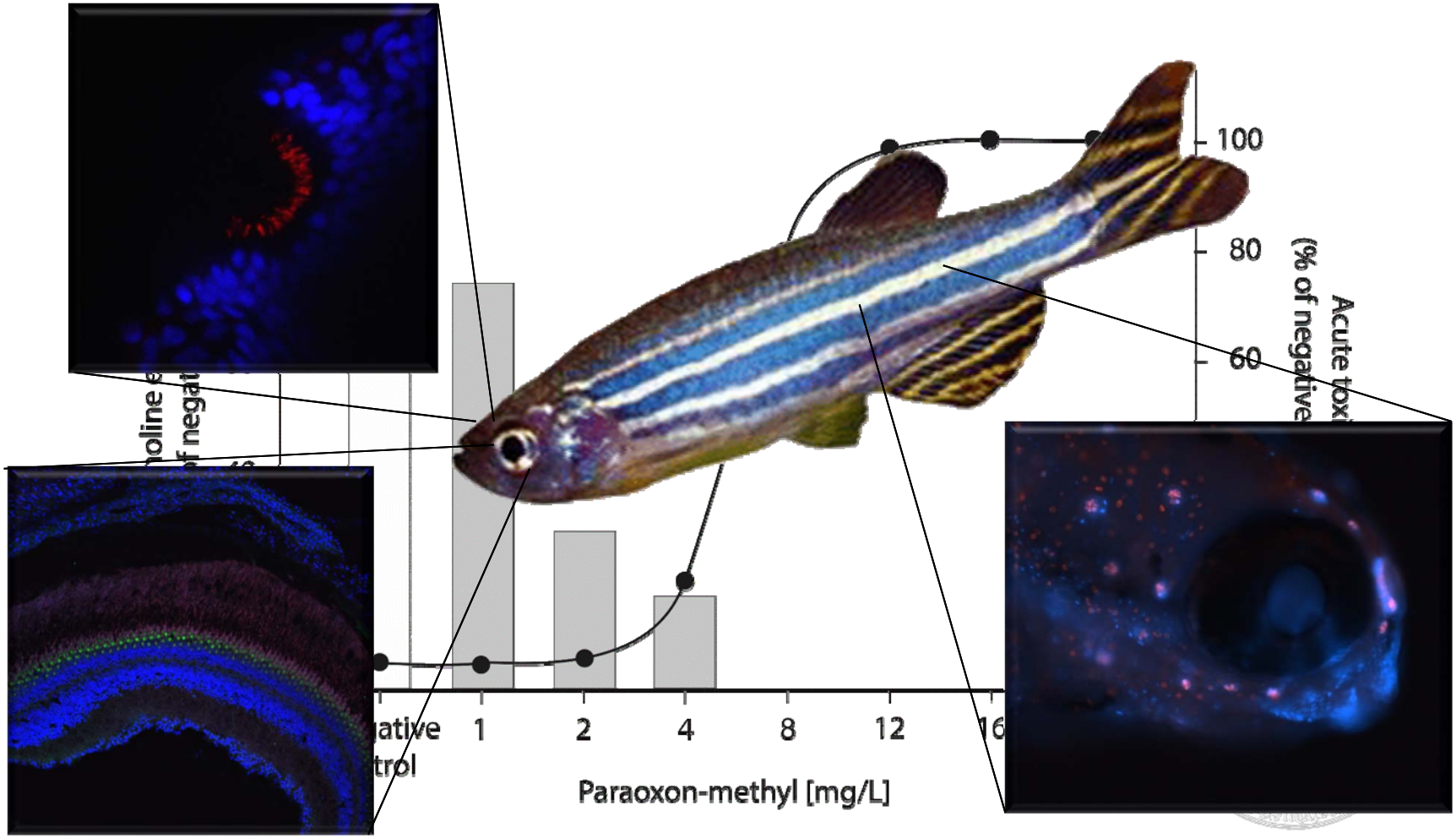
| Testsubstanz | $EC_{10}$ (mg/L) | $EC_{50}$ (mg/L) | $LC_{50}$ (mg/L) |
|---|---|---|---|
| Amidotrizoesäure | **n.d.** | n.d. | n.d. |
| Koffein | **24.23 ± 1.86** | 45.9 ± 5.16 | 514.89 ± 0.0 |
| Cypermethrin | **n.d.** | n.d. | n.d. |
| Dichlorvos | **2.83 ± 0.53** | 4.65 ± 0.54 | 8.1 ± 0.49 |
|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

# “Konventionelle” Neurotoxizität:
## Hemmung der Acetylcholinesterase

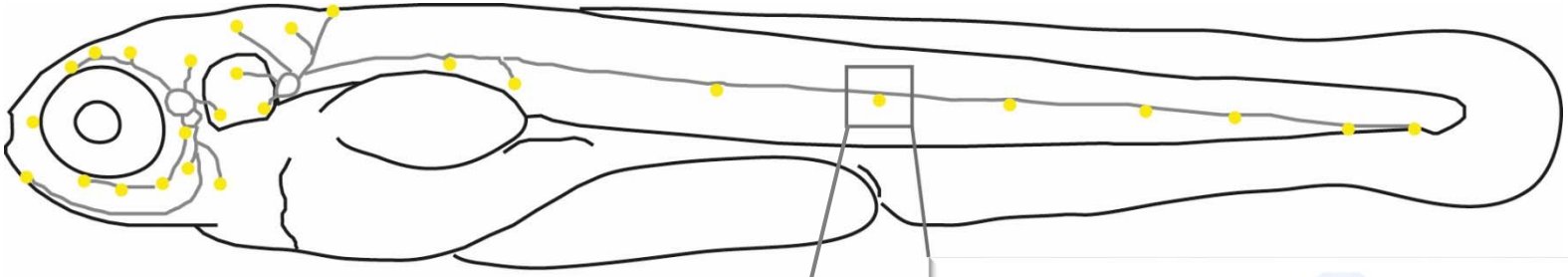


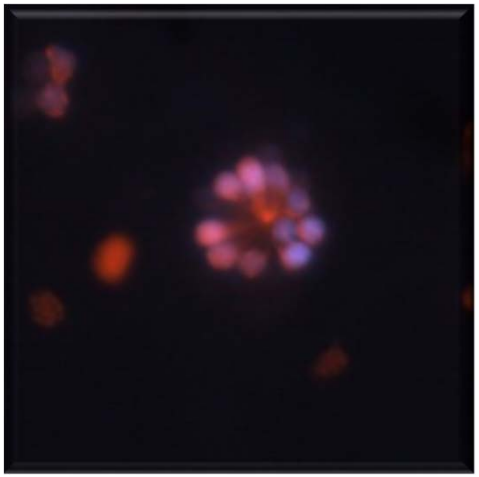


# Neurotoxizität *in vivo* in Embryonen des Zebrabärblings

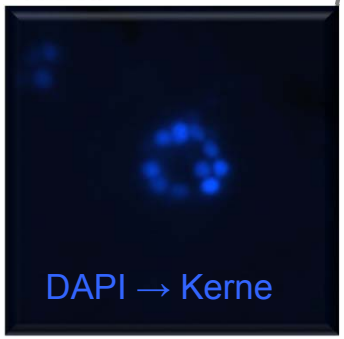


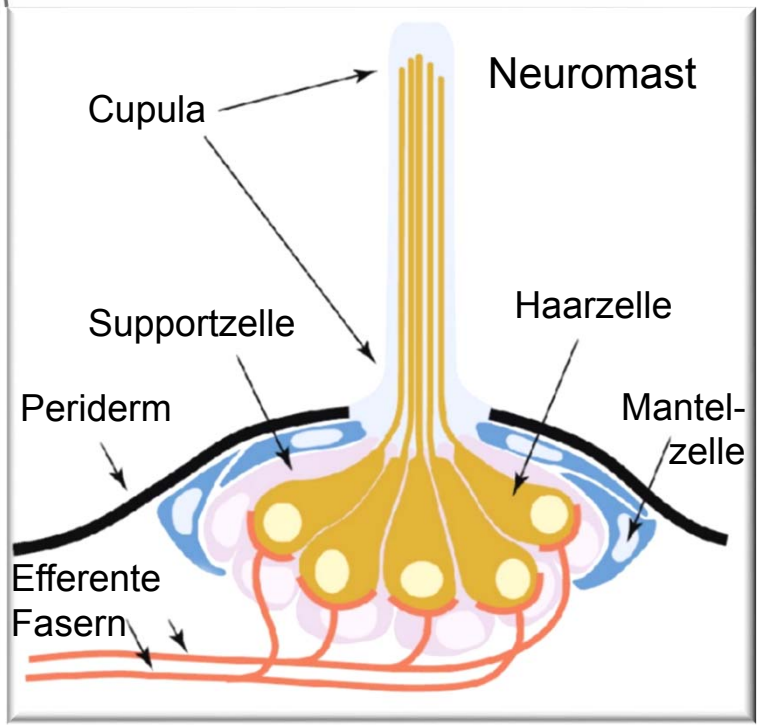
# Der Neuromastenassay in Embryonen des Zebrabärblings





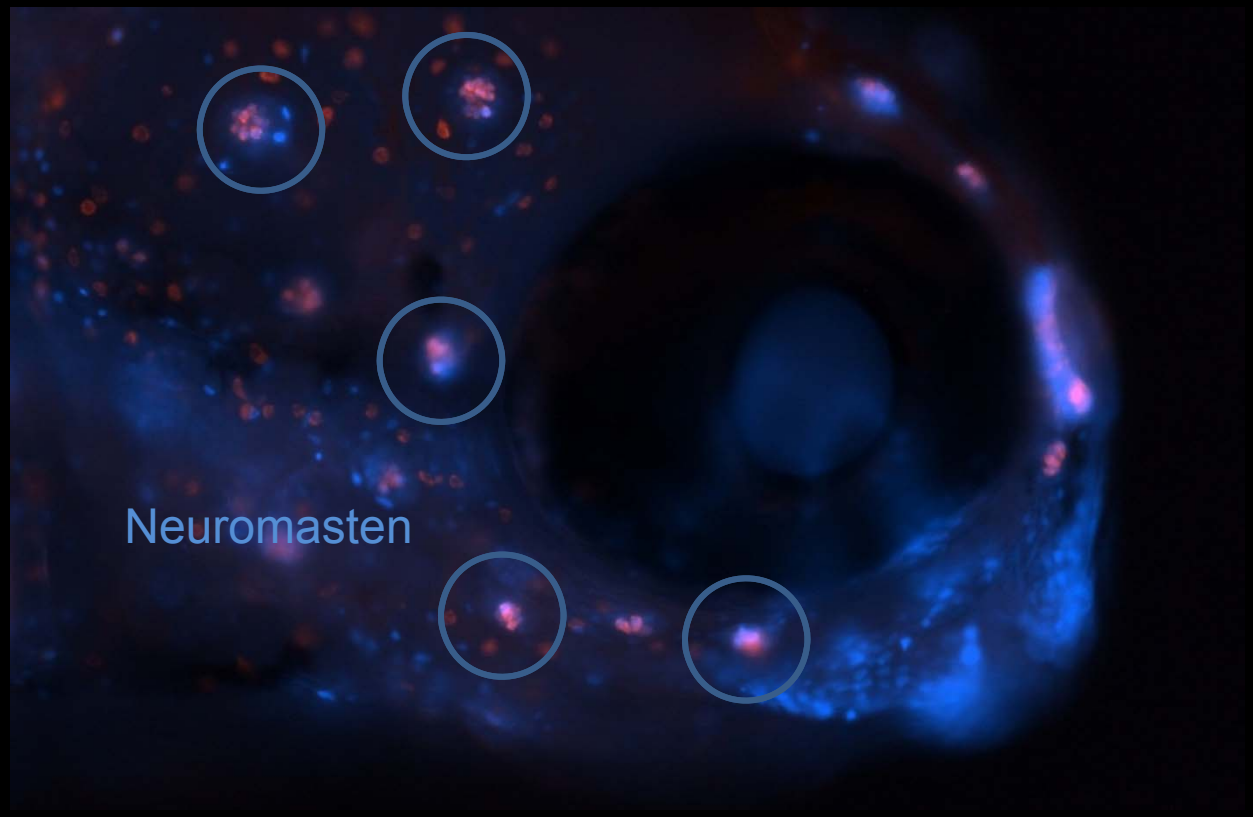
*In vivo* Fluoreszenz-doppelfärbung



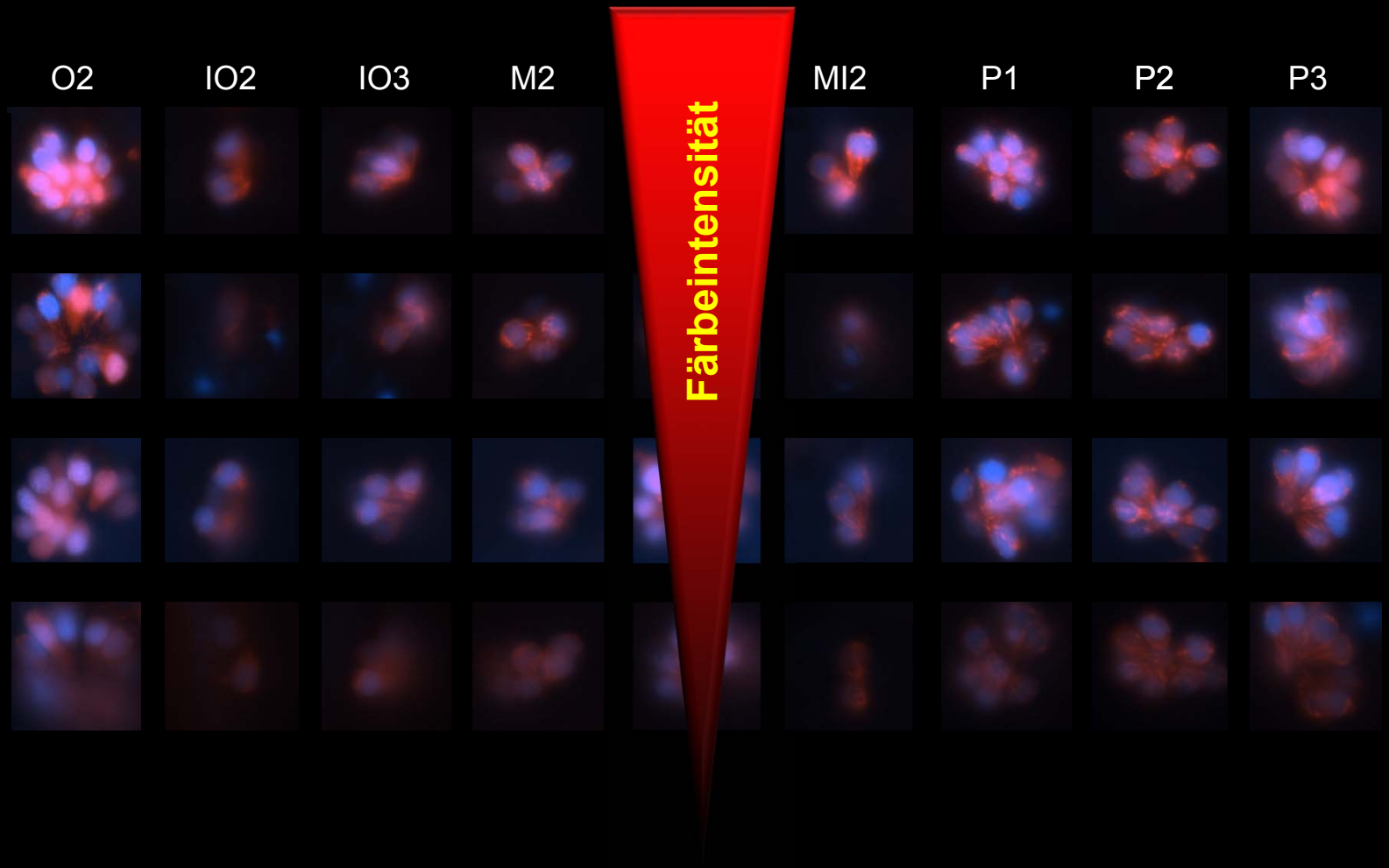


# Neurotoxizität in Fischembryonen

Neuromasten (Seitenlinie)



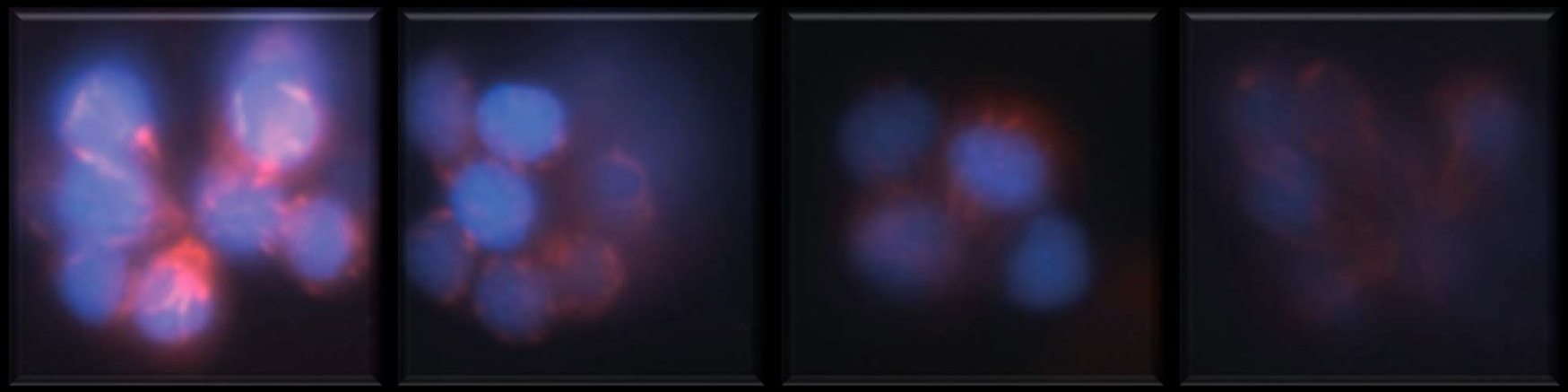
# Neurotoxizität im Fischembryonen: Seitenlinie




**Dichlorvos**

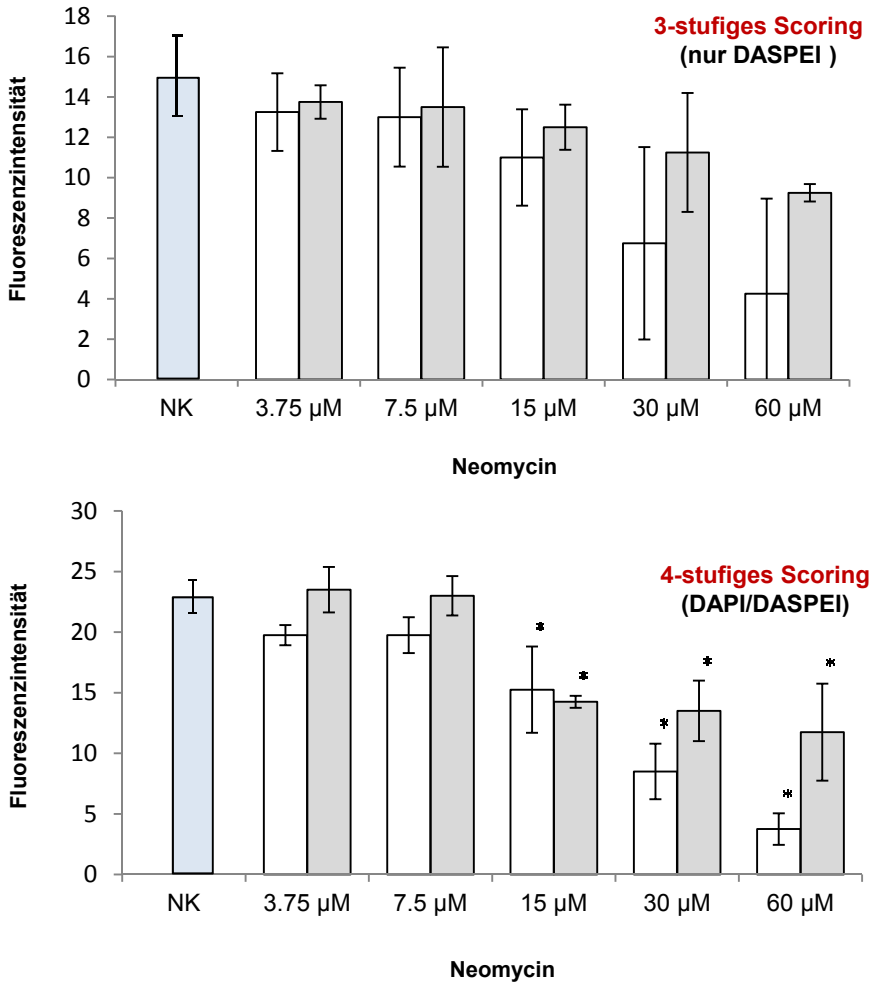
# Neurotoxizität im Fischembryonen: Seitenlinie

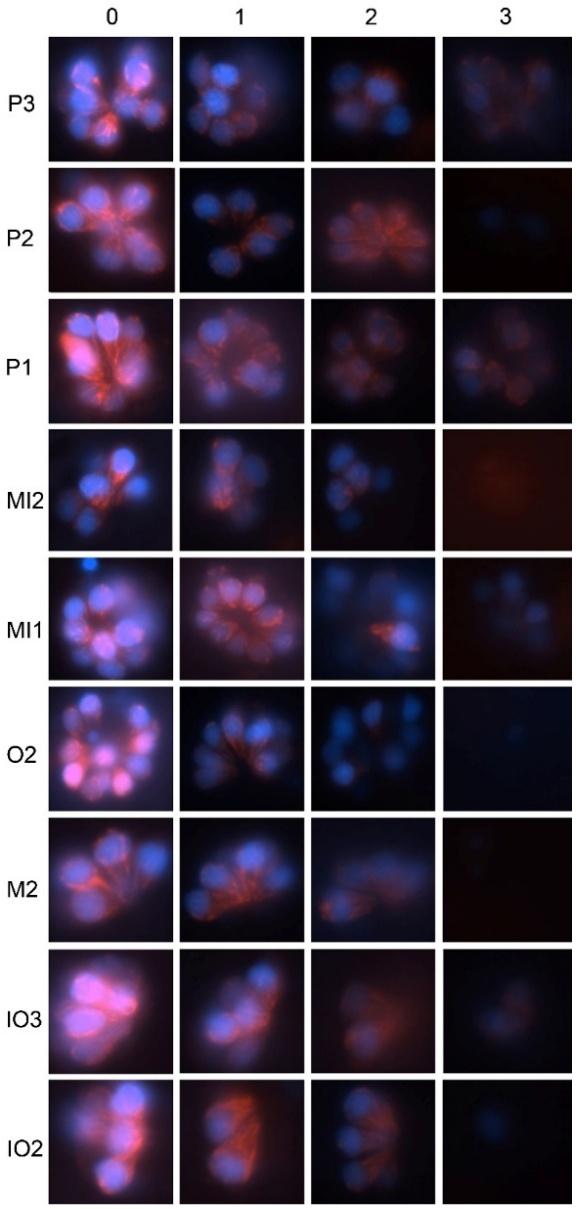
Semiquantitative Bewertung der Schädigung der Neuromasten



Grad 0 (Kontrolle) | Grad 1 | Grad 2 | Grad 3

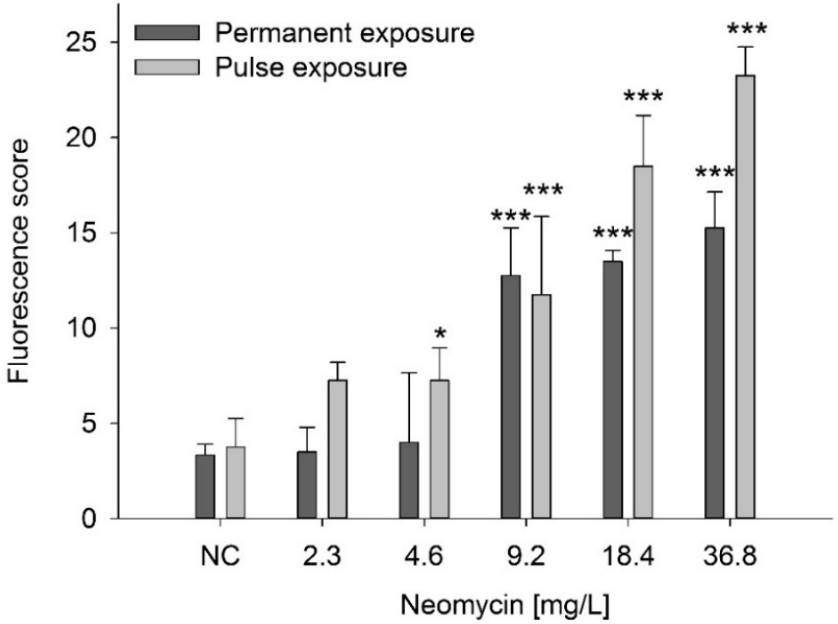
# Neurotoxizität in Fischembryonen: Seitenlinie

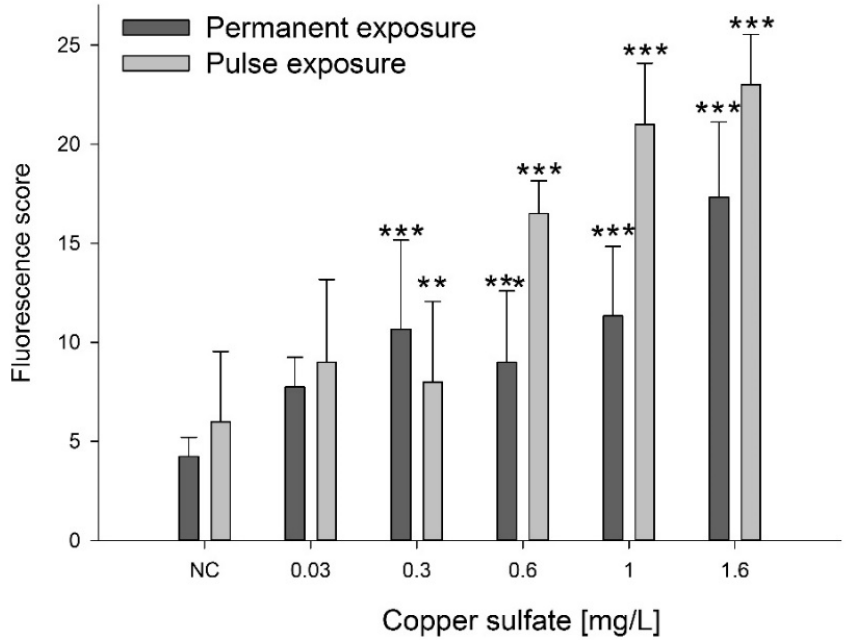


# Neurotoxizität in Fischembryonen: Seitenlinie

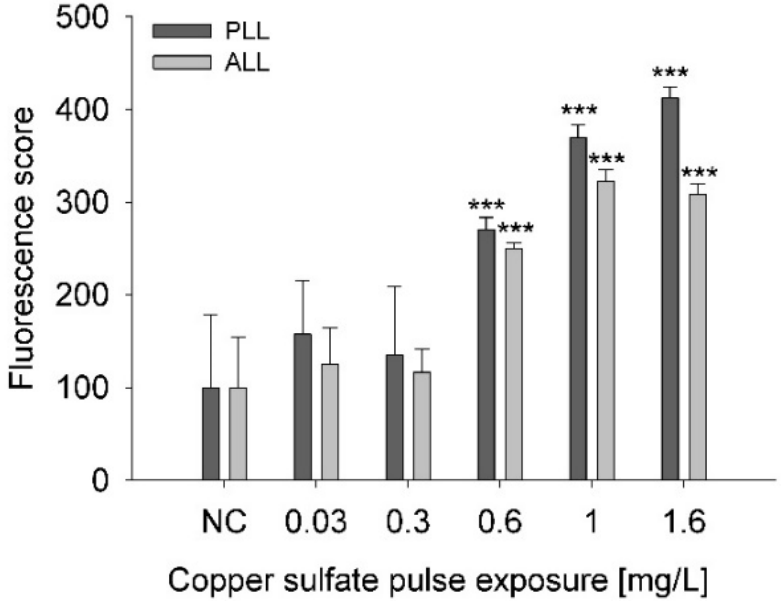
Pulsexposition (3 h) > Dauerexposition

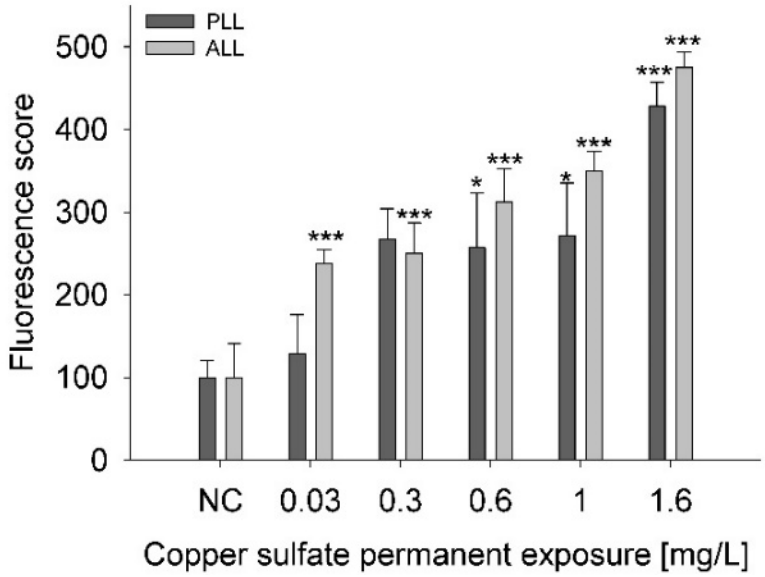


# Neurotoxizität in Fischembryonen: Seitenlinie

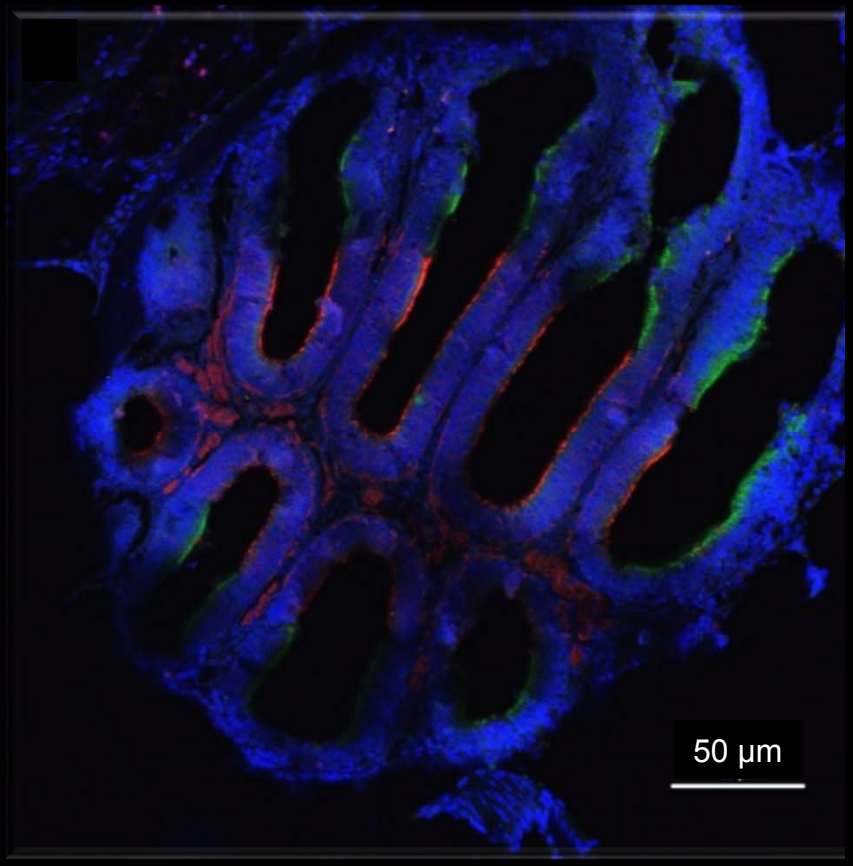
Keine signifikanten Unterschiede zwischen vorderer und hinterer Seitenlinie



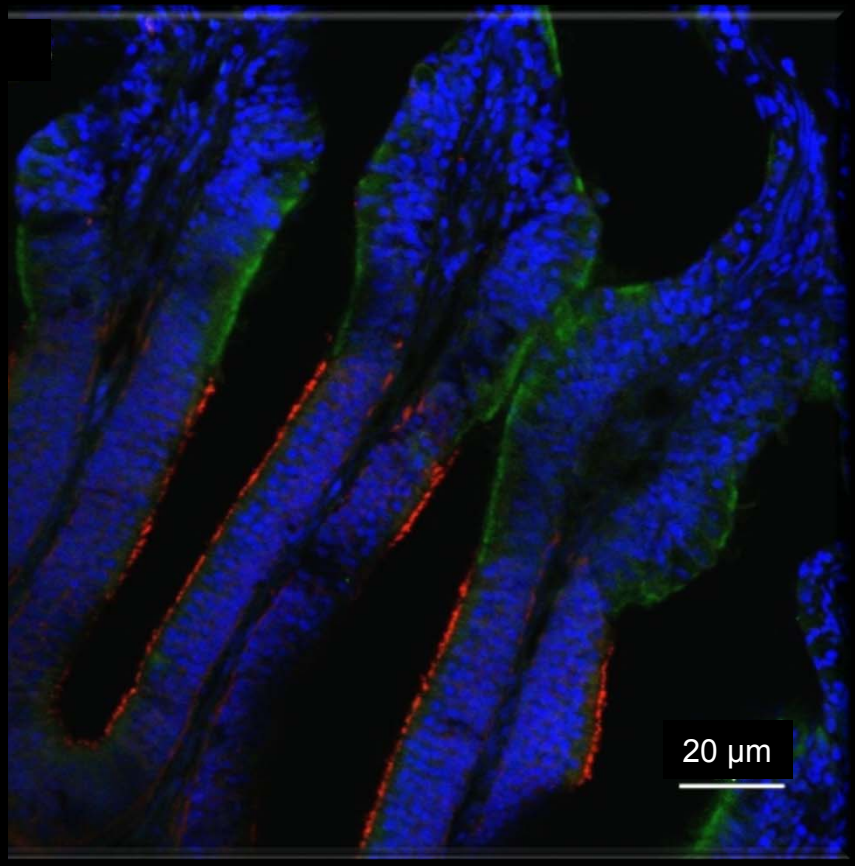



# Neurotoxizität in Fischembryonen: adultes Riechepithel

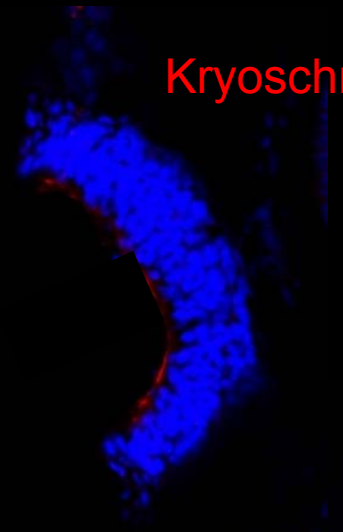
$G_{olf}$ – G-Protein Untereinheit



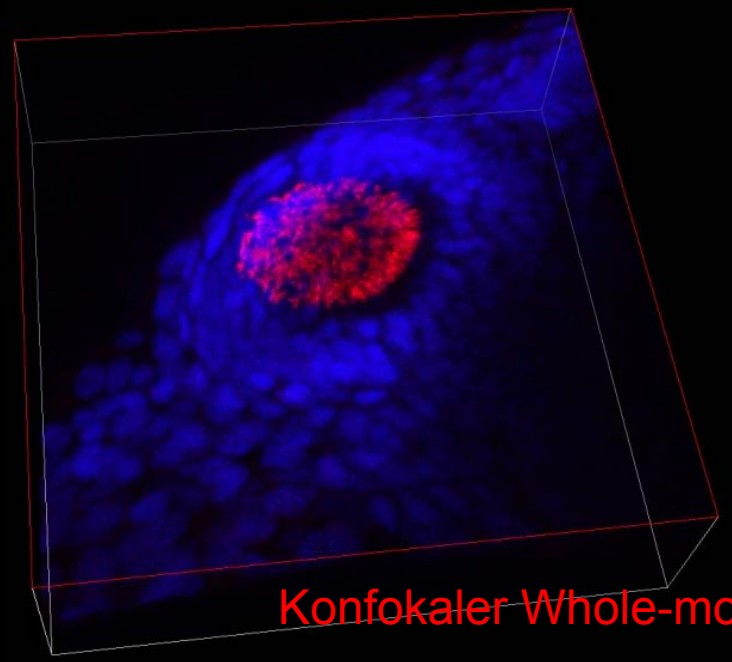

ANO2 – $Ca^{2+}$-abhängiger Chloridkanal



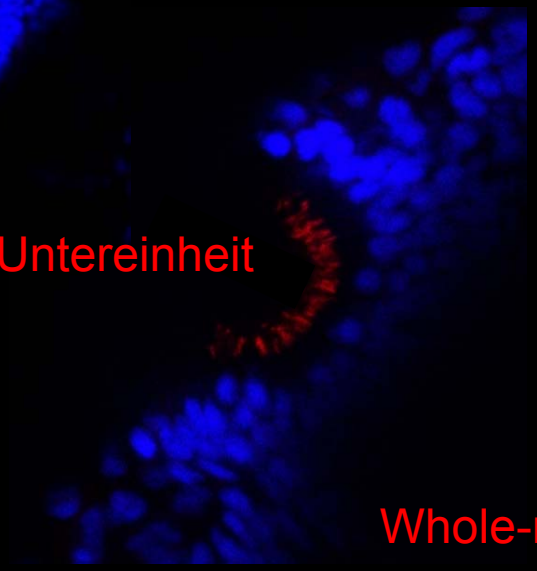
# Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel



Kryoschnitte



Konfokaler Whole-mount

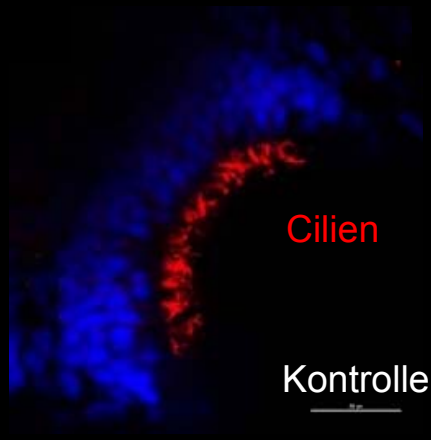


$G_{olf}$ – G-Protein Untereinheit

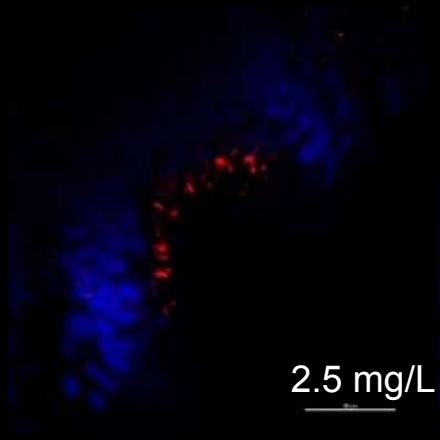
Whole-mount

# Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel

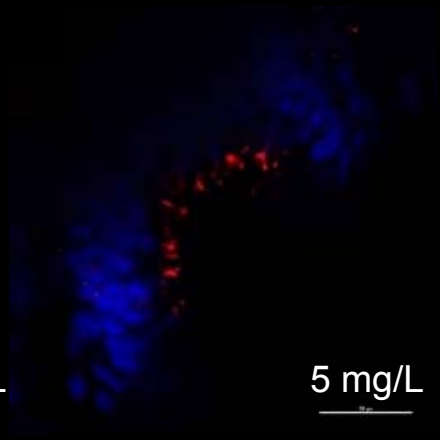
$CuSO_4$



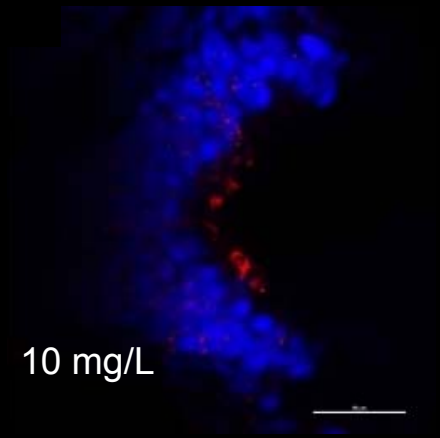

Kontrolle



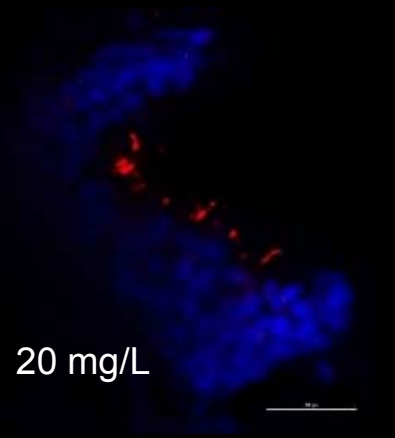
2.5 mg/L



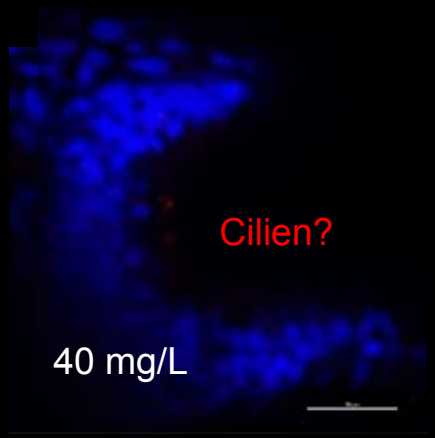
5 mg/L



10 mg/L



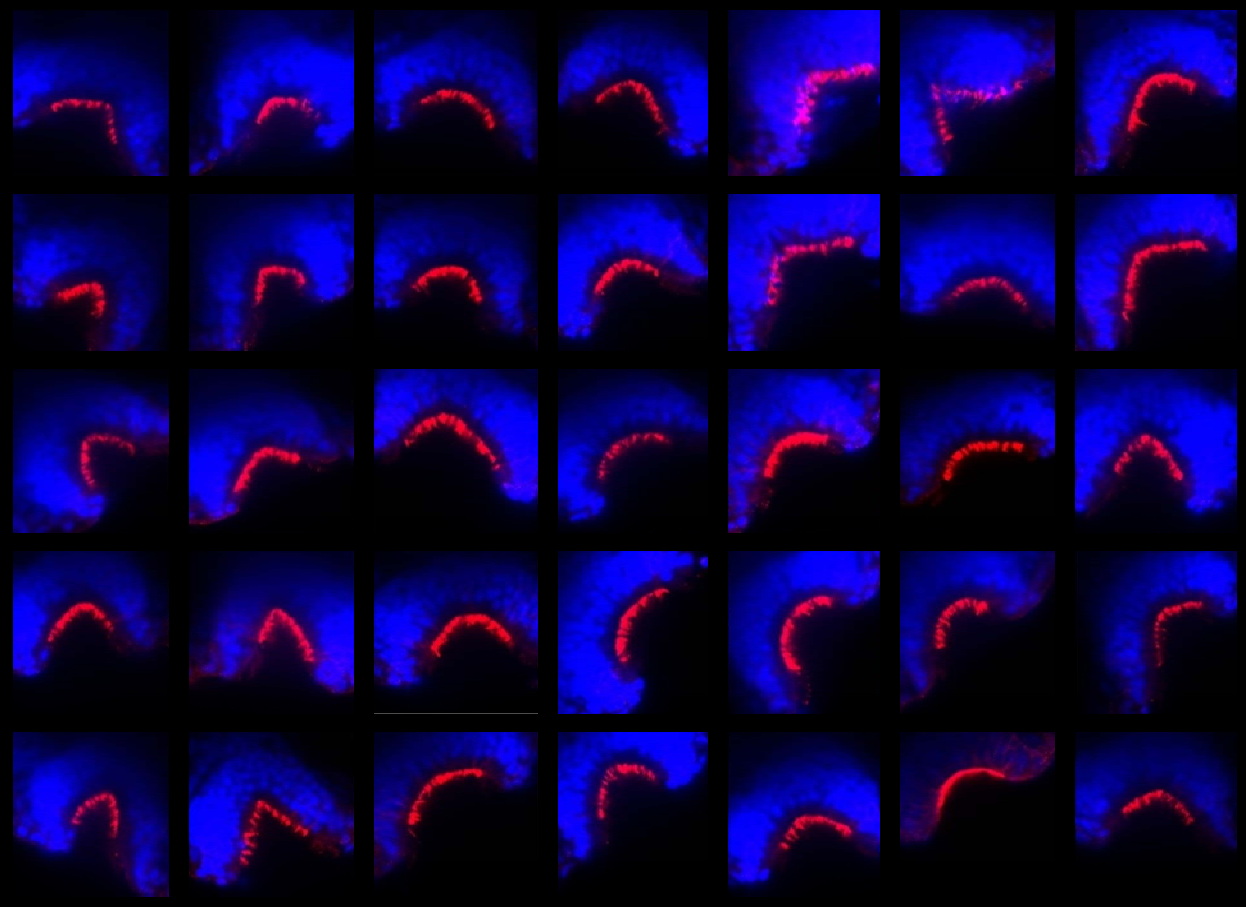
20 mg/L



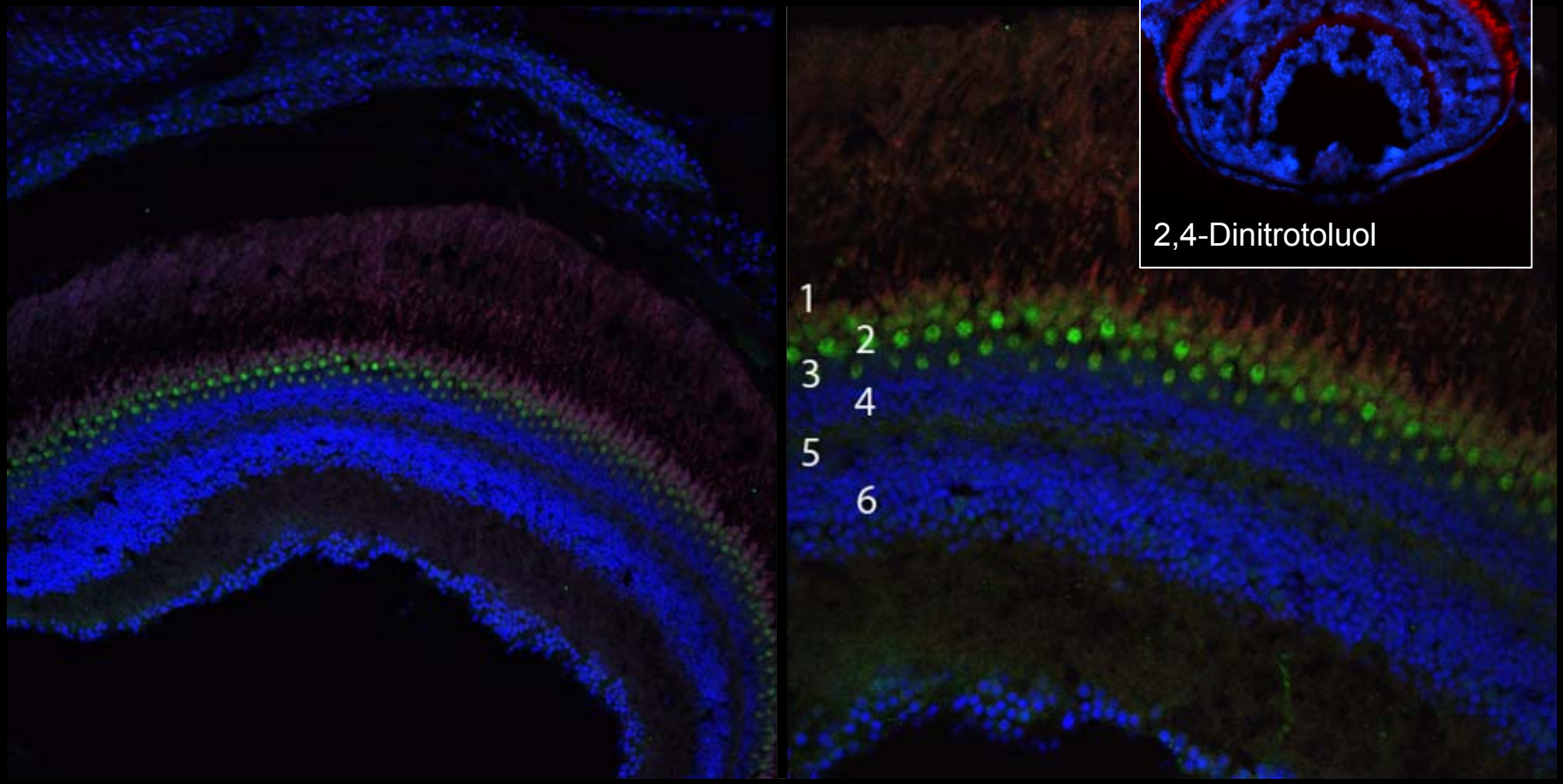

40 mg/L

# Neurotoxizität in Fischembryonen: embryonales Riechepithel

Kein Effekt am $EC_{10}$

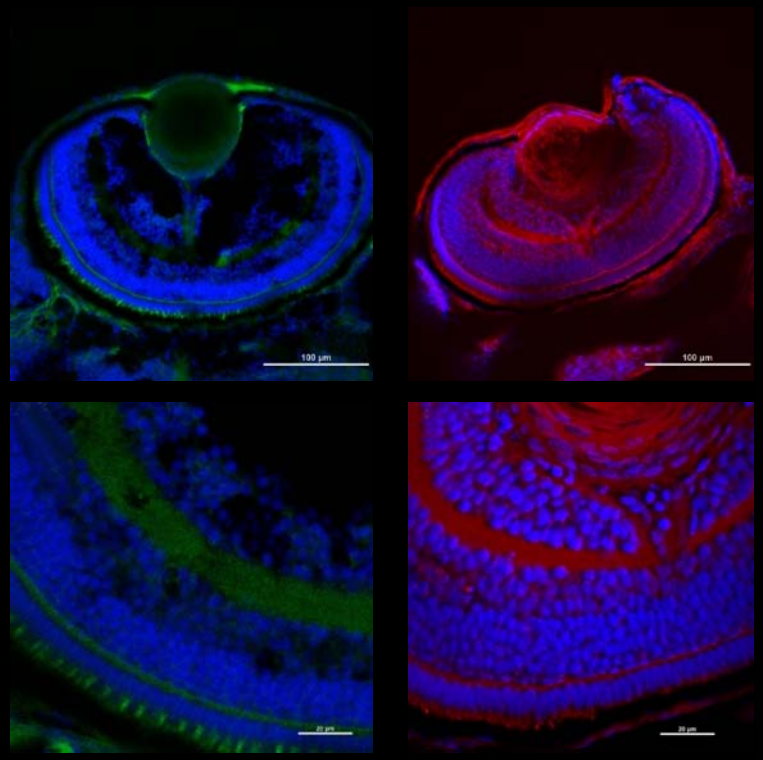


# Neurotoxizität in Fischembryonen – Retina



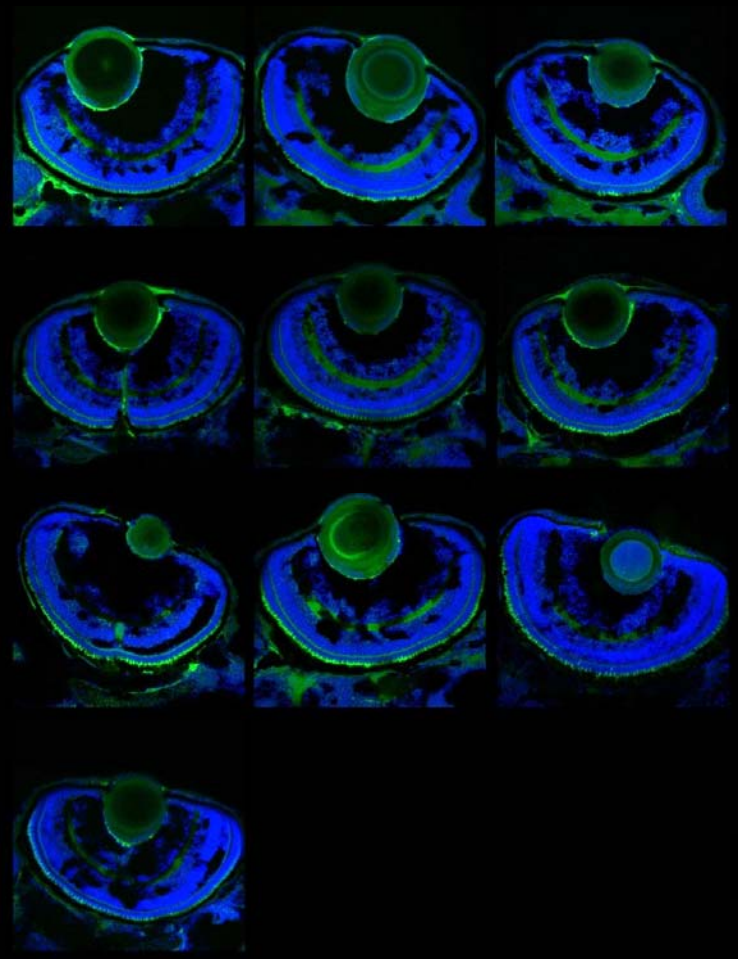

1: Rods and cones, 2: Outer nuclear layer, 3: Outer plexiform layer, 4: Inner nuclear layer, 5: Inner plexiform layer, 6: Ganglion cell layer

# Neurotoxizität in Fischembryonen – Retina



PFA / DAPI

Rhodamin B / DAPI



$EC_{10}$ | $0.5 \times EC_{10}$ | $0.25 \times EC_{10}$

Dichlorvos

2,4-Dinitrotoluol

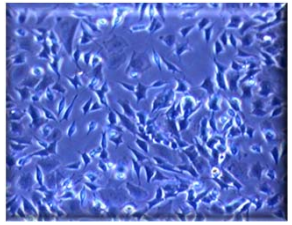
Amidotrizoesäure

Kontrolle

# Neurotoxizität *in vivo* in Embryonen des Zebrabärblings

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

# Bestimmung der Neurotoxizität



Bestimmung der Neurotoxizität *in vitro*

Bestimmung der Neurotoxizität *in vivo*

*Erhöhte Zytotoxizität?* Apoptose / Nekrose

*Nervenzellen besonders empfindlich?* Vergleich HepG2 *mit* SHSY-5Y

*Zellstress?* Reakt. $O_2$-Species

*Hemmung Synapsen?* Acetylcholinesterase-test in Fischembrsonen

*Seitenlinienstörung?* Neuromastenassay in Fischembryonen

ja

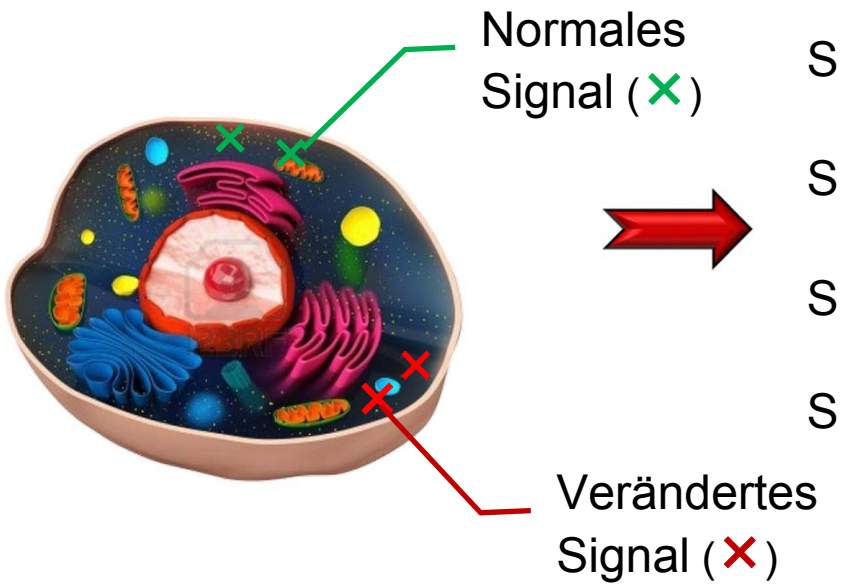
*Zellproliferation betroffen?* Humane Astrocyten

*Neuritenwachstum?* Neuritenwachstumsassay

*Neuritenstörung?* Neuritenspezifischer Enzymassay

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

# Bewertung im Rahmen des GOW-Konzepts



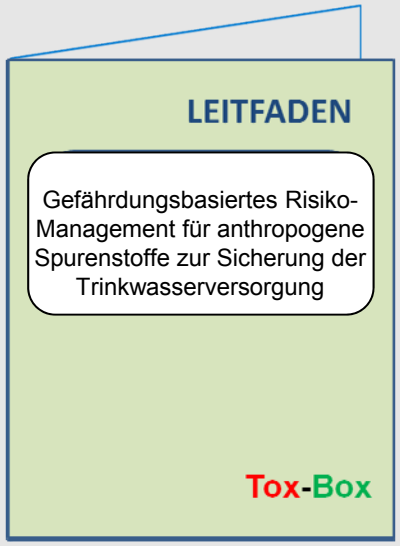

**Wirkungsmechanismus**

| | | |
|---|---|---|
| Signal 1 | | X |
| Signal 2 | | X |
| Signal 3 | X | |
| Signal 4 | X | |

| | |
|---|---|
| X | |
| X | |
| | X |
| | X |

$GOW_1$ $GOW_3$

# Weiterentwicklung des GOW-Konzepts




- Harmonisierte Teststrategie
- Formulierung allgemeiner Leitlinien in Form von Entscheidungsbäumen
- Festlegung von Maßnahmenoptionen

# Die Anwendung…?

→ Ereignisbezogen - schnell

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

↓

→ Regulatorisch – (vorerst) dauerhaft

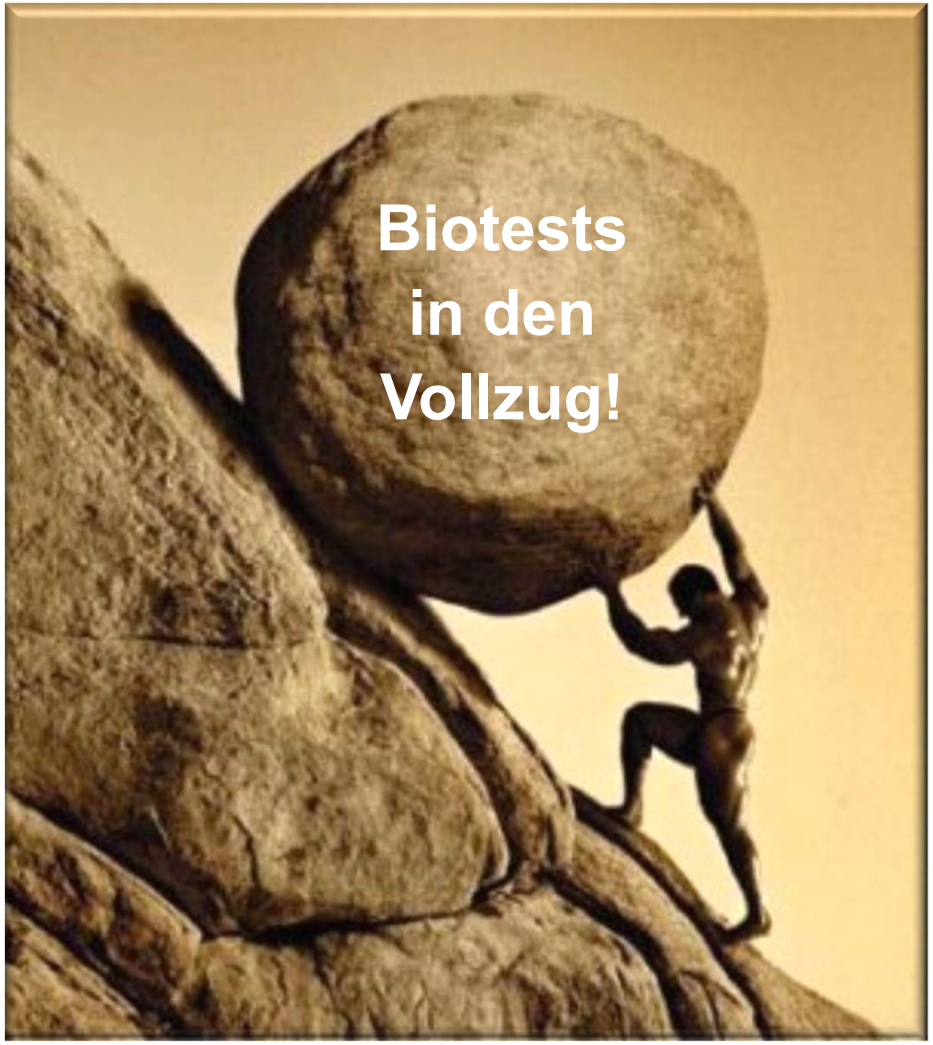
- Minimierungsgebot, z.B. Handlungsempfehlungen auch ohne rechtsverbindlich gesetzte Standards

# Handlungsoptionen

- Vorgelagerter Regelungsbereich
  - REACH, Zulassungsverfahren für Arzneimittel (AM) und Pflanzenschutzmittel (PSM)
- Gesamthygienisches Konzept für Trinkwasser
  - Vorsorgeprinzip, Minimierungsgebot, Ressourcenschutz
- Risikokompetente Bürger

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

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




**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!!**