

„ToxBox – Risikomanagement anthropogener Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung“

Alexander Eckhardt, Jochen Kuckelkorn, Eva-Maria Prantl und Daniel Stengel

In jüngster Zeit werden vom Menschen verursachte Verunreinigungen im Wasserkreislauf vermehrt bekannt, wie beispielsweise Rückstände von Arzneimitteln. Dies liegt unter anderem daran, dass Substanzen mittlerweile in geringsten Konzentrationen nachgewiesen werden können. Daher müssen mögliche Risiken erforscht und der entsprechende Leitwert etabliert werden, um so die Qualität des Lebensmittels Trinkwasser wie auch das Vertrauen der Verbraucher zu sichern. Das Verbundprojekt ToxBox entwickelt hierarchische Verfahren, die es erlauben, das Gefährdungspotenzial anthropogener Spurenstoffe zu analysieren. Grundlage des Projektes ist das theoretische Konzept des Gesundheitlichen Orientierungswertes (GOW), das vom Umweltbundesamt entwickelt wurde, um Stoffe im Hinblick auf ihre Humantoxizität zu bewerten, wenn nur eine begrenzte, unzureichende Datenbasis vorliegt. Hierbei werden durch das Konzept Auswirkungen auf das Erbgut sowie auf das Nerven- und Hormonsystem erfasst und bewertet. Ziel des Projektes ist die schnelle und verlässliche Bewertung von Risiken durch anthropogene Spurenstoffe, um so eine sichere Trinkwasserversorgung langfristig zu erhalten. Im Vergleich zum GOW-Konzept, in dem bisher nur Gentoxizität und Neurotoxizität bewertet werden, wurde das Projekt um das Modul endokrine Wirkungen erweitert. Dies trägt den aktuellen Fragestellungen in der Trinkwasserversorgung Rechnung.

Modul Gentoxizität

Die erste Stufe dieser Bewertung bildet die Erfassung des gentoxischen Potenzials, d.h. die möglichen Auswirkung des Stoffes auf das Erbgut. Da ein einzelner Test hierfür nicht ausreicht, ist eine aussagekräftige Testbatterie erforderlich. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung werden trinkwasserrelevante Stoffe systematisch mit verschiedenen Testsystemen untersucht, um so die optimale Testbatterie zur Wirkungserfassung der Stoffe zu bestimmen.

Die RheinEnergie AG erprobt innerhalb des Projektmoduls „Gentoxizität“ einfache, schnelle und standardisierte bakterielle Kurzeittests, mit denen Wasserversorgungsunternehmen selbst einen ersten Beitrag zum Bewertungsprozess leisten können, um im Einzelfall getroffene Bewertungen einschätzen zu können und den Prozess als solchen zu beschleunigen.

Bei den bakteriellen Gentoxizitätstests, die im Projekt angewandt werden, handelt es sich um den Ames-Fluktuationstest und den umu-Test (Abbildung 1). Diese detektieren unterschiedliche gentoxische Endpunkte. Der Ames-Fluktuations-Test kann die mutagene Aktivität, d.h. eine vererbare Veränderung des Genoms, anzeigen. Es handelt sich um eine erst vor kurzem genormte, vereinfachte Variante des ursprünglichen Ames-Platteninkorporationstests, der seit langem angewandt wird und für den sehr viele Vergleichsdaten zur Verfügung stehen.

Der umu-Test zeigt an, dass das DNA-Reparatursystem infolge einer unspezifischen Schädigung der Erbsubstanz (DNA) aktiviert wurde. Ob es sich dabei um eine vererbare Schädigung im Sinne einer Mutation handelt, oder ob der Schaden vor der nächsten

Zellteilung repariert werden konnte, wird zwar nicht erfasst, es kann aber angenommen werden, dass bei gesteigerter DNA-Reparaturintensität entsprechend viele Mutationen entstanden sind. Der umu-Test ist als Testsystem in der deutschen Abwasserverordnung verankert. Ein Vorteil dieses Tests ist das schnelle Ergebnis innerhalb eines Tages. Außerdem können, im Gegensatz zum Ames-Test, auch in den Wasserproben suspendierte Teilchen erfasst werden, da eine Filtration vor dem Test nicht notwendig ist.

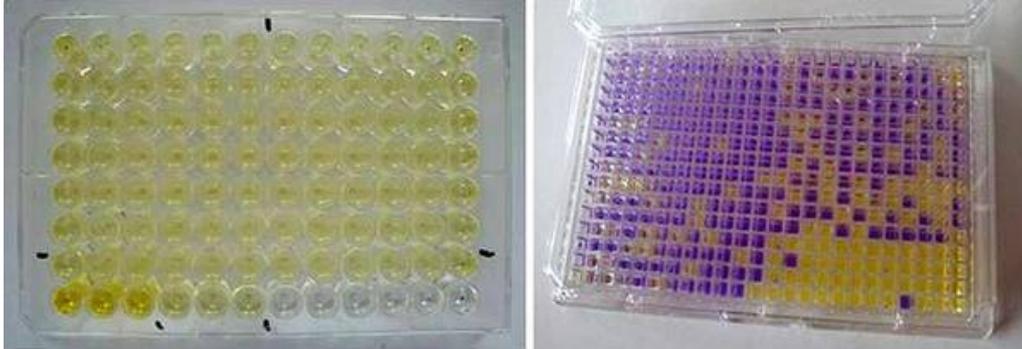


Abbildung 1: Ames-Fluktuationstest in 384-well Platte (links) und umu-Test in 96-well Platte (rechts)

Weil mit Bakterien nicht alle human relevanten Genotoxine erfasst werden können, da ihnen das humane Enzymsystem für den Stoffwechsel einiger anthropogener Spurenstoffe fehlt, müssen solche Untersuchungen immer durch Testsysteme ergänzt werden, die mit Säugetierzellen arbeiten. Diese sind darüber hinaus in der Lage, unterschiedliche genotoxische Wirkmechanismen der anthropogenen Spurenstoffe anzuzeigen. Solche Testverfahren werden ebenfalls innerhalb des Projektmoduls „Genotoxizität“ erprobt. Dazu gehören der SWITCH-Test, der Mikrokern-Test, der Mouse-Lymphoma-Assay, die Erfassung der Induktion von Schwesterchromatid-Austauschen, der Nachweis der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und Untersuchungen zur Genexpression von Zebrafischembryonen.

Modul Neurotoxizität

Nervenzellen sind die Grundlage unseres Nervensystems. Sie vermitteln den Kontakt zur Außenwelt, steuern unser Verhalten und sind, wenn man so will, in ihrer Gesamtheit der Auslöser dessen, was unsere Persönlichkeit ausmacht. Das Nervensystem entsteht aus der Vernetzung mehrerer Milliarden einzelner Nervenzellen. Dieses Nervennetzwerk ist in seiner Komplexität durch verschiedene Stoffe sowohl zeitlich begrenzt, als auch dauerhaft störfähig. Abgesehen von allgemein bekannten neurotoxischen Stoffen wie Ethanol, ist davon auszugehen, dass mehrere Tausend kommerziell genutzte Chemikalien als potentiell neurotoxisch einzustufen sind. Für diese Beurteilung stehen allerdings bisher nur ungenügend Daten zur Verfügung.

Die Aufgabe des Moduls Neurotoxizität ist es, eine Testbatterie zu etablieren, die möglichst breit gefächert eine Vielzahl an verschiedenen Substanzen sicher detektiert und eine Aussage über deren Schadstoffwirkung zulässt. Hierbei werden zwei Ansätze verfolgt:

Im ersten Schritt wird der Nachweis von Schädigungen und spezifischen Wirkmechanismen in speziellen Zielorganen an verschiedenen Zellkulturen (Leberzellen, Nervenzellen und Immunzellen) erbracht. Neben dem Einfluss auf die Vitalität wird auch die Fähigkeit von Nervenzellen zur Differenzierung untersucht.

Im zweiten Schritt folgt die Überprüfung von Effekten im lebenden Organismus, dabei werden vier neuronale Systeme von Fischen untersucht: die Retina, das Riechepithel, das Seitenliniensystem und die Signalweiterleitung zwischen zwei Nervenzellen mit neuen,

meist bildgebenden Methoden. Dadurch wird versucht Abweichungen vom Normalzustand zu erkennen und dem Mechanismus der Schädigung aus Schritt eins nach zu gehen.

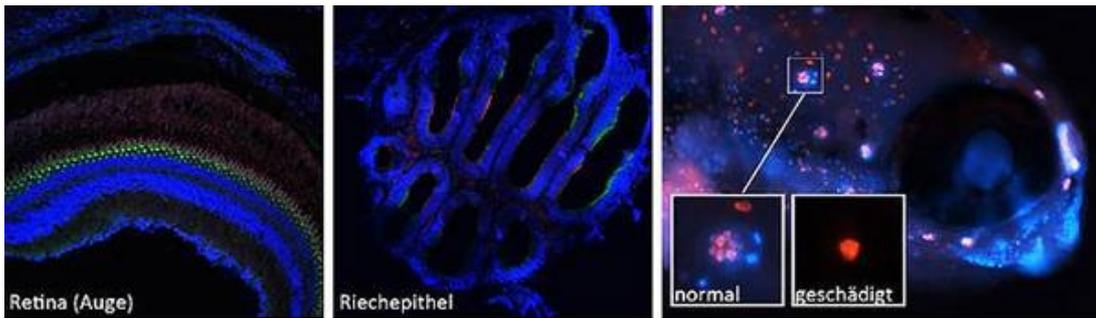


Abbildung 2: Darstellung verschiedener neuronaler Systeme des Zebrafish. Links: Retinaquerschnitt; Mitte: Riechepithelquerschnitt; Rechts: Seitenliniensystem mit Detail eines Neuromasten

Modul Endokrine Effekte

Endokrine Effekte, also Auswirkungen auf das Hormonsystem, können bereits bei sehr geringen Substanzkonzentrationen - im ng/L Bereich - auftreten. Hochsensitive biologische Testsysteme, die Effekte in diesem Wirkungsbereich nachweisen können, leisten daher im Zusammenspiel mit der Identifizierung der Substanzen über chemisch-analytische Methoden einen wertvollen Beitrag zur Risikobewertung von endokrin wirksamen Stoffen.

In den auf humanen Zellen basierenden Tests ER α CALUX[®] und AR CALUX[®] (Estrogen/Androgen Receptor Chemical-Activated Luciferase eXpression) sowie den hefebasierten R-YES und R-YAS (Recombinant-Yeast Estrogen/Androgen Screen) werden Rezeptor-vermittelte Effekte nachgewiesen. Durch die Einbringung eines humanen Estrogen/Androgen Rezeptors in die Hefen sowie eines sogenannten Reporter gens (für Luciferase bzw. Galactosidase) in beide Zelltypen wurden diese gentechnisch verändert. Eine Aktivierung oder Hemmung dieser Rezeptoren kann über die Intensitätsänderung des Lumineszenz-Signals (CALUX, Abb. 3 links) bzw. die Änderung der Absorption (YES/YAS) ermittelt werden. Ein weiterer Zelltest, der H295R Steroidgenese Test, kann Effekte auf die Produktion von Steroidhormonen aufdecken: Nach einer Belastung der menschlichen H295R-Zellen mit einer Testsubstanz wird die Produktion von Estradiol und Testosteron gemessen und mit den Ergebnissen einer unbelasteten Kontrolle verglichen. Zum besseren Verständnis der Wirkweise der Substanzen kann zusätzlich untersucht werden, wie die an der Steroidhormonproduktion beteiligten Gene durch die Substanz beeinflusst werden (Abb. 3 rechts).

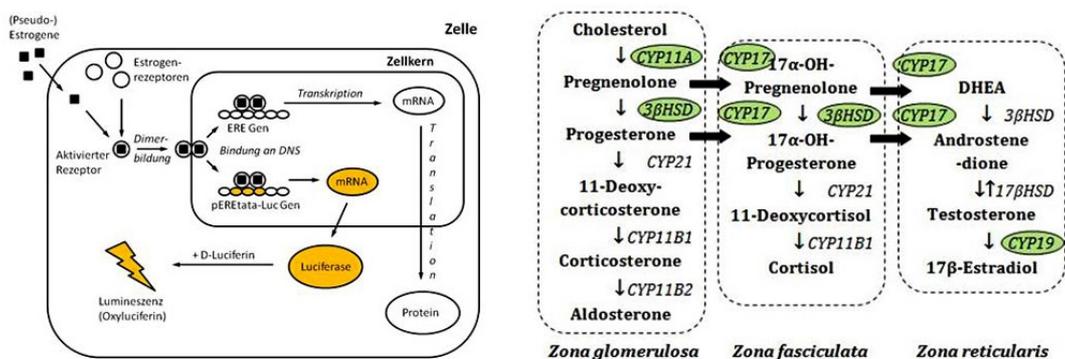


Abbildung 3: links: ER-CALUX - Schema zur Wirkweise des Testsystems (gelb) nach Legler (1999); rechts: H295R - Schema der Steroidgenese mit den zu untersuchenden Genen (grün)



Abbildung 4: *Potamopyrgus antipodarum* - Adulte und Jungtiere (Foto Robyn Draheim)

Das vierte Testsystem des Moduls kann einen adversen Einfluss auf die Vermehrung von Zwergdeckelschnecken (*Potamopyrgus antipodarum*) nachweisen. Die Schnecken dieser Art sind überwiegend weiblich und pflanzen sich durch Jungfernzeugung fort. Estrogene Effekte (erhöhte Embryonenzahl) bzw. androgene Effekte (verminderte Embryonenzahl) werden nach einer Belastungsdauer von 28 Tagen empirisch durch Auszählung der Nachkommen festgestellt (Abb. 4).

Mit diesen vier Testsystemen werden somit endokrine Effekte beginnend bei der Zelle bis hin zur Population umfassend nachgewiesen und dabei verschiedene Wirkmechanismen

(Rezeptor-gesteuert, Hormonproduktion, Genexpression, etc.) näher untersucht.

Zum Abschluss des Projekts wird aus allen Testsystemen der drei Module eine Testbatterie festgelegt und in einem Leitfaden zur Bewertung niedergeschrieben was relativ schnell eine Aussage über das Gefährdungspotenzial verschiedener Substanzen ermöglicht. Auf dieser Grundlage können wissenschaftlich basierte Maßnahmeoptionen zur gegebenenfalls notwendigen Minimierung der Schadstoffbelastung festgelegt werden um die Sicherheit unseres Trinkwassers zu gewährleisten.

Das Projekt wird gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung, Förderkennzeichen: 02WRS1282I

Kontakt:

Schlauer Fuchs



Dr. Alexander Eckhardt

Fachgebiet Toxikologie des Trink- und
Badebeckenwassers
Heinrich-Heine-Straße 12
08645 Bad Elster
Tel.: +49 (0)37437 76226
E-mail: alexander.eckhardt@uba.de



Jochen Kuckelkorn

RWTH Aachen University
Institute for Environmental Research
(Biology V) Department of Ecosystem
Analyses - ESA
Worringerweg 1
52074 Aachen
Tel.: +49 (0)241 80-26686
E-mail: jochen.kuckelkorn@bio5.rwth-aachen.de



Eva-Maria Prantl

Wasser Labor (WLM) RheinEnergie AG
50606 Köln
Tel.: +49 (0)221 178-1343
E-mail: em.prantl@rheinenergie.com

Daniel Stengel

Aquatic Ecology & Toxicology Centre for
Organismal Studies (COS)
University of Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 504
69120 Heidelberg
Tel.: +49 (0)6221 5456-29 / -59
E-mail: Daniel.stengel@cos.uni-heidelberg.de

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu
diesem Beitrag lautete:

Aus welchem Test ging der Ames-
Fluktuations-Test hervor?



<http://www.bmbf.riskwa.de/de/1297.php>

Umwelt
Bundesamt

<http://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/trinkwasser/trinkwasserqualitaet/toxikologie-des-trinkwassers/projekt-tox-box>