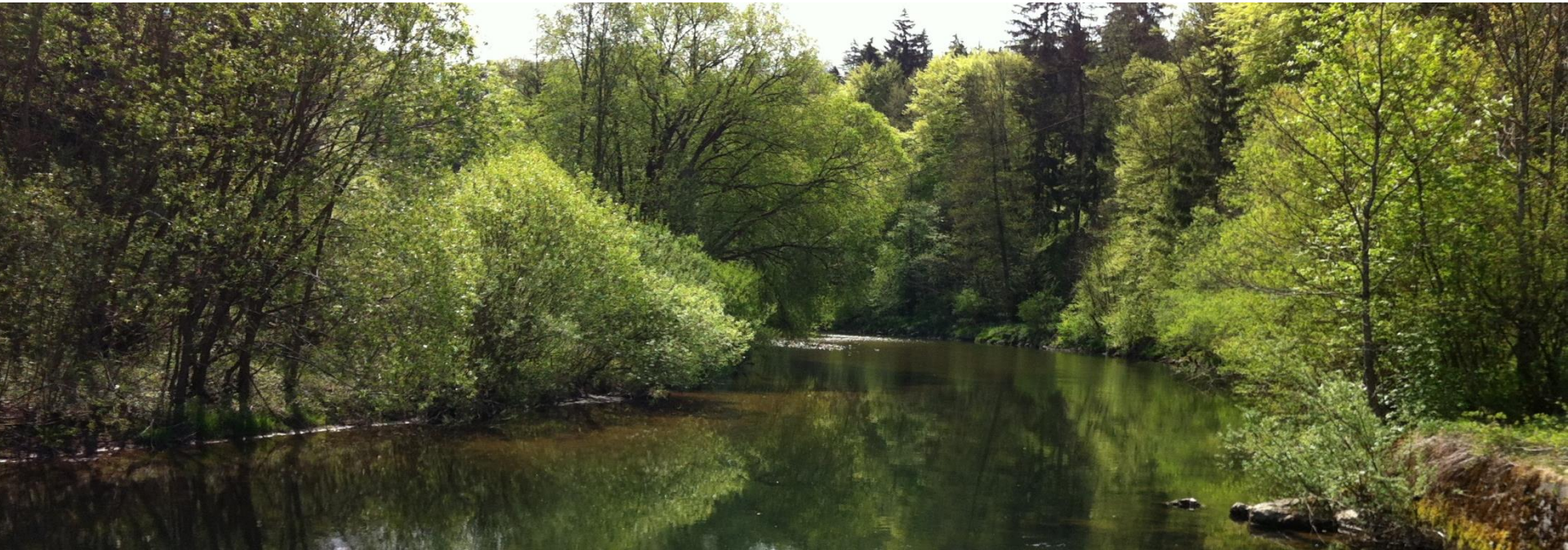


Biotests *in vivo* und *in vitro*

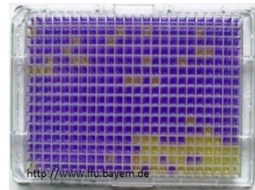
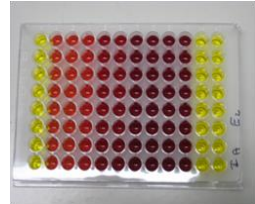


Sabrina Giebner (Uni Frankfurt) und **Paul Thellmann** (Uni Tübingen),
Ludek Blaha (RECOTOX Brno), **Bertram Kuch** (Uni Stuttgart)

Projekttreffen SchussenAktivplus am 12.10.2016 in Tübingen

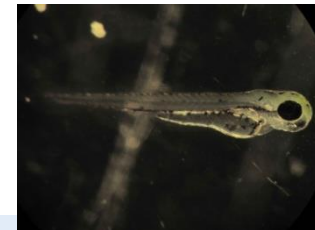
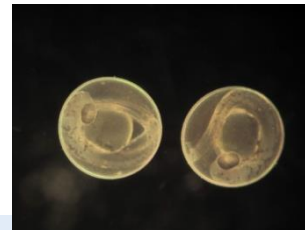
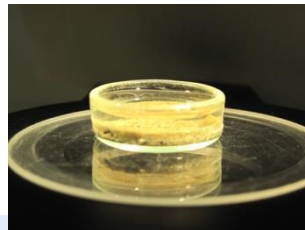
Wirkpotentialtests

- **(Anti-)Östrogenität** (E-Screen, Reporter-genassays mit MVLN und Hefezellen)
- **(Anti-)Androgenität** (Reporter-genassays mit Hefezellen)
- **Dioxin-ähnliche Toxizität** (Reporter-genassay mit Hefe- und Rattenzellen)
- **Mutagenität** (Ames-Fluktuationstest und SOS-Chromotest)
- **Reproduktionstoxizität**
 - Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*
 - Reproduktionstest mit *Lumbriculus variegatus*
- **Phytotoxizität** (Wachstumsinhibitionstest mit *Lemna minor*)



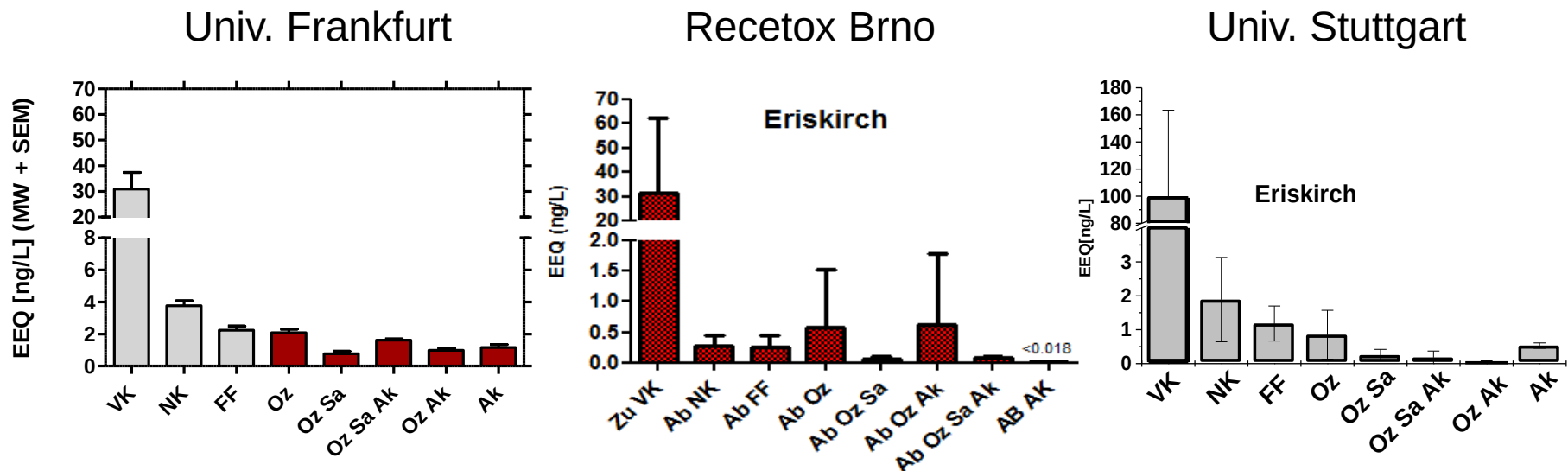
Fisch Embryo Test mit dem Zebraabärbling *Danio rerio*

- Exposition von befruchteten Fischeiern gegenüber nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben der untersuchten Freilandprobestellen sowie Abwasserproben der KA Langwiese
- Expositionszeitraum: 96 h
- Durchführung in Anlehnung an OECD Guideline 236; Anwendung auf Sedimente in Anlehnung an Hollert et al. (2003)
- Endpunkte: Mortalitätsrate, Schlupfrate sowie Rate der Entwicklungsdefizite und Herzschlagrate zu definierten Zeitpunkten



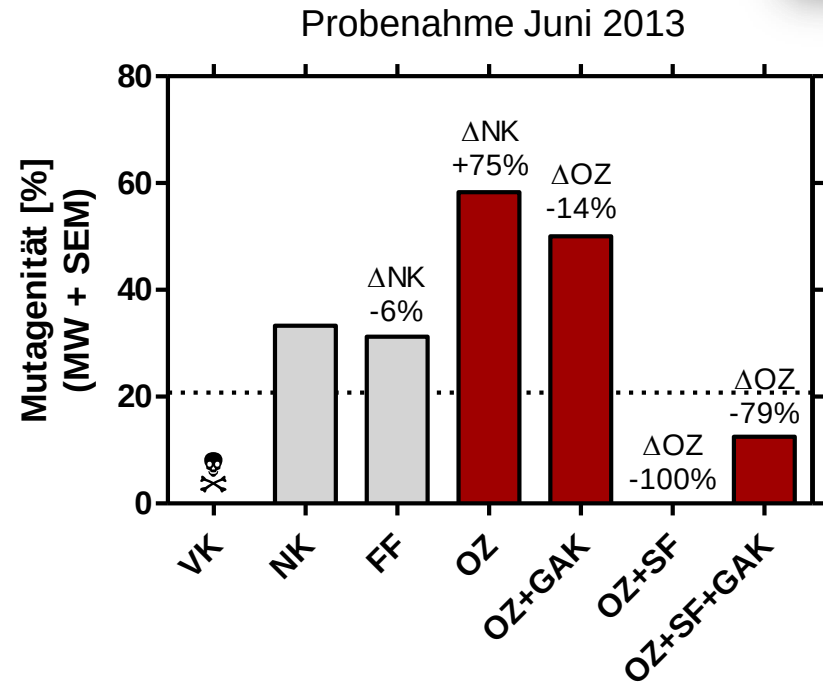
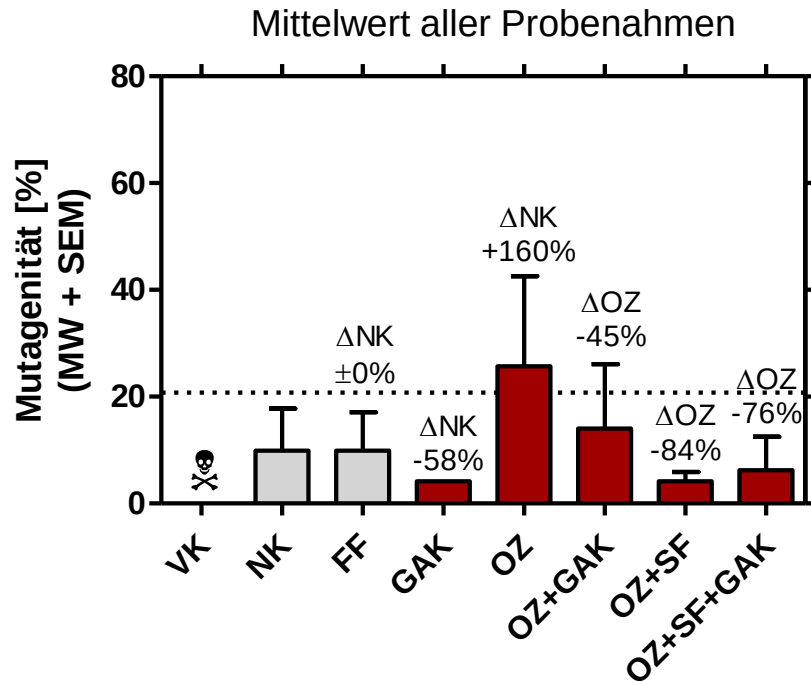
Vergleich der In-vitro-Tests

- Gute Übereinstimmung der Befunde in den Reportergenassays (und E-Screen)
- Insbesondere deutliche Reduktion der Östrogenität aller erweiterten Abwasserreinigungsmethoden





Mutagene Wirkpotentiale



Erhöhte Mutagenität nach Ozonbehandlung
Reduktion der Mutagenität durch anschließenden Sandfilter und
zusätzliche Aktivkohle

Zusatzuntersuchung am RBF Tett nang

2 Abwasserzuläufe:

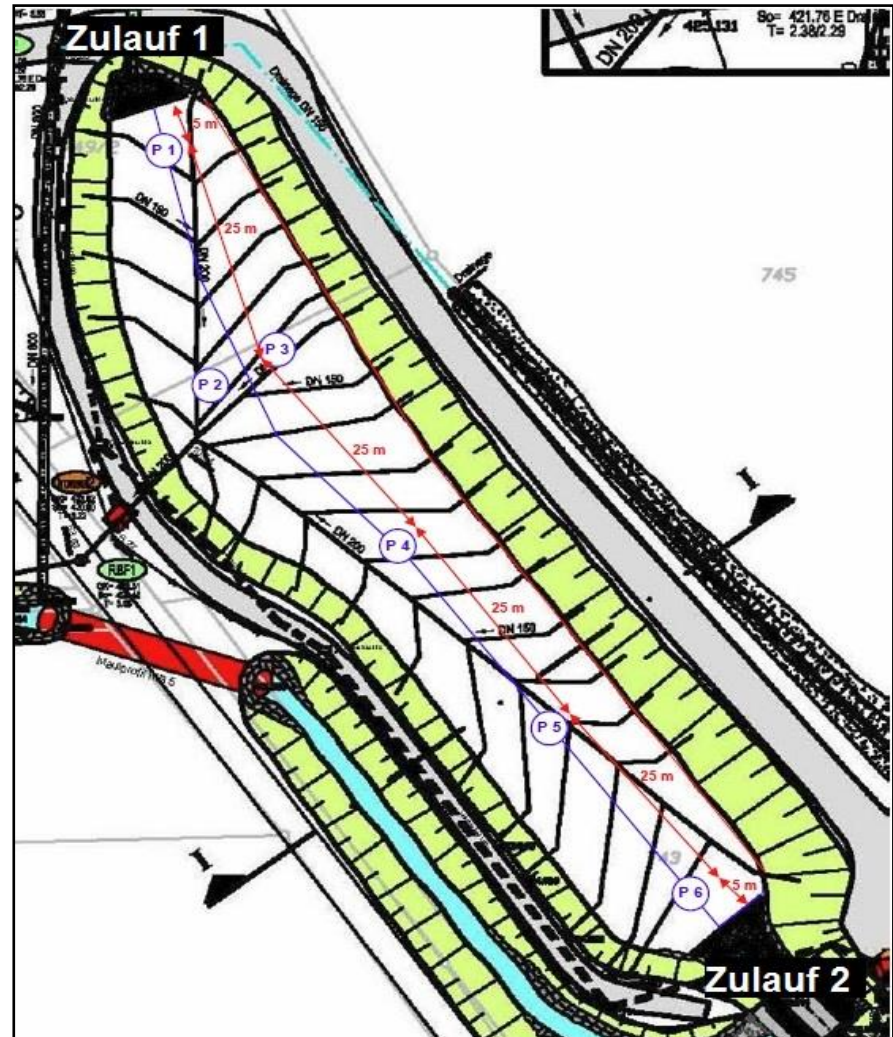
- Zulauf 1: 10% Abwasser
- Zulauf 2: 90% Abwasser

6 Probenahmestellen:

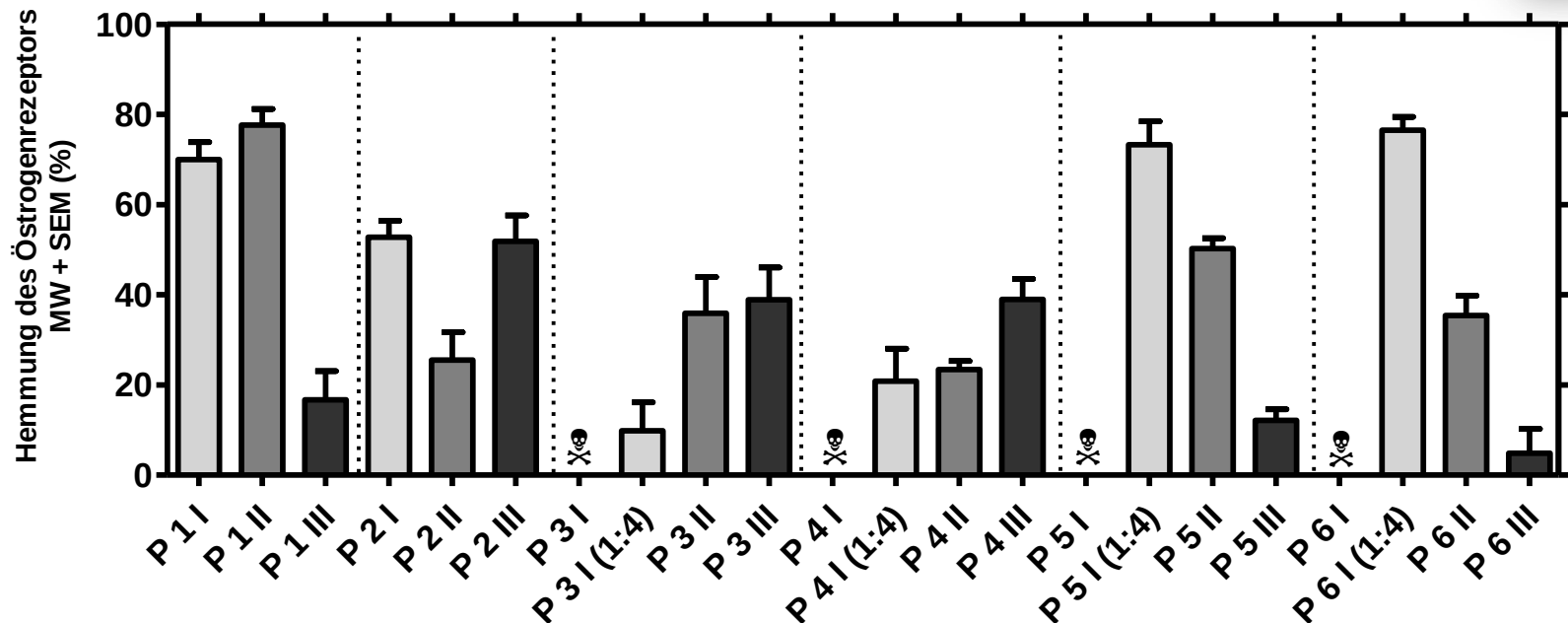
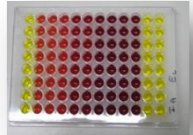
- 5 m Entfernung von Zulauf 1 (**P1**)
- 30 m Entfernung von Zulauf 1 (**P2**)
- 30 m Entfernung von Zulauf 1 und 5 m Entfernung von Zulauf 2 (**P3**)
- 55 m Entfernung von Zulauf 1 und Zulauf 2 (**P4**)
- 30 m Entfernung von Zulauf 2 (**P5**)
- 5 m Entfernung von Zulauf 2 (**P6**)

Drei Horizontttiefen:

- Tiefe 1: 0 – 30 cm (**I**)
- Tiefe 2: 30 – 60 cm (**II**)
- Tiefe 3: 60 – 90 cm (**III**)

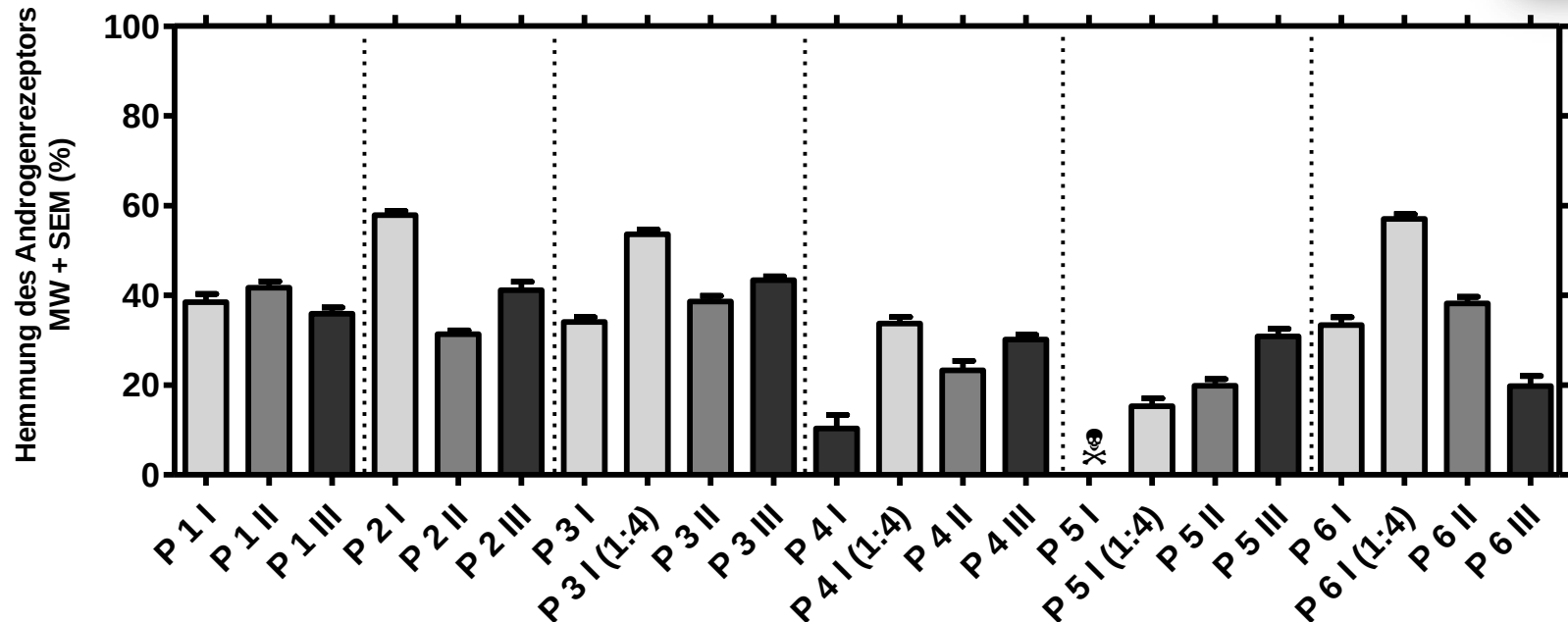
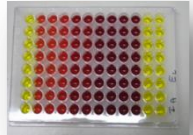


Anti-östrogene Wirkpotentiale



Erhöhte anti-östrogene Wirkpotentiale
(4,86 – 77,7% Hemmung des Östrogenrezeptors) sowie erhöhte Zytotoxizität
Abnahme von starken anti-östrogenen Wirkpotentialen mit zunehmender
Horizonttiefe

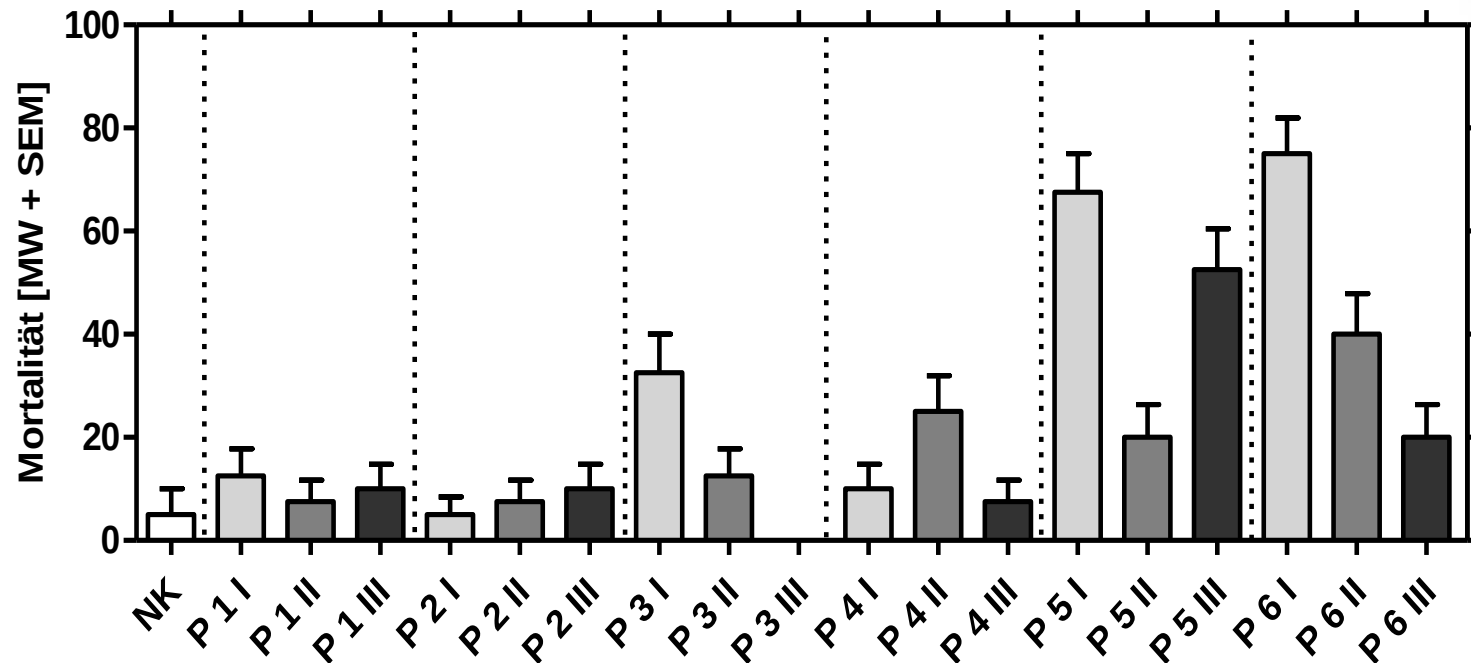
Anti-androgene Wirkpotentiale



Erhöhte anti-androgene Wirkpotentiale
(10,4 – 57,9% Hemmung des Androgenrezeptors)

Kein eindeutiger Trend hinsichtlich des Auftretens endokriner Aktivitäten in den verschiedenen Bodenhorizonten

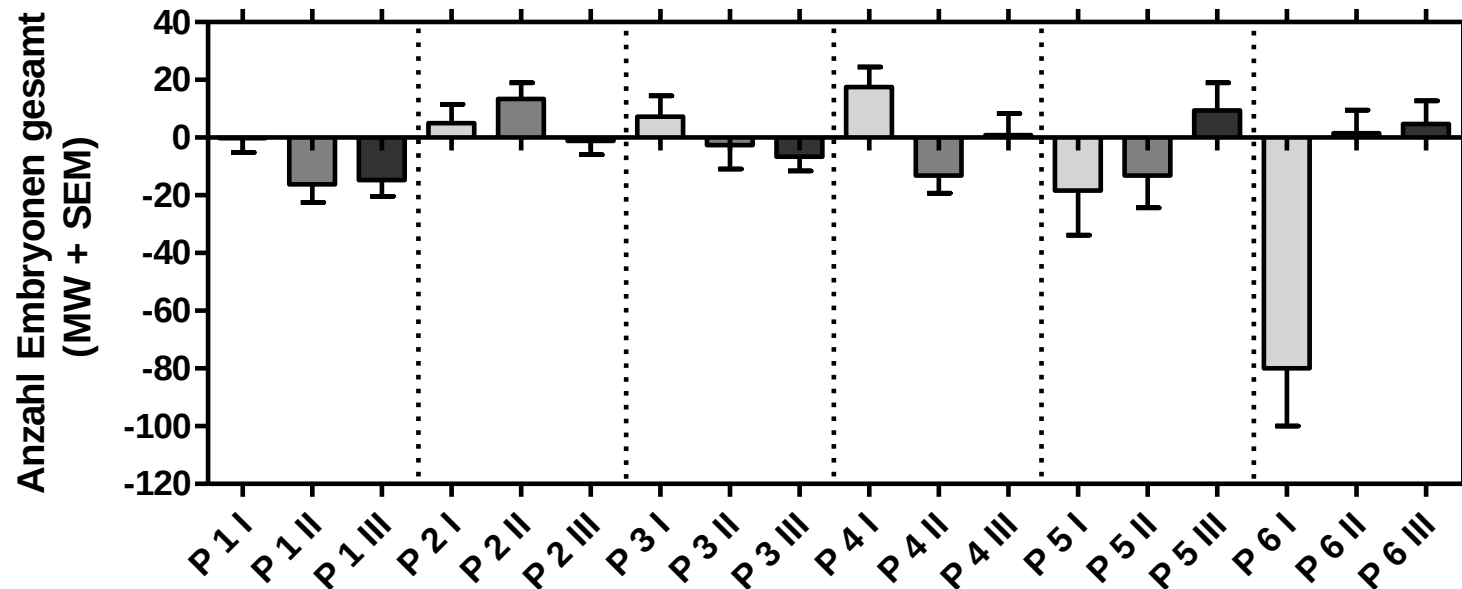
Reproduktionstoxische Wirkpotentiale (Mortalität)



Erhöhte Mortalität (20 – 75%) bei den Schnecken
insbesondere an den Probestellen 5 und 6

Abnahme von starken reproduktionstoxischen Wirkpotentialen mit
zunehmender Horizonttiefe

Reproduktionstoxische Wirkpotentiale (Reproduktion)

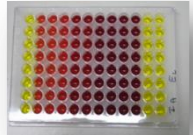


Keine Reduktion der Reproduktionstoxizität in Voruntersuchungen
Hohe Reproduktionstoxizität an Probestelle 6 I (80% weniger Embryonen als Kontrolle)
Komplette Elimination der Reproduktionstoxizität in Horizonttiefen II und III

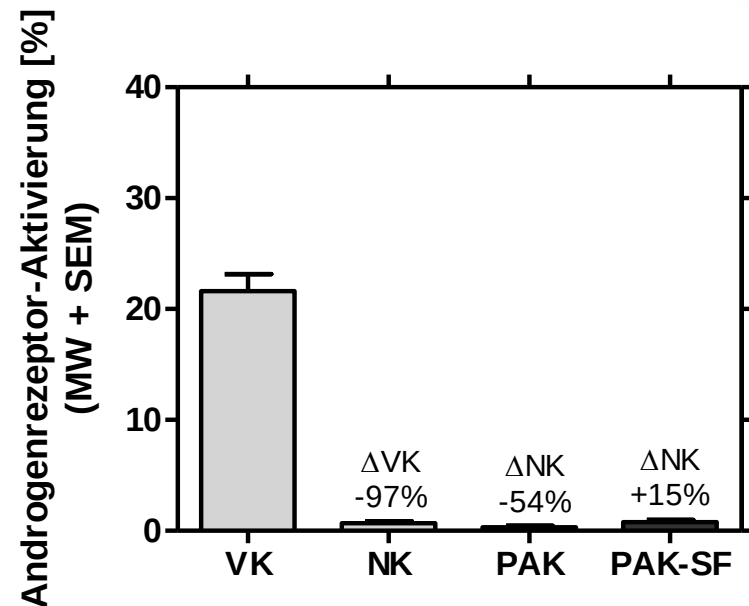
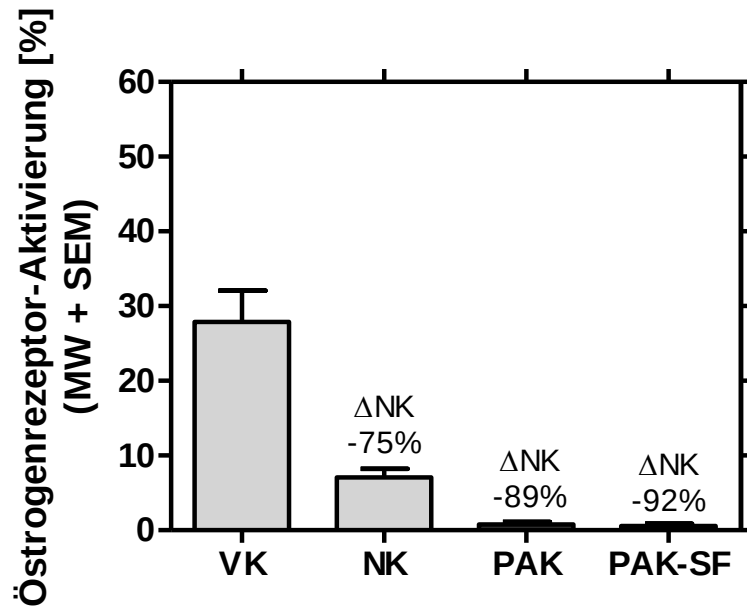


Zusammenfassung Zusatzuntersuchung am RBF Tettnang

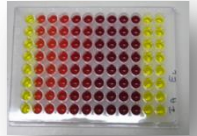
- Keine **östrogenen und androgenen Wirkpotentiale** nachweisbar
- Höchste anti-östrogene und reproduktionstoxische Wirkpotentiale an **Probestellen 5 und 6** (Erwartung bestätigt)
- Abnahme von **starken endokrinen und toxischen Wirkpotentiale** mit zunehmender Horizonttiefe (Erwartung bestätigt)
- Kein eindeutiger Trend hinsichtlich in den verschiedenen Horizonttiefen bei **schwachen endokrinen und toxischen Wirkpotentialen**



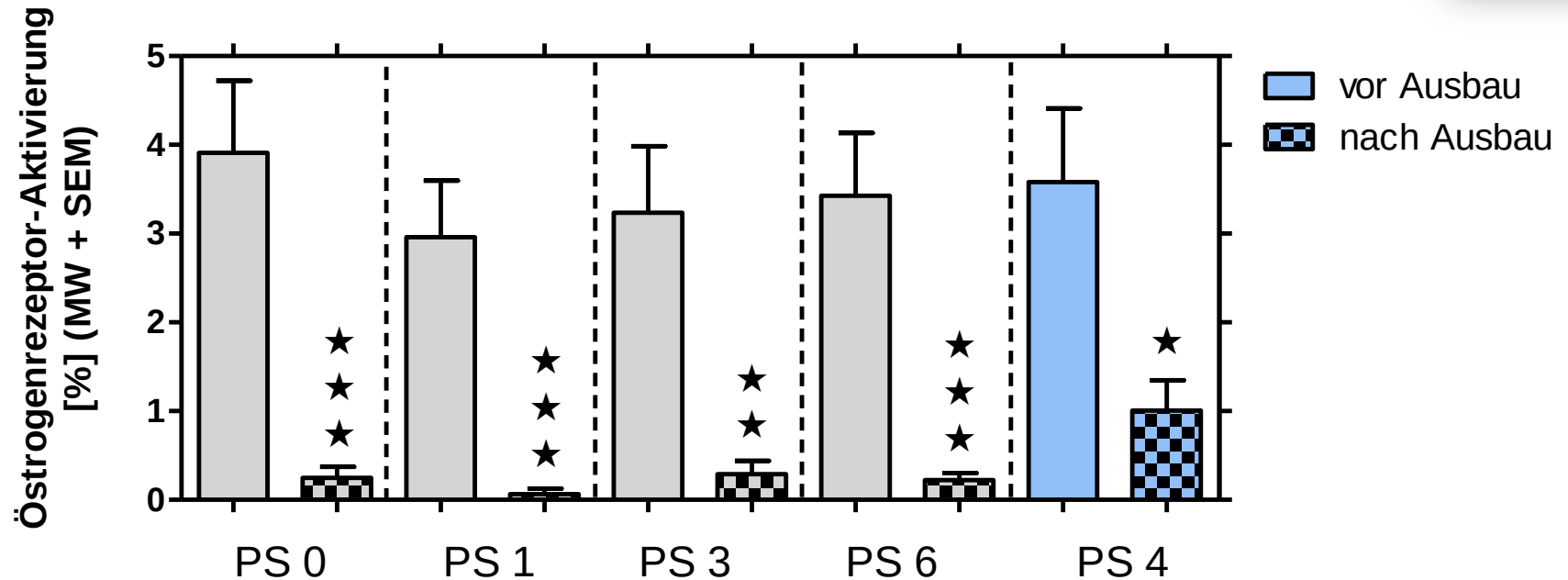
Östrogene und androgene Wirkpotentiale (Abwasser)



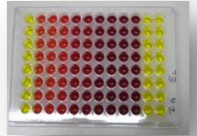
Effektive Reduktion östrogenen und androgenen Aktivität durch konv. Reinigung
Erweiterte Behandlungen reduzieren östrogene Aktivität weiter (89-92%)
Vergleichbare Ergebnisse in Pilotanlage Eriskirch



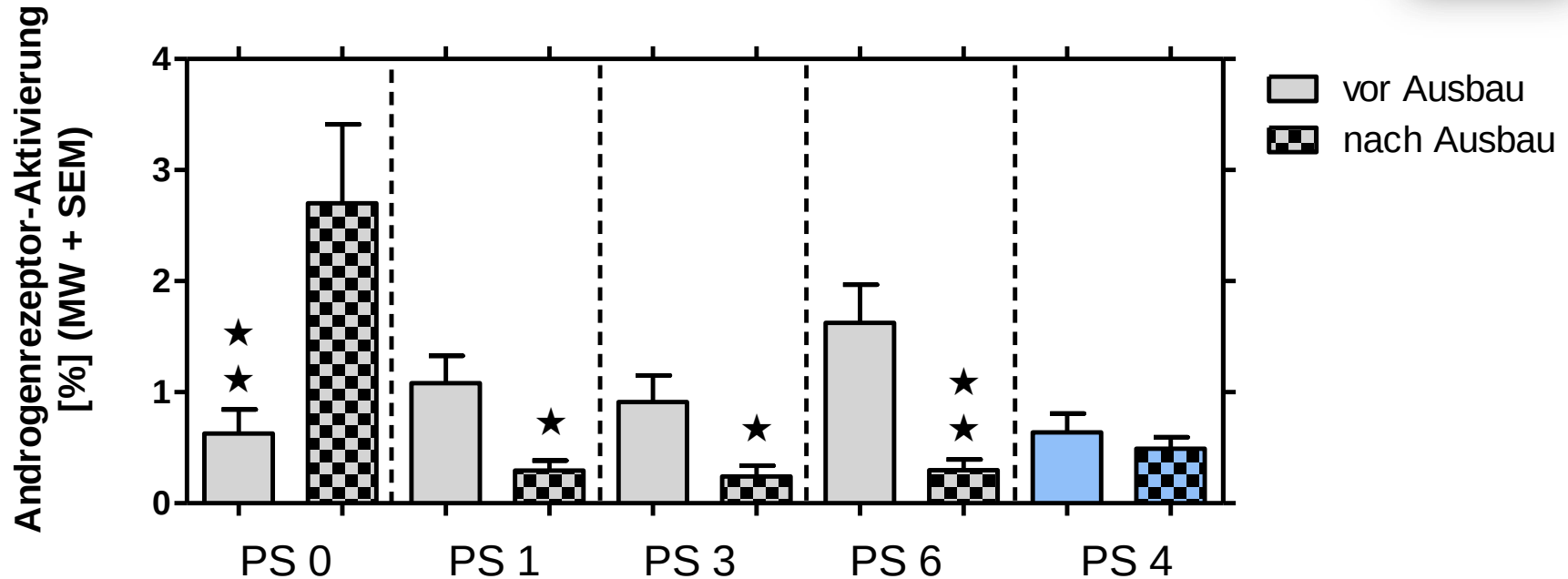
Östrogene Wirkpotentiale (Freiland)



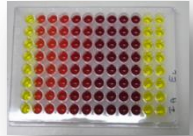
Signifikante Reduktion östrogener Wirkpotentiale nach Ausbau der Kläranlage,
aber an allen PS



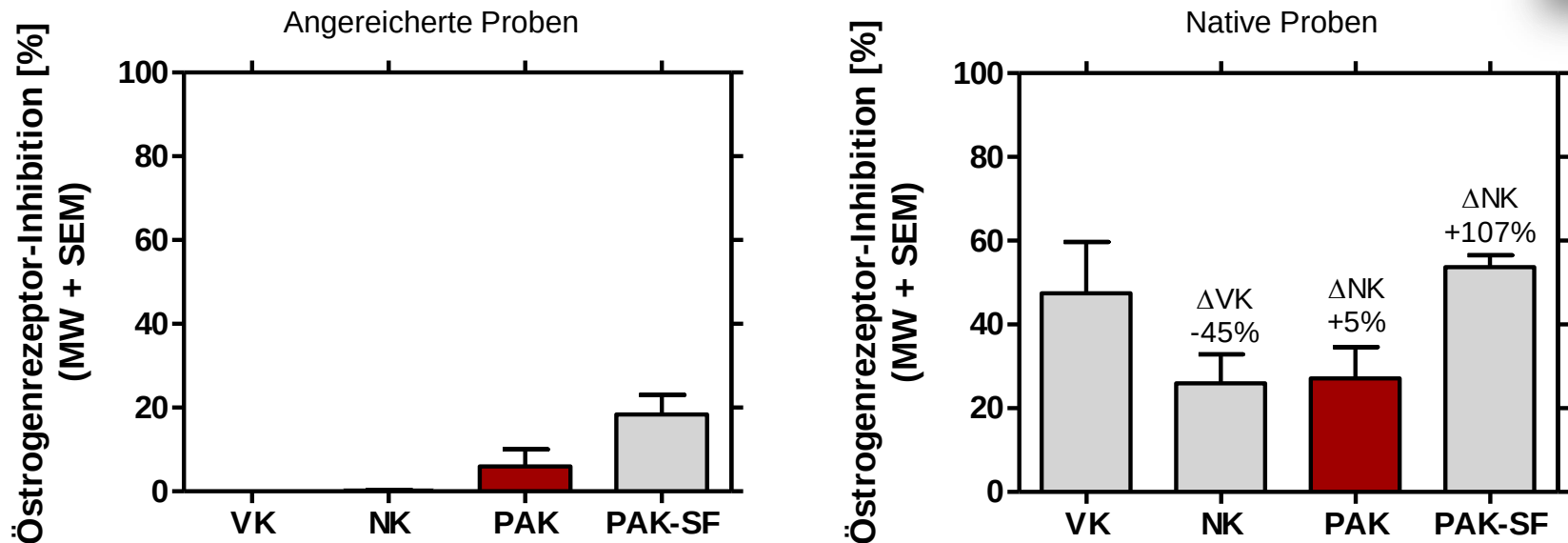
Androgene Wirkpotentiale (Freiland)



Geringe androgene Wirkpotentiale in Freilandproben
Rückgang der Androgenität in Schussen und Argen, außer an PS 0

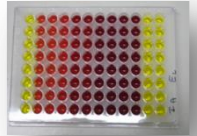


Anti-östrogene Wirkpotentiale (Abwasser)

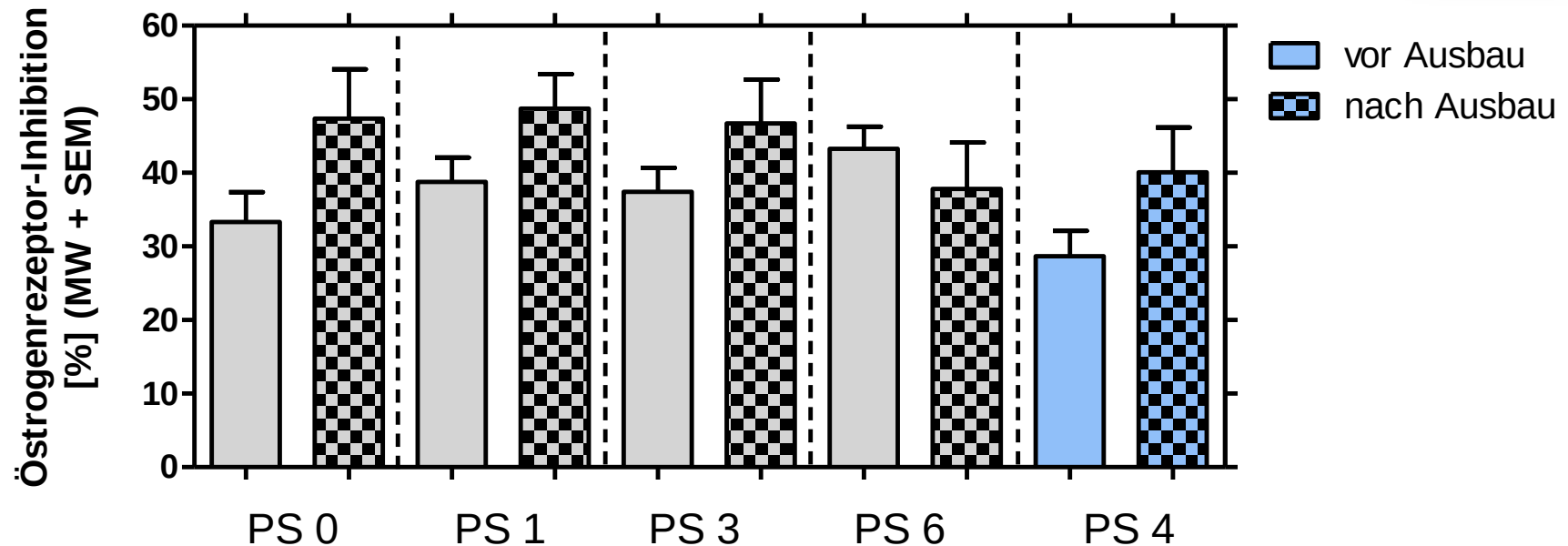


Geringe anti-östrogene Aktivität in Extrakten nachweisbar

Aktivität in nativen Proben wird durch konv. Reinigung um 45% reduziert, steigt nach erweiterten Behandlungen zumeist wieder an
Vergleichbare Ergebnisse in Pilotanlage Eriskirch



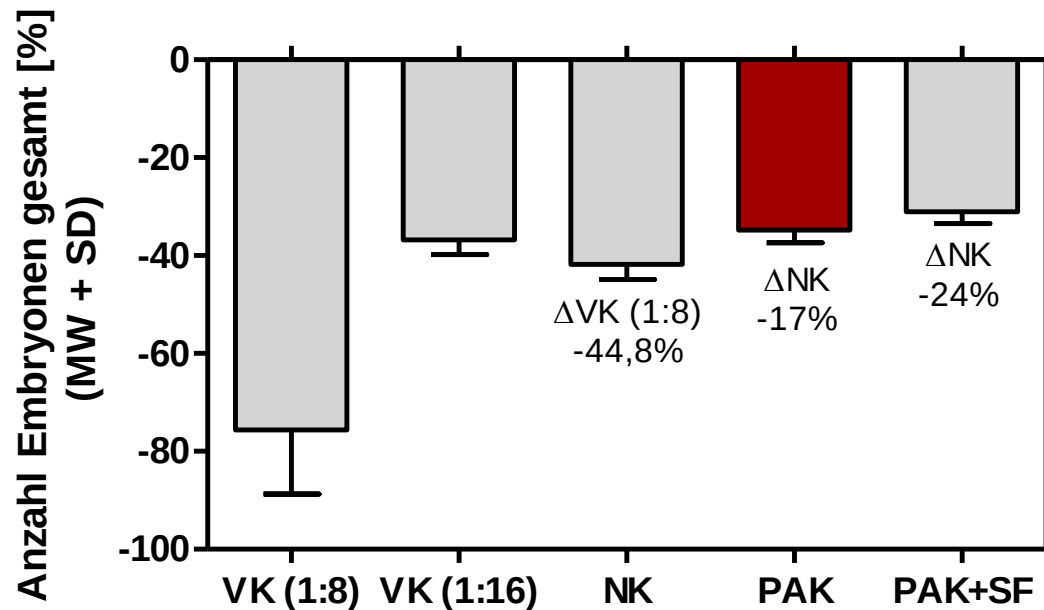
Anti-östrogene Wirkpotentiale (Freiland)



Hohe anti-östrogene Wirkpotentiale in allen Freilandproben
Zunahme der Anti-östrogenität nach Ausbau der Kläranlage (alle PS, außer PS 6)



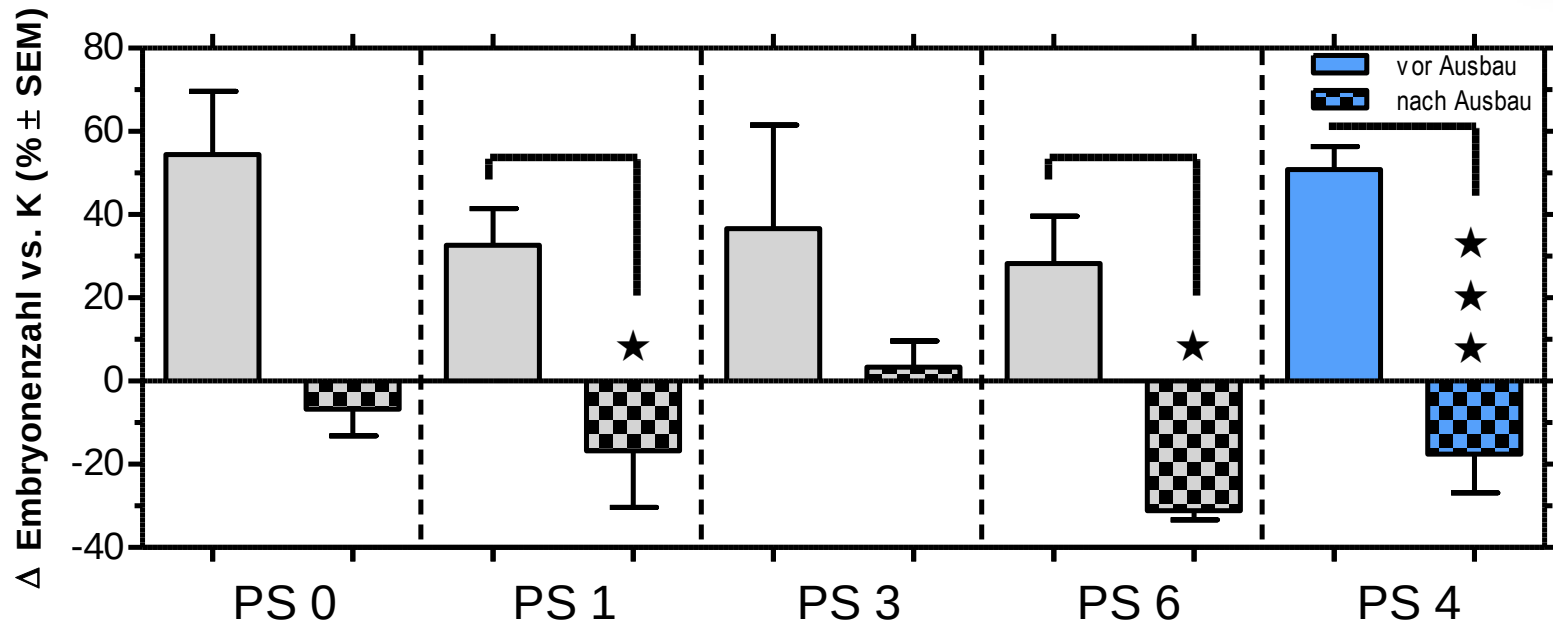
Reproduktionstoxische Wirkpotentiale



Erhöhte Reproduktionstoxizität in allen Abwasserproben im Vergleich zur Laborkontrolle

Geringe Reduktion der Reproduktionstoxizität durch PAK+SF, keine Reduktion in Pilotanlage Eriskirch

Reproduktionstoxische Wirkpotentiale

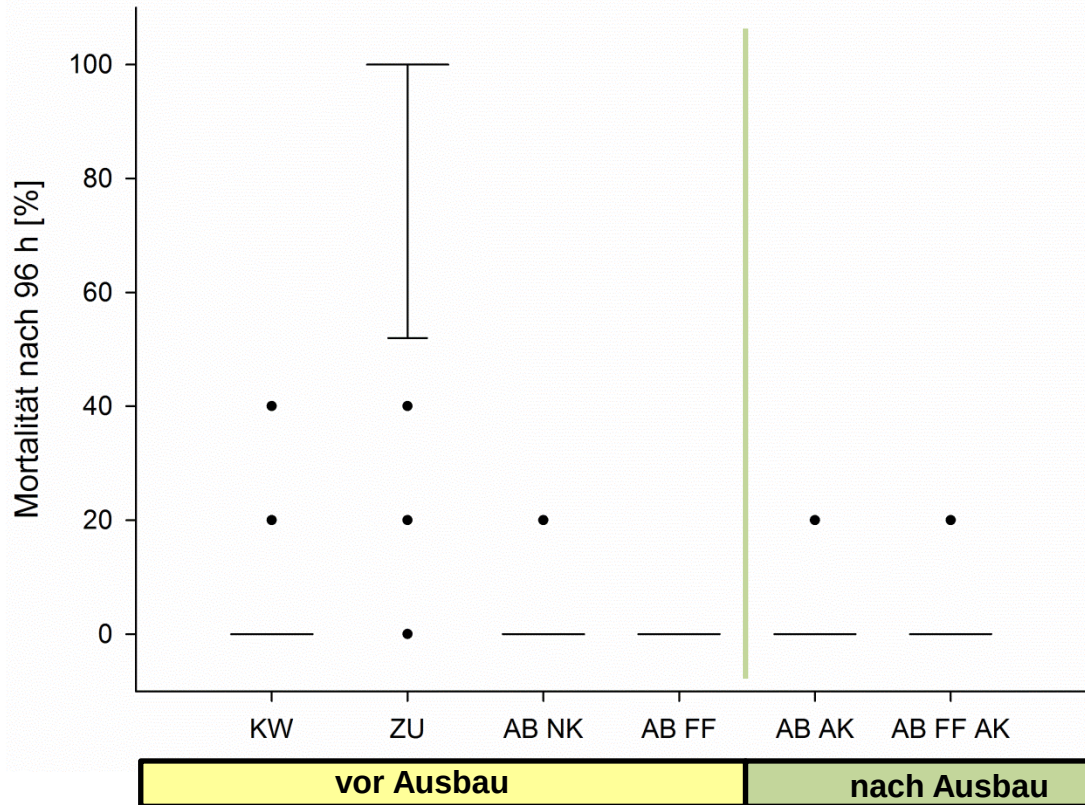


Erhöhte Embryonenzahlen vor dem Ausbau gehen danach auf Niveau der Kontrolle zurück – an allen Probestellen



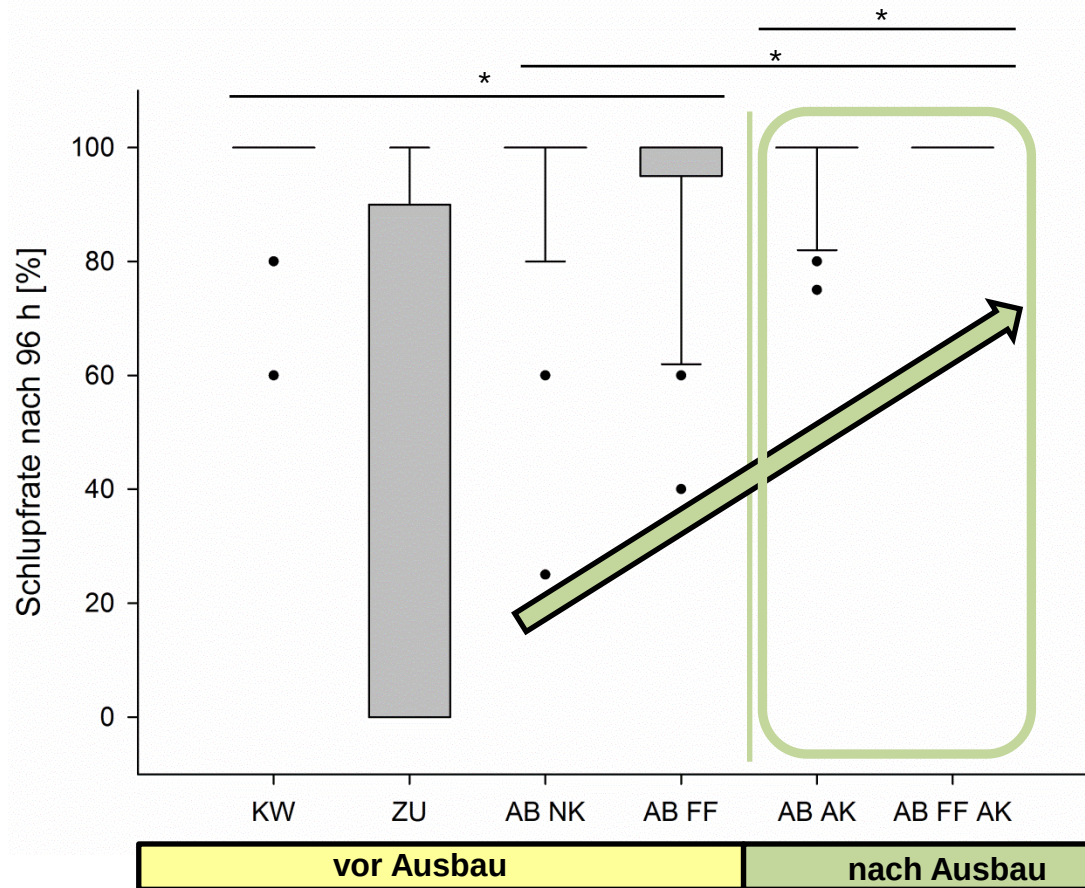
Zusammenfassung Langzeiteffekte KA Langwiese

- Sehr gute Elimination **östrogener Wirkpotentiale** nach Ausbau
- Konv. Reinigung reduziert bereits wirkungsvoll **androgene Wirkpotentiale**
- Keine Reduktion **anti-östrogener Wirkpotentiale** im Abwasser und erhöhte Aktivitäten im Freiland nach Ausbau
- Keine Reduktion **reproduktionstoxischer Wirkpotentiale** im Abwasser, aber deutliche Reduktion reproduktionsfördernder Effekte im Freiland
- Geringe Veränderungen in Freilandproben mit ***L. variagatus* und *L. minor***



- KW** = Laborkontrolle
- ZU** = Zulauf nach mech. Vorklärung
- AB NK** = Ablauf Nachklärbecken
- AB FF** = Ablauf Flockungsfilter
- AB AK** = Ablauf Aktivkohlefilterung
- AB AK FF** = Ablauf Flockungsfilter nach Aktivkohlefilterung

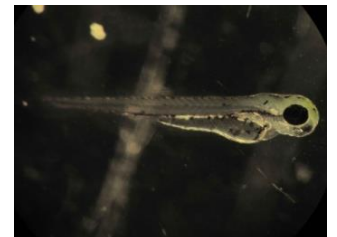
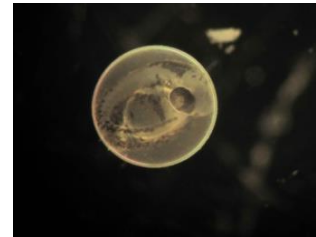
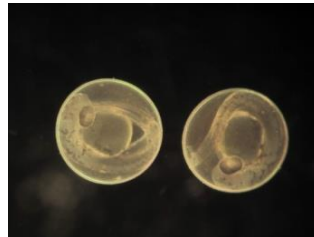
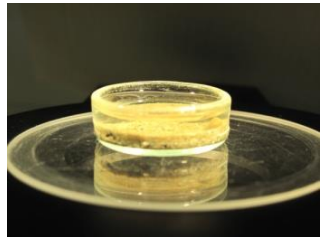
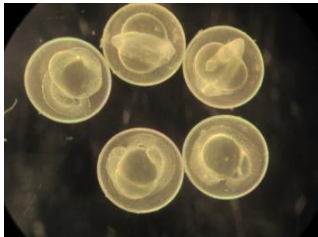
- ➔ Hohe entwicklungstoxische Potentiale im Zulauf
- ➔ Bereits gute Verbesserung nach konventioneller Reinigung
- ➔ Keine weitere Reduktion nach dem Ausbau

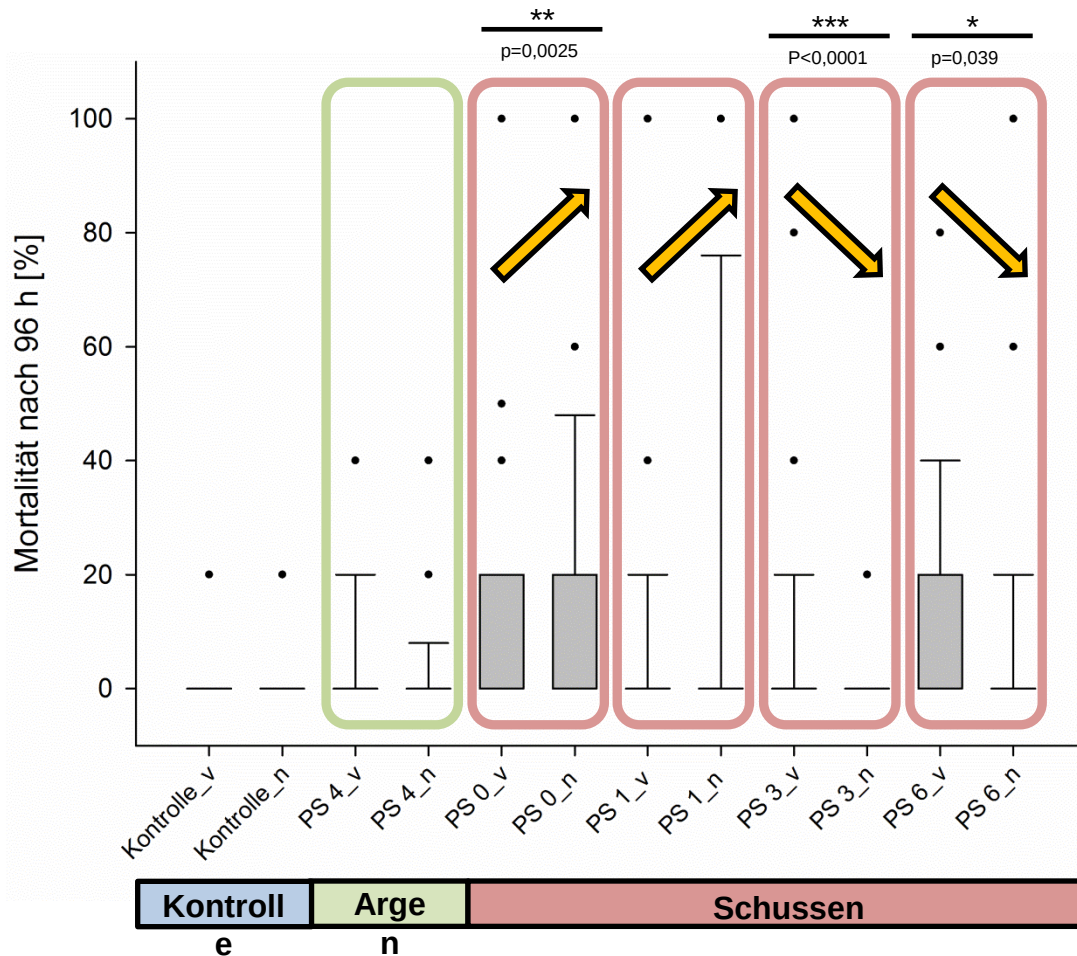


- ➔ Hohe entwicklungstoxische Potentiale im Zulauf
- ➔ Bereits gute Verbesserung nach konventioneller Reinigung
- ➔ Signifikante Verbesserung im Ablauf nach Ausbau

Zusammenfassung

- ➔ Konventionelle Reinigung bereits sehr effektiv
- ➔ Keine Verbesserung bzgl. der Mortalität durch KA Ausbau
- ➔ signifikante Reduktion embryotoxischer Potentiale bei sublethalen Endpunkten durch zusätzliche PAK-Stufe

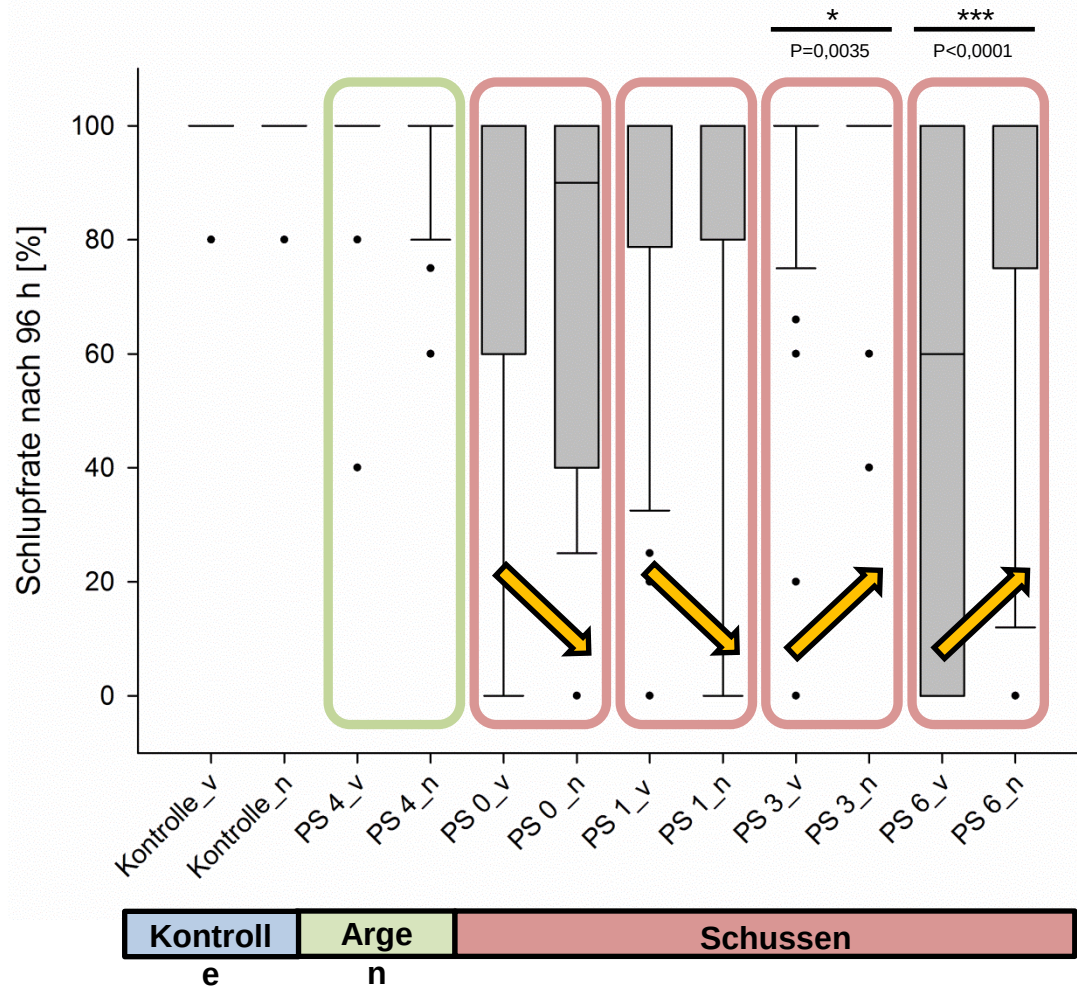




v = Vor Ausbau der KA Langwiese

n = Nach Ausbau der KA Langwiese

- ➡ Erhöhung der Mortalität an PS 0 und PS 1
- ➡ Signifikante Verbesserung an PS 3 und PS 6
- ➡ Leichte Verbesserung an Referenzstelle PS 4



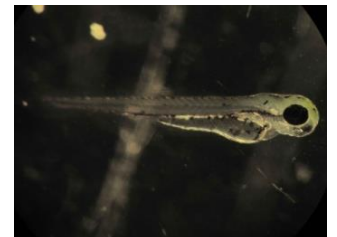
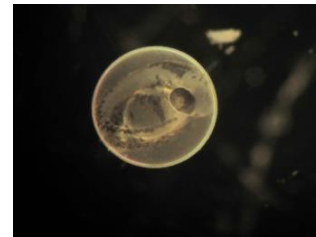
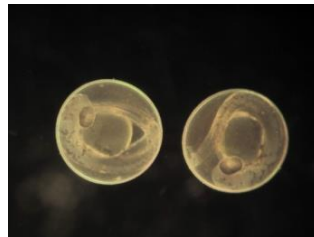
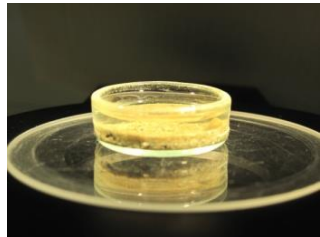
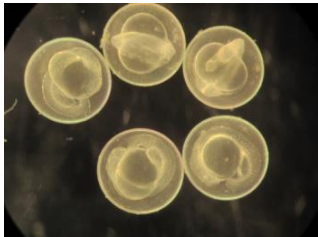
v = **Vor** Ausbau der KA Langwiese

n = **Nach** Ausbau der KA Langwiese

- ➔ Abnahme der Schlupfrate an PS 0 und PS 1
- ➔ Signifikante Verbesserung an PS 3 und PS 6
- ➔ Keine Verbesserung an Referenzstelle PS 4

Zusammenfassung

- ➔ **Signifikante Reduktion der embryotoxischen Potentiale (Schlupfrate + Mortalität) an PS 3 und PS 6 seit Herbst 2013**
- ➔ **Sedimente integrieren Belastungen über langen Zeitraum**
- ➔ **Ergebnisse deuten auf eine Verbesserung durch den Ausbau der KA Langwiese hin.**





Vor- und Nachteile der verschiedenen Technologien

- Östrogene Wirkpotentiale wurden durch **Ozon- und Aktivkohlebehandlung vergleichbar gut** reduziert
- Reproduktionstoxische und anti-östrogene Wirkpotentiale konnten durch **keine untersuchte Technologie** effektiv reduziert werden
- Ozonbehandlung führt zu **erhöhter Mutagenität**, die durch Sandfilter wieder eliminiert wird
 - **Nachbehandlungsstufe unbedingt notwendig**
- Die **Kombination aus mehreren Technologien** führte nicht zu einer verbesserten Reduktion von Wirkpotentialen



Empfehlungen

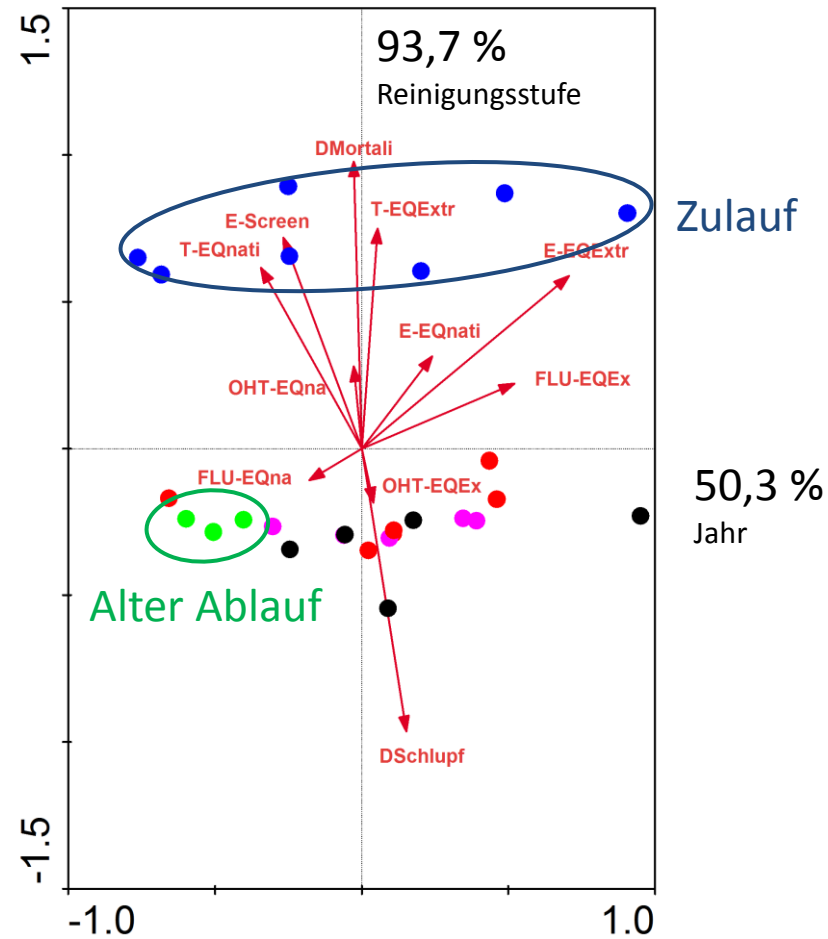
- Einsatz von Ozon und Aktivkohle ist vergleichbar effektiv, ihre Wirksamkeit jedoch substanzabhängig
- Ozonierung mit leichten Kostenvorteilen, aber Bildung von toxischen Transformationsprodukten möglich

Empfehlung bei Wahl der Technologie:
Abwägung im Einzelfall

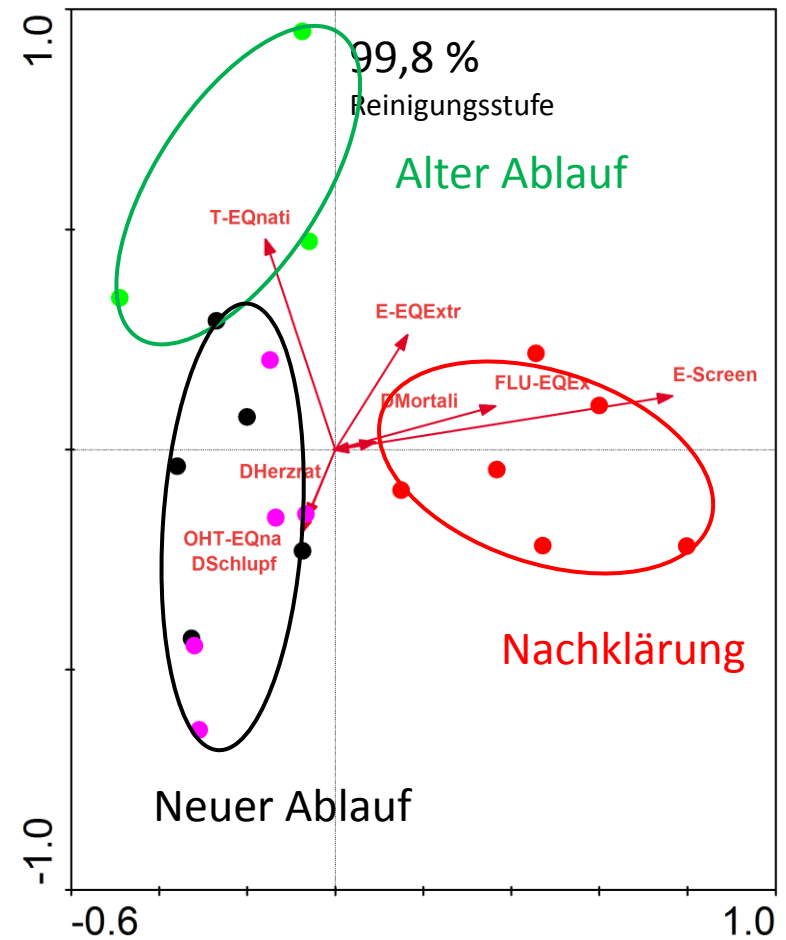
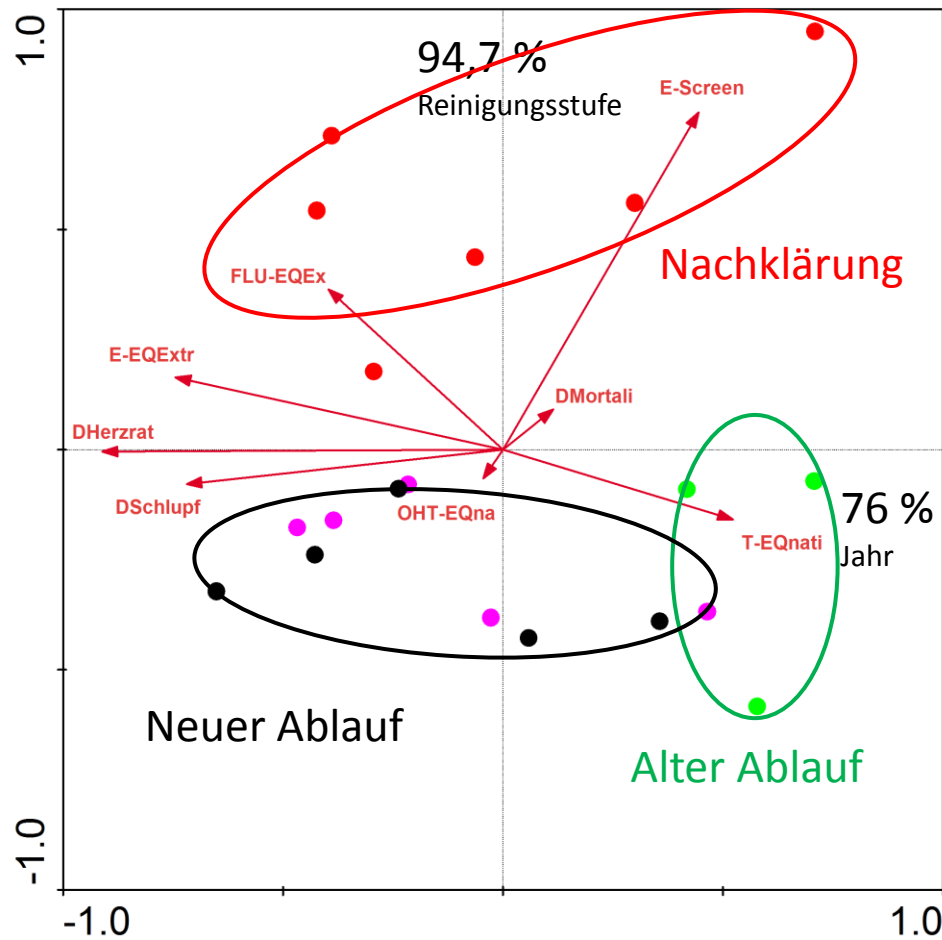


Wirkpotentiale	Effektivste Technologie	Bewertung der PAK RV (1 sehr gut – 5 sehr schlecht)	Bewertung des RBF Tettngang (1 sehr gut – 5 sehr schlecht)	Empfehlung der 4. Reinigungsstufe (1 unbedingt – 5 nicht notwendig)
Mutagenität	GAK	x	x	2-3 (KA-abhängig)
Östrogenität (YES)	PAK+SF	1	x	1
Östrogenität (E-Screen)	OZ+AK	1	1	1
Östrogenität (MVLN)	PAK	1	2	1
Antiöstrogenität	OZ	5	4	4
Androgenität	NK	x	x	5
Antiandrogenität	-	x	x	5
Reproduktionstoxizität	PAK+SF	4	1	4
Embryotoxizität	PAK+SF	3	----	2-3

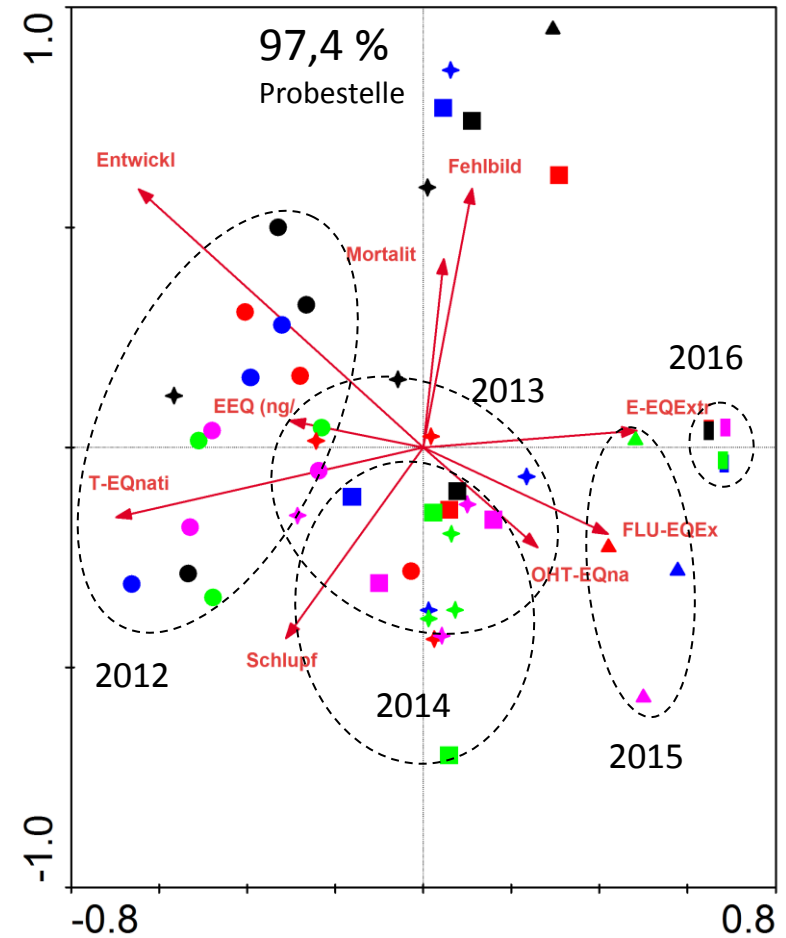
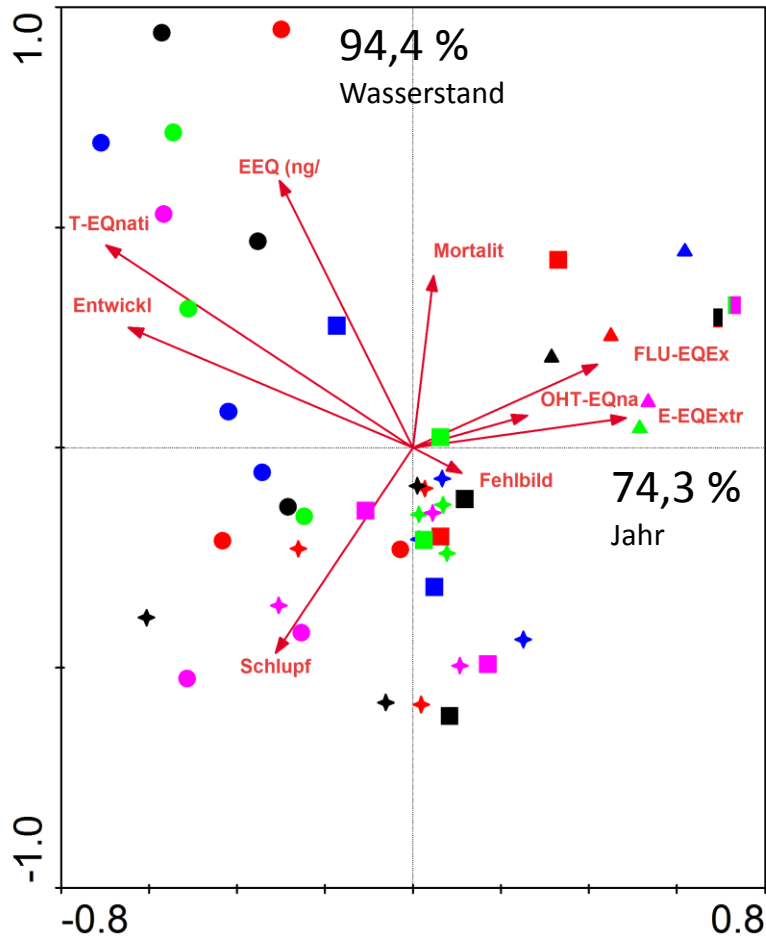
X: Keine Wirkpotentiale nachweisbar



Zulauf: blau, Nachklärung: rot, Sandfilter: grün,
 Aktivkohle: violett, Sandfilter + Aktivkohle: schwarz



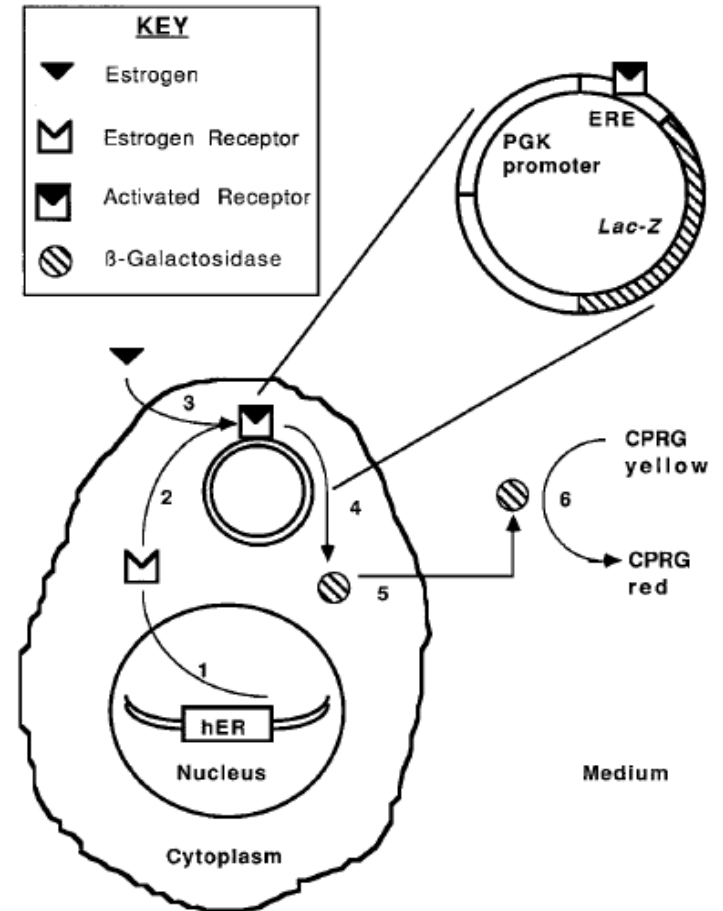
Zulauf: blau, Nachklärung: rot, Sandfilter: grün,
 Aktivkohle: violett, Sandfilter + Aktivkohle: schwarz



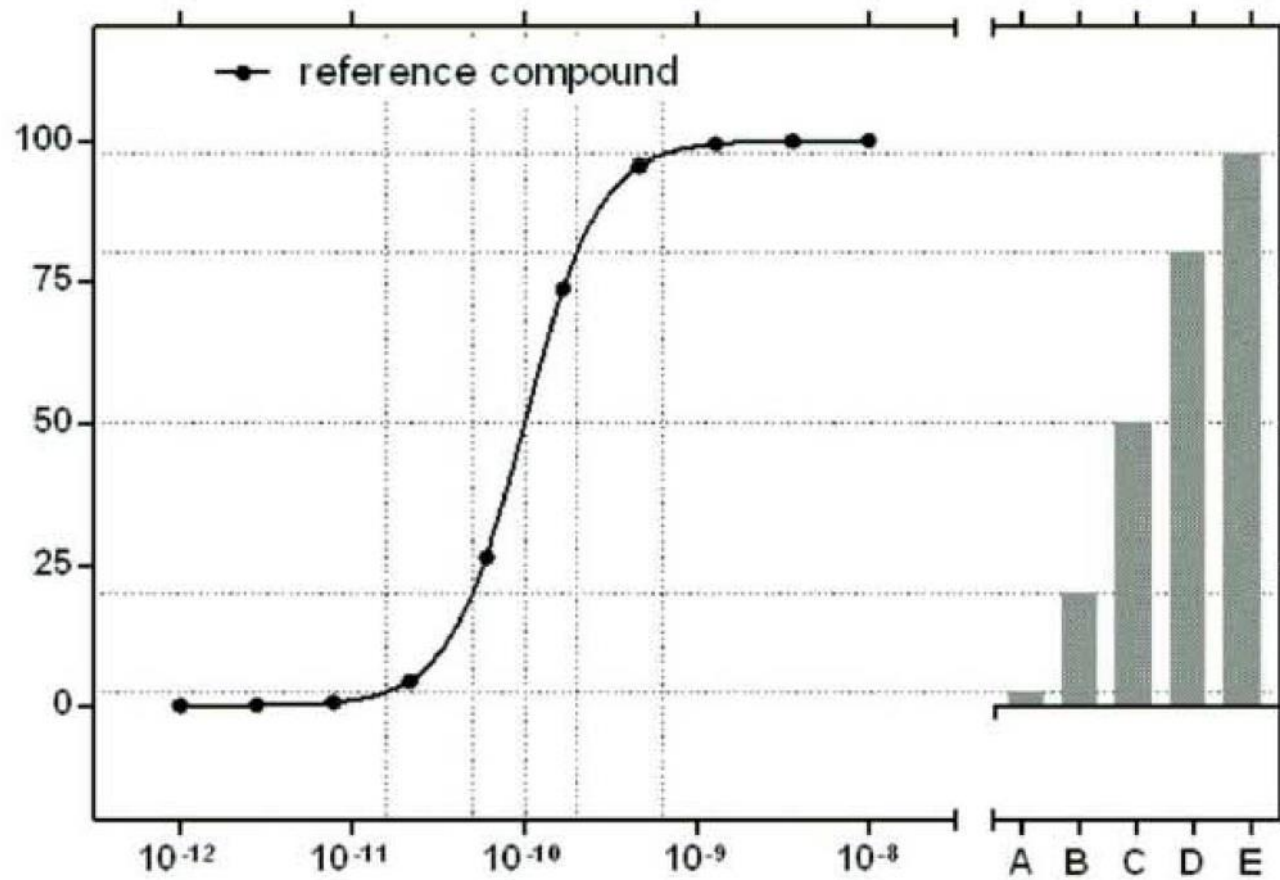
P0: blau, P1: rot, P3: grün, P4: violett, P6: schwarz

Testprinzip der Hefezellassays

- (1) Expression des Gens für humanen Östrogenrezeptor
- (2)+(3) Bindung des durch einen Liganden aktivierten Rezeptors an das ERE
- (4) Expression des lacZ -Gens und Bildung der β -Galactosidase
- (5) Sekretion der β -Galactosidase in Umgebungsmedium
- (6) Umwandlung von CPRG (gelb) in Chlorphenolrot (rot)

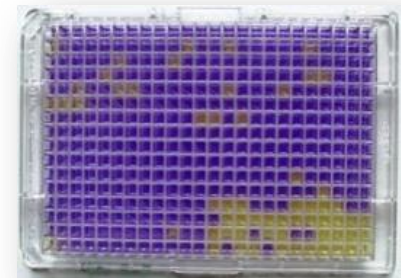


Berechnung der Bio-Äquivalente



Ames-Test

- Nachweis **mutagener Wirkungen** in aufkonzentrierten Abwasserproben
- Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium* YG7108 (Histidin-Auxotrophie)
- Mutagene Substanzen bewirken spontane Rückmutation
- Endpunkt: Anzahl der Revertanten

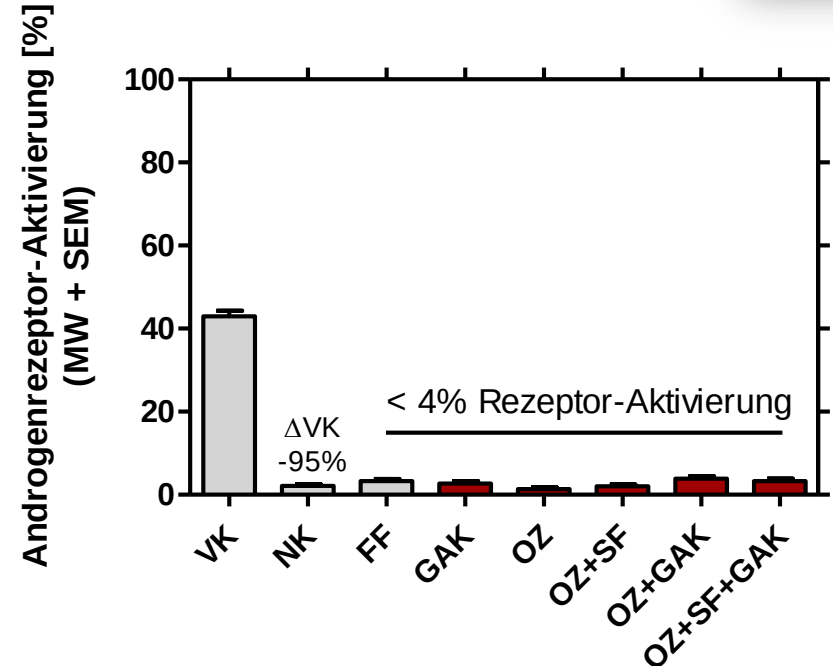
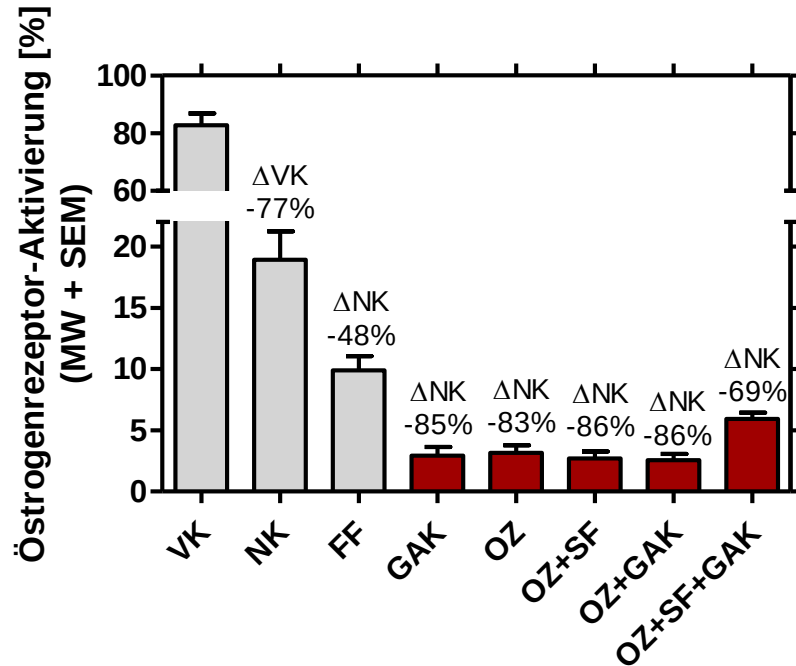
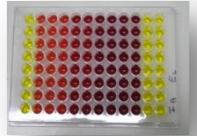




Zusammenfassung KA Eriskirch

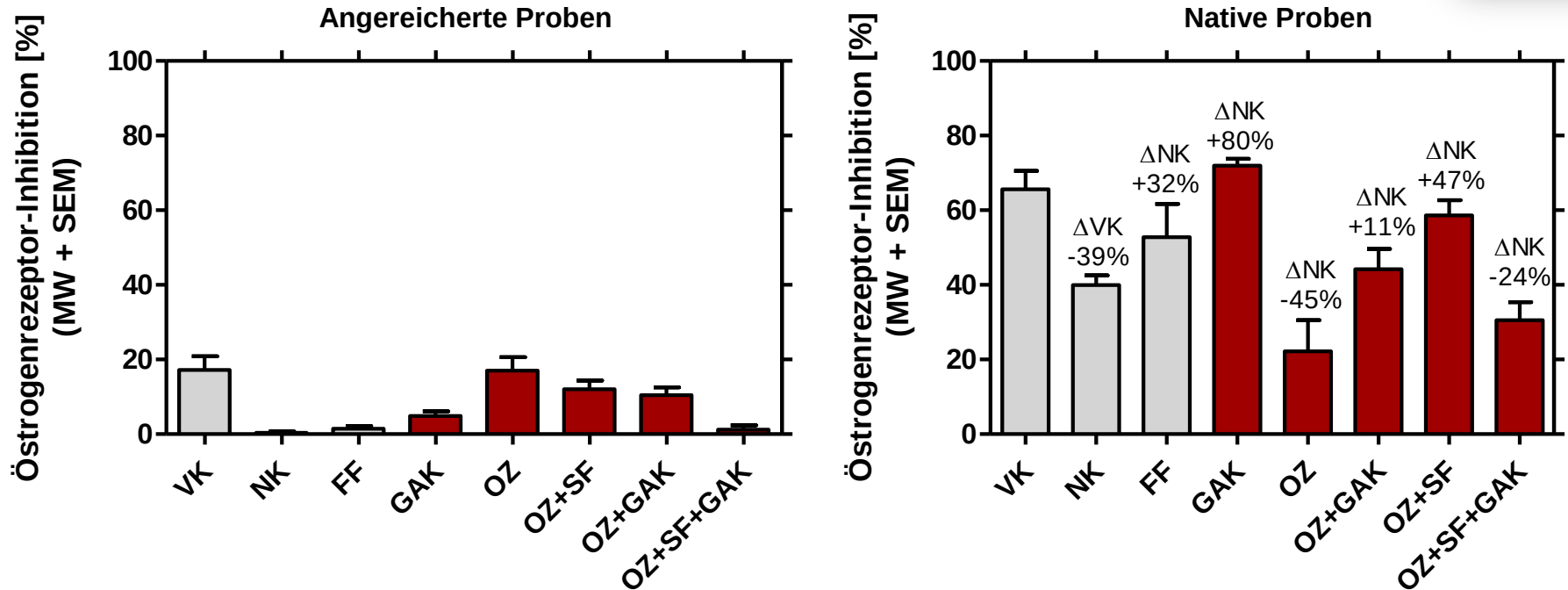
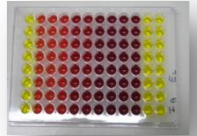
- **Sandfiltration** als effektivste Maßnahme zur Reduktion ozoninduzierter mutagener Effekte
- **Konv. Reinigung** reduziert bereits wirkungsvoll endokrine Wirkpotentiale
- Östrogene Aktivitäten konnten mithilfe **aller erweiterten Behandlungen** weiter reduziert werden
- **Hohe anti-östrogene Wirkpotentiale** in allen Proben konnten nicht eliminiert werden
- **Hohe Reproduktionstoxizität** bei *P. antipodarum* in allen Behandlungsgruppen, die durch erweiterte Behandlungen nicht entfernt werden konnte

Östrogene und androgene Wirkpotentiale



Effektive Reduktion östrogenen und androgenen Aktivität durch konv. Reinigung
Erweiterte Behandlungen reduzieren östrogene Aktivität weiter (69-86%)

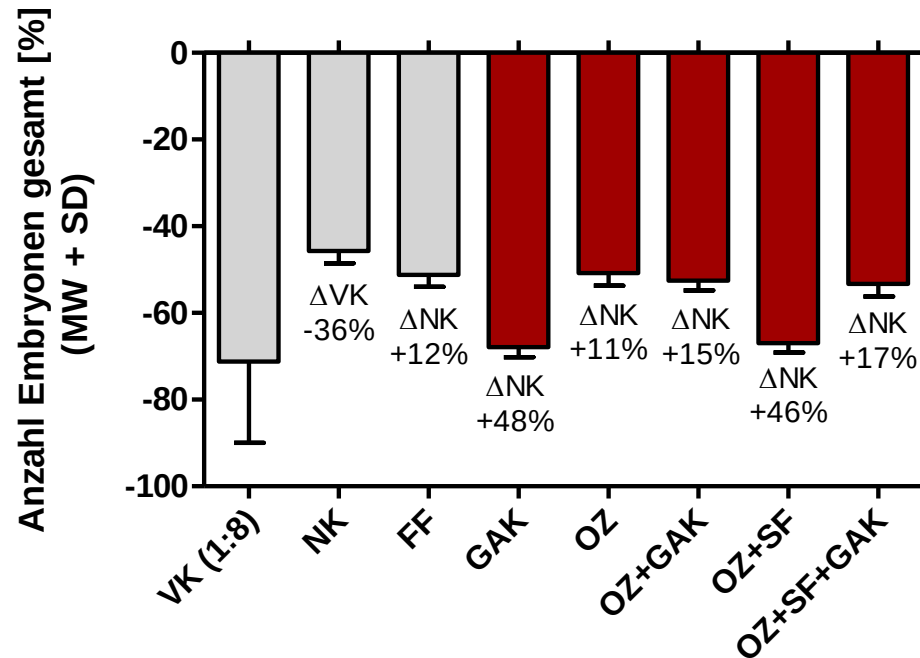
Anti-östrogene Wirkpotentiale



Geringe anti-östrogene Aktivität in Extrakten nachweisbar
Aktivität in nativen Proben wird durch konv. Reinigung um 39% reduziert,
steigt nach erweiterten Behandlungen zumeist wieder an



Reproduktionstoxische Wirkpotentiale

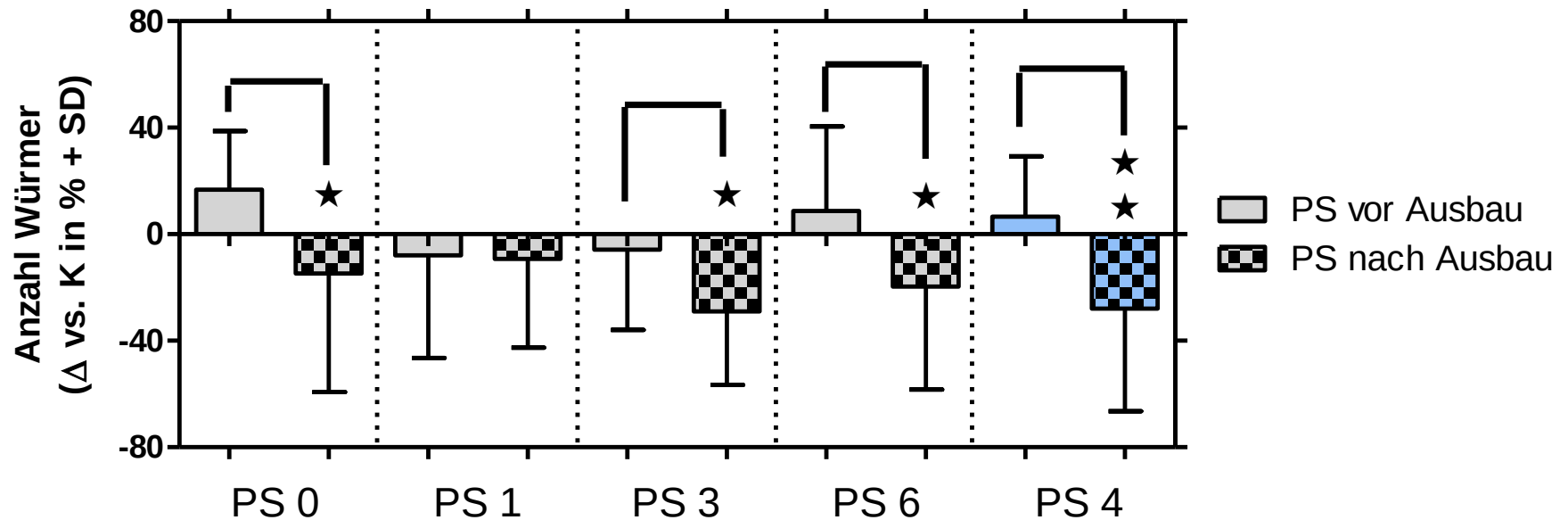


Erhöhte Reproduktionstoxizität in allen Abwasserproben im Vergleich zur Laborkontrolle

Reduktion der Reproduktionstoxizität nach konv. Reinigung (36%), nicht aber durch erweiterte Behandlungen

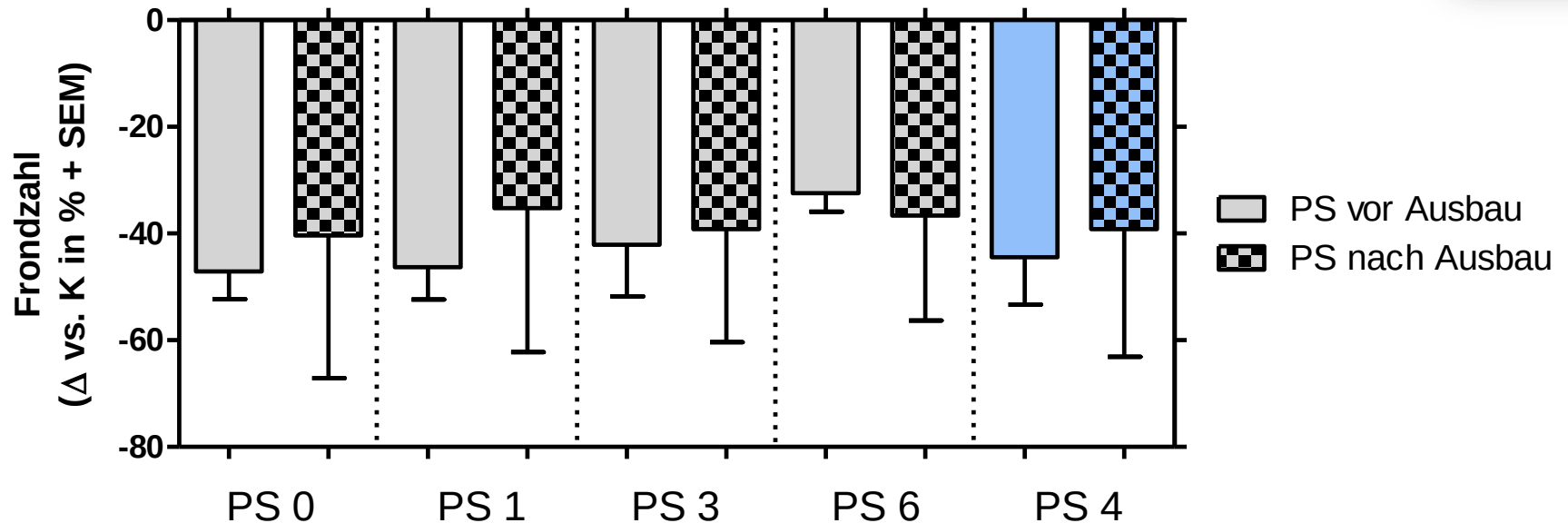


Reproduktionstoxische Wirkpotentiale



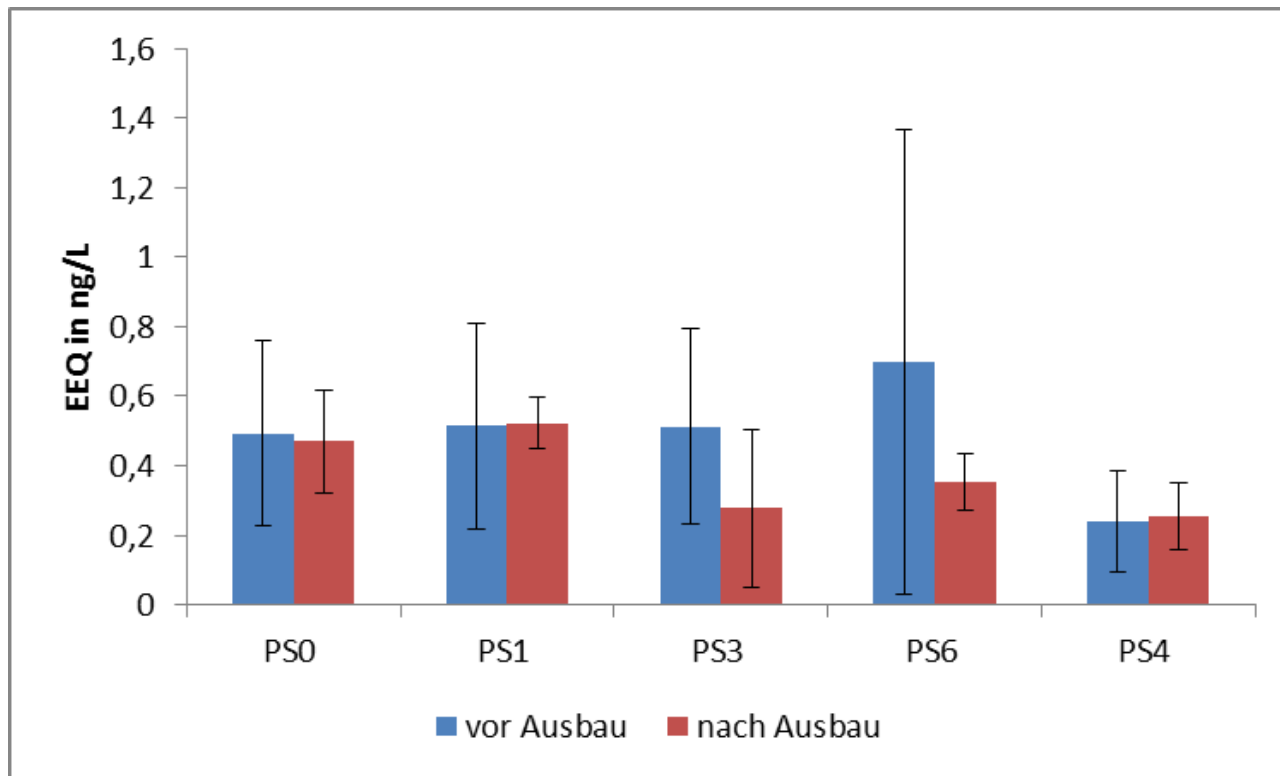
Signifikant geringere Anzahl an Würmern nach dem Ausbau von KA Langwiese

Phytotoxische Wirkpotentiale



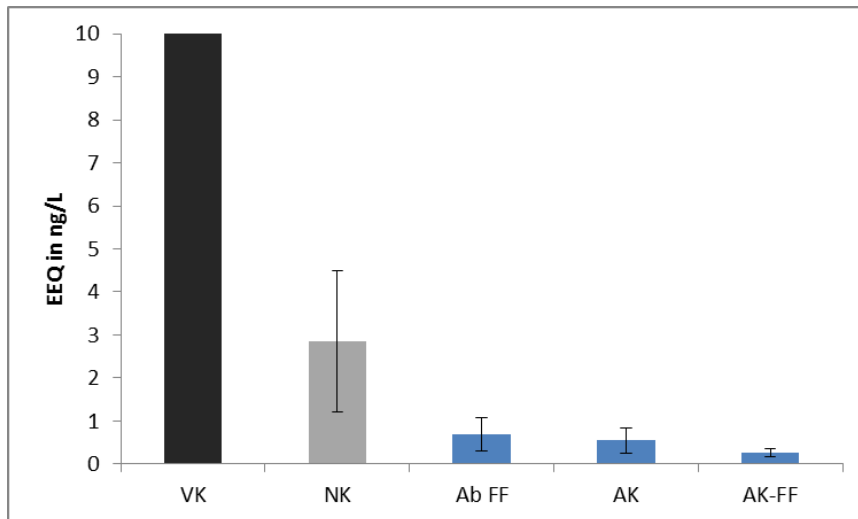
Tendenziell verbessertes Wachstum nach Ausbau KA Langwiese an allen Probestellen (mit Ausnahme von PS 6)

Östrogene Wirkpotentiale (E-Screen)

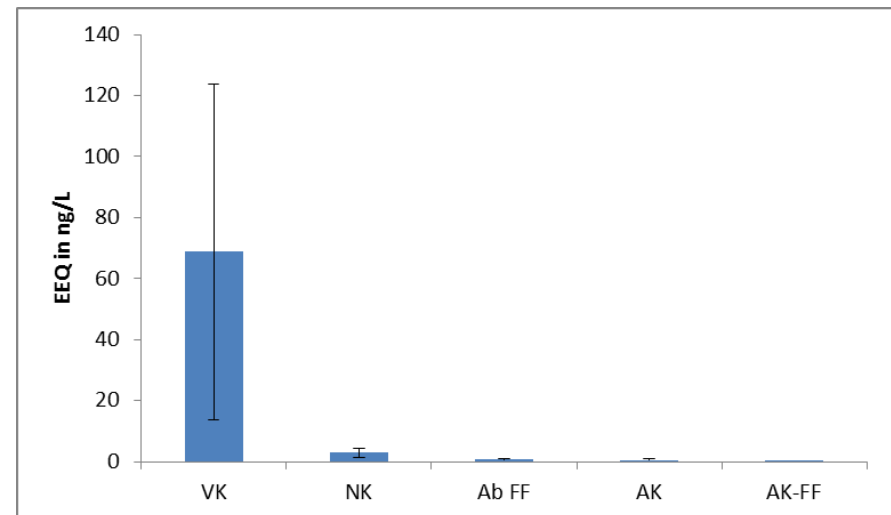


Unterscheidung vor und nach Ausbau Langwiese,
EEQ K - T (MW, STABW)

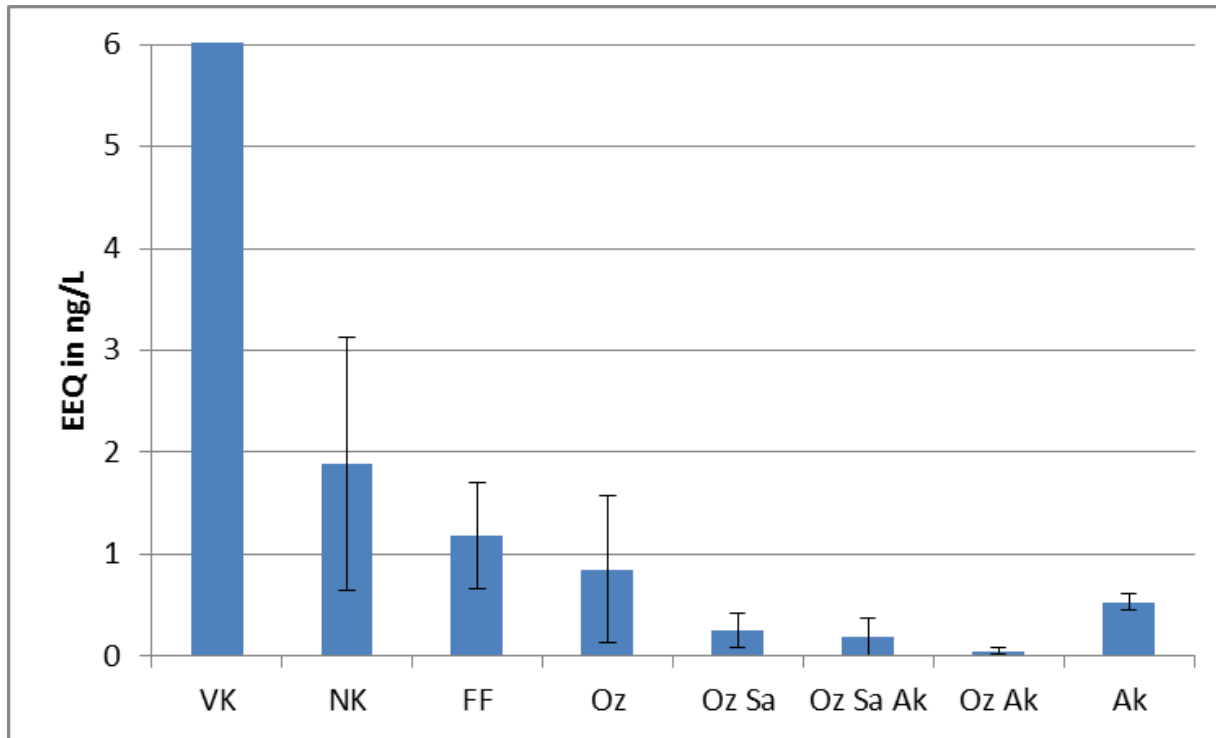
Östrogene Wirkpotentiale (E-Screen)



Langwiese, alle Probennahmen
(MW, STABW)



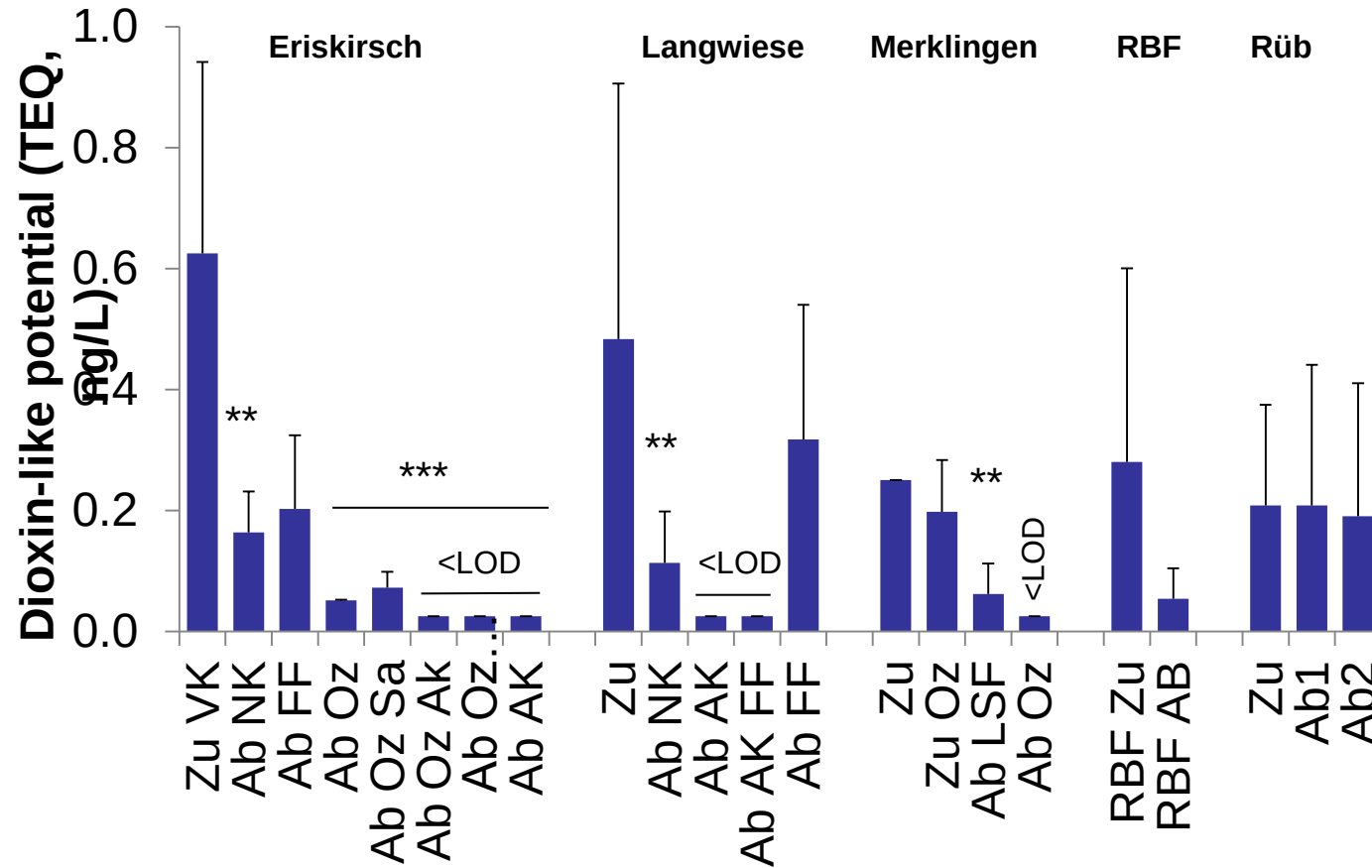
Östrogene Wirkpotentiale (E-Screen)



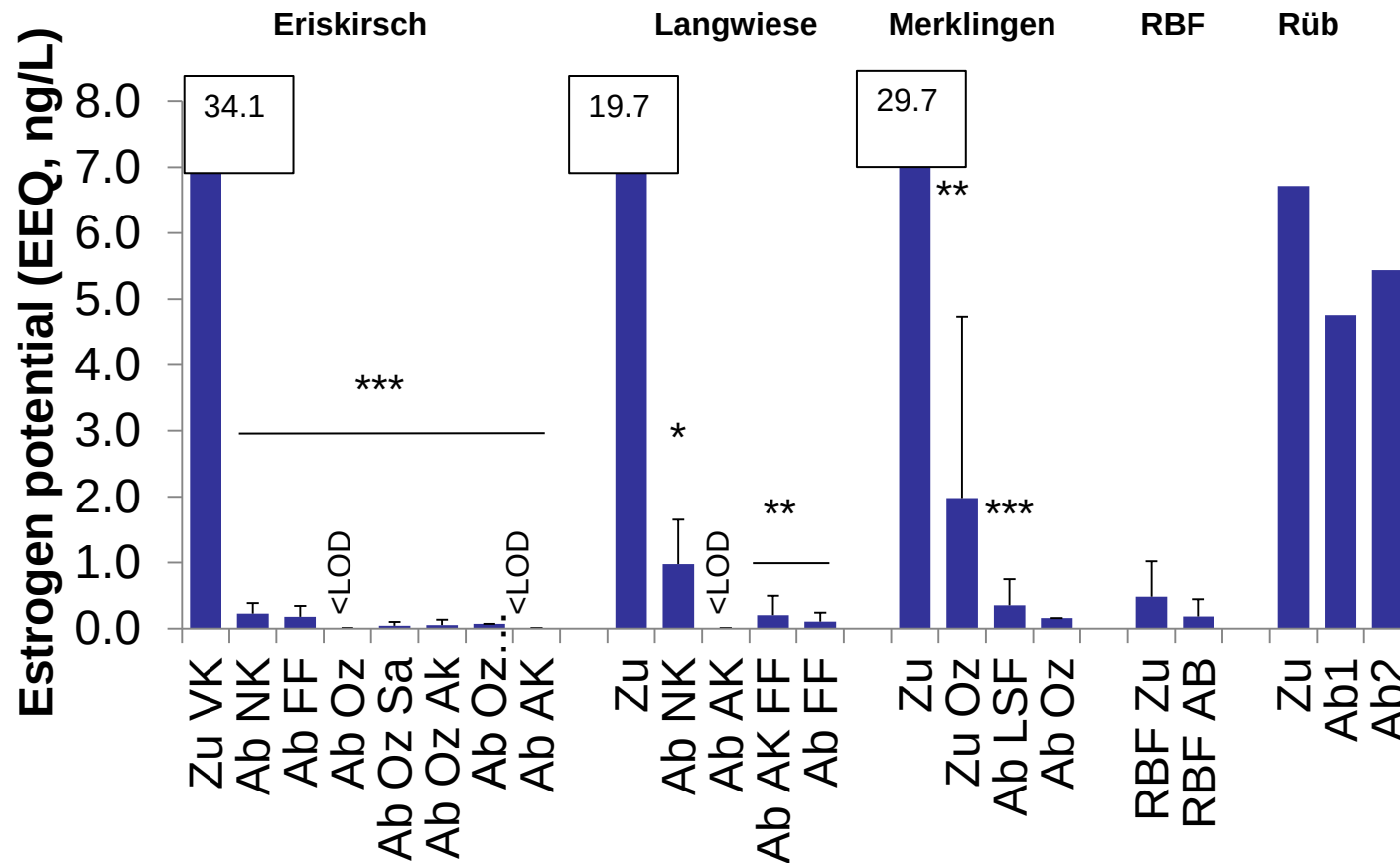
Eriskirch, alle Probennahmen

(MW, STABW)

Dioxin-ähnliche Wirkpotentiale (Brünn)



Östrogene Wirkpotentiale (Brünn)





Anti-östrogene Wirkpotentiale

