


Biotestverfahren zur Abschätzung von Wirkpotenzialen in der aquatischen Umwelt

 Vorschlag einer modularen Biotestbatterie für das aquatische
Umweltmonitoring als Ergebnis einer systematischen
Literaturrecherche und Bewertung

von

Susanne Schmidt

Wibke Busch

Rolf Altenburger

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Dept. Bioanalytische Ökotoxikologie

Im Auftrag der Landesanstalt für Umwelt
Baden-Württemberg (LUBW)

Finanziert mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Klima und
Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UM)

2017



Baden-Württemberg

Biotestverfahren zur Abschätzung von Wirkpotenzialen in der aquatischen Umwelt

➤ Vorschlag einer modularen Biotestbatterie für das aquatische
Umweltmonitoring als Ergebnis einer systematischen
Literaturrecherche und Bewertung

von

Susanne Schmidt

Wibke Busch

Rolf Altenburger

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Dept. Bioanalytische Ökotoxikologie

Im Auftrag der Landesanstalt für Umwelt
Baden-Württemberg (LUBW)

Finanziert mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Klima und
Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UM)

2017

HERAUSGEBER LUBW Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg
Postfach 100163, 76231 Karlsruhe

KONTAKT Dr. Kai Höpker, E-Mail: kai.hoepker@lubw.bwl.de
Dr. Jürgen Zipperle, E-Mail: juergen.zipperle@lubw.bwl.de
Referat Medienübergreifende Umweltbeobachtung, Klimawandel

FINANZIERUNG Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg

**BEARBEITUNG UND
VERANTWORTLICH
FÜR DEN INHALT** Susanne Schmidt
Dr. Wibke Busch
Prof. Dr. Rolf Altenburger

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Dept. Bioanalytische Ökotoxikologie

STAND April 2018

Verantwortlich für den Inhalt sind die Autorinnen und Autoren. Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck - auch auszugsweise - ist nur mit Zustimmung der LUBW unter Quellenangabe und Überlassung von Belegexemplaren gestattet.



Zusammenfassung

Die Kontamination von Oberflächengewässern mit Chemikalien wird gegenwärtig für eine begrenzte Anzahl von Substanzen mit Hilfe chemischer Analytik beobachtet. Die Bewertung der chemisch-analytischen Befunde erfolgt anhand von Qualitätsnormen für einzelne Stoffe. Eine Überschreitung dieser entsprechend festgelegten Konzentration eines einzelnen Stoffes wird als Indikator für das potentielle Auftreten unerwünschter biologischer Auswirkungen betrachtet. Dieses Vorgehen birgt mehrere gravierende Nachteile: Zum einen treten Stoffe in der Umwelt in der Regel nicht alleine sondern als Mischungen auf, die zu bislang nicht berücksichtigten Kombinationseffekten führen können. Zum anderen treten bekanntermaßen weit mehr als die gegenwärtig beobachteten Chemikalien in Oberflächengewässern auf. Weiterhin stammen die für die Beurteilung eingesetzten Qualitätsnormen zur Vermeidung langfristiger unerwünschter Folgen nicht aus Beobachtungen im Gewässer, sondern werden aus Laboruntersuchungen an Reinstoffen und durch Anwendung von Abschätzungsfaktoren zum Ausgleich für Unsicherheiten hergeleitet.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von bioanalytischen Verfahren in der Wissenschaft entwickelt und in Pionierstudien für den Einsatz im Gewässermonitoring erprobt. Derartige Methoden nutzen unterschiedliche Systeme, von Zellen bis zu intakten Organismen, um biologische Effekte durch Umweltproben messen zu können. Sie stellen Erweiterungen zu den, in der Abwasserprüfung bereits etablierten, Biotesten dar. In der hier vorgestellten Literaturstudie wurden 209 unterschiedliche biologische Testverfahren für die Untersuchung von Gewässerproben auf akute biologische Effekte identifiziert und dokumentiert. Je nach Konfiguration lässt sich mit bioanalytischen Verfahren das summarische Auftreten von Stoffen mit gleichen spezifischen Wirkungen, wie z. B. östrogenartige Wirkungen, oder die summarische toxische Potenz der Kontaminationen in einer Umweltprobe bestimmen. In jedem Falle werden Stoffmischungen, die eine ähnliche biologische Wirkung aufweisen, gemeinsam über ihre Kombinationswirkung in einer Umweltprobe bestimmt. Damit könnten Biotestverfahren eine Ergänzung zum etablierten chemischen Monitoring von Oberflächengewässern darstellen.

Den 86 Chemikalien, die in Baden-Württemberg gegenwärtig in Gewässern überwacht werden, konnten in dieser Studie 18 verschiedene biologische Wirkweisen zugeordnet werden. Die überwiegende Anzahl dieser Wirkweisen ließe sich vermutlich mehr oder weniger spezifisch durch Bioteste erfassen. In wissenschaftlichen chemischen Monitoringstudien an europäischen Gewässern werden gegenwärtig rund 500 organische Chemikalien gefunden, die sich in rund 30 Wirkungsklassen aggregieren lassen. Die Sensitivität der bioanalytischen Verfahren im Vergleich zur chemischen Stoffanalytik variiert

dabei zwischen den Wirkungsklassen stark. Für viele Stoffe mit spezifischer biologischer Wirkung, wie etwa für östrogen-ähnlich wirkende Chemikalien, sind biologische Verfahren deutlich sensitiver im Vergleich zu chemischen Methoden. Für eher unspezifisch wirkende Chemikalien ist das Umgekehrte der Fall.

Die detektierten Konzentrationen für Stoffe, die in Baden-Württemberg in Gewässern gefunden wurden, variieren um 3-5 Größenordnungen und bilden damit die Spanne zwischen niedriger Hintergrundbelastung und erhöhter Punktbelastung ab. Die Konzentrationsbereiche überlappen weitgehend mit den in europäischen Forschungsstudien beobachteten Konzentrationen. Die für gewisse Standorte und Zeitpunkte gefundenen, vergleichsweise höheren Konzentrationen lassen, zumindest bei Berücksichtigung von Mischungseffekten, Umweltrisiken für verschiedene Organismen der aquatischen Lebensgemeinschaft erwarten.

Um die Effekte der Vielzahl der Gewässerkontaminanten mit ihren unterschiedlichen Wirkweisen mittels Bioanalytik zu erfassen, bedarf es des Einsatzes mehrerer Bioteste. Wir schlagen hierfür eine modulare Testbatterie aus bis zu 13 Biotestverfahren vor. Die Module von je 5, 4 und 4 Verfahren spiegeln einerseits den unterschiedlichen Entwicklungsstand in der Anwendungsreife wieder und erlauben andererseits unterschiedliche Diagnosen. Der hier unterbreitete Vorschlag für eine Biotestbatterie unterscheidet sich aufgrund der Berücksichtigung bekannter Gewässerkontaminanten und ihrer Wirkweisen von bereits veröffentlichten Vorschlägen. Insbesondere führte das hier gewählte systematische Vorgehen zu dem Vorschlag, organismische Biotestverfahren, wie sie in der Abwasserprüfung bereits eingesetzt werden, auch für das Gewässermonitoring im Modul 1 zu nutzen. Beim Einsatz von Bioanalytik für die Gewässerüberwachung wären, wie bei der chemischen Analytik, Anreicherungsverfahren und qualitätssichernde Methoden einzusetzen. Während diese für die chemische Analytik gut etabliert sind, besteht in diesem Bereich für die Bioanalytik noch Validierungs- und Standardisierungsbedarf. Für eine Bewertung von bioanalytischen Ergebnissen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie z. B. die Berechnung sogenannter Effekt-Äquivalente. Dies könnte vergleichbar zur chemischen Analytik angelegt sein und könnte teilweise Umweltqualitätsnormen als Referenzen nutzen.

Es wird empfohlen, eine Erprobung der hier vorgeschlagenen Vorgehensweise in einer Pilotstudie vorzunehmen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Inhaltsverzeichnis	iii
1 Hintergrund	1
2 Welche Biotestverfahren für die Bewertung von Belastungen für aquatische Lebewesen gibt es?	3
2.1 Was sind Biotestverfahren, Bioassays und effektbasierte Methoden?	3
2.2 Systematische Literaturanalyse zur Identifizierung geeigneter Bioassays	4
2.3 Systematische Erschließung verfügbarer Biotestverfahren.....	5
2.4 Zusammenfassung und Ergebnis der Literaturrecherche.....	9
3 Welche biologischen Wirkweisen gilt es im Monitoring zu erfassen?	10
4 Welche Bioassays sind für das Gewässermonitoring zu empfehlen?	17
4.1 Vorauswahl der Bioassays für das Gewässermonitoring	20
4.2 Vorschlag einer Biotestmodulbatterie für das Umweltmonitoring	23
5 Wie lassen sich Biotest-Ergebnisse bewerten und interpretieren?	29
5.1 Bewertung von Biotestergebnissen	29
5.2 Effektbasiertes Monitoring im Rahmen des Vorsorgeprinzips	33
6 Schlussfolgerung und Handlungsbedarf	36
7 Referenzliste	38
8 Verzeichnisse	41
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	41
8.2 Tabellenverzeichnis.....	42
9 Anhang	43
Anhang 1 – Erläuterungen zur systematischen Literaturrecherche	43
Anhang 2 - Referenzliste als Ergebnis der Literaturrecherche	45
Anhang 3 - Beschreibung des Bioassay-Karteisystems.....	52
Anhang 4 – Übersicht der identifizierten Bioassays	55
Anhang 5 – Übersicht der betrachteten Substanzen und deren Wirkweisen.....	71
Anhang 6 - Erläuterungen zur Bewertung der Bioassays.....	73
Anhang 7 - Gegenüberstellung der Chemikalien mit den Bioassays.....	92
Anhang 8 - Tabelle zur Gegenüberstellung der Chemikalien mit den Bioassays	95

1 Hintergrund

Nach der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL, EG- Wasserrahmenrichtlinie Nr. 2000/60/EC) werden 33 prioritäre Substanzen mithilfe chemischer Analytik auf ihr Vorkommen in Flüssen und Oberflächengewässern analysiert. 2016 wurde die Anzahl prioritärer Stoffe auf 45 erhöht. Der chemische Zustand eines Gewässers wird insbesondere anhand von Ergebnissen des chemischen Monitorings durch Vergleich der gefundenen Konzentrationen mit stoffspezifischen Umweltqualitätszielen (*Environmental Quality Standards* – EQS) bewertet. Für die aktuelle Bewirtschaftungsphase wird auf diese Weise überwiegend ein chemisch „schlechter Zustand“ gefunden. Um die Dimension der möglichen Belastung von Gewässern mit Chemikalien zu erfassen, kann über die wenigen als prioritär eingestuft und damit routinemäßig erfassten Chemikalien hinaus berücksichtigt werden, dass derzeit mehr als 100 Mio. Chemikalien bekannt und über 340 000 Chemikalien davon behördlich reguliert sind (CAS: Chemical Abstracts Service; <https://www.cas.org/>). Dies bedeutet, dass die Anzahl der Chemikalien, die in der Umwelt vorkommen können, wesentlich höher ist als die der gegenwärtig im chemischen Monitoring nach der WRRL erfassten Substanzen. Verschiedene investigative chemische Monitoringstudien bestätigen diese Vermutung und zeigen, dass mit moderner chemischer Analytik gleichzeitig zwischen 60 und 400 Chemikalien in Europäischen Flüssen nachgewiesen werden können (Beispiele dafür in Busch et al., 2016). Neben der Frage welche Kontaminanten zusätzlich berücksichtigt werden sollten, ist auch die Frage nach deren Kombinationswirkungen infolge von Mischungsbelastungen zu beantworten.

Als zweite wichtige Säule wird im Rahmen der WRRL der ökologische Zustand von Gewässern bewertet. Dieser ist im Kern abhängig vom Auftreten und der Anzahl verschiedener Arten (EG-Wasserrahmenrichtlinie Nr. 2000/60/EC) im Vergleich zu einem Referenzzustand. Auch in diesem Bereich wird für einen Großteil der europäischen Gewässer ein „schlechter Zustand“ befunden. Während über die Bedeutung von strukturellen Faktoren wie Verbau von Gewässern, fehlende Konnektivität u. a., für die mangelnde Gewässerqualität Einigkeit besteht, wird der Zusammenhang zwischen chemischem und ökologischem Gewässerzustand als ungeklärt betrachtet. Managementmaßnahmen zur Verbesserung der Gewässerqualität können somit kaum ursachenspezifisch entwickelt werden. Schwierigkeiten den chemischen und ökologischen Zustand in Verbindung zu bringen, liegen u. a. darin begründet, dass die Bewertungssysteme grundlegend unterschiedlich sind. Während sich die ökologische Qualität auf Beobachtungen im System stützt, wird für die Bewertung des chemischen Zustandes auf Konzepte und Verfahren der

prospektiven Chemikalienbewertung zurückgegriffen, um Konzentrationsbestimmungen für ausgewählte Einzelstoffe in potentiell schädliche Effekte für Organismen (sogenannte Qualitätselemente der Ökosysteme) zu übersetzen.

Ein Vorschlag in diesem Kontext besteht darin, ergänzend zu chemisch-analytischen Untersuchungen auch bioanalytische, effektbasierte Methoden (*effect based tools* – EBTs) anzuwenden. Diese sollten es ermöglichen:

- komplexe Belastungen effektbasiert systemnah zu erfassen;
- Stoffgemische über die Detektion von gemeinsamen Kombinationseffekten direkt nachzuweisen;
- eine evidenzbasierte Brücke zwischen Stoffvorkommen und biologischen Effekten zu schaffen und damit eine Ergänzung zu überwiegend von Unsicherheitsfaktoren bestimmten Einzelstoffbewertungen zu liefern;
- die Beiträge von chemischer Belastung zum ökologischen Zustand von Gewässern besser abzuschätzen;
- eine Erfolgskontrolle von Managementmaßnahmen durchzuführen.

Das Ziel des diesem Bericht zugrunde liegenden Projektes war es deshalb, verfügbare „Biotestverfahren zur Abschätzung von Wirkpotentialen in der aquatischen Umwelt“ mithilfe einer systematischen Literaturrecherche zu identifizieren und ihre Einsatztauglichkeit zu bewerten. Das Vorgehen und Ergebnis dieser Recherche wird im vorliegenden Bericht erläutert und diskutiert. Unter Berücksichtigung der in baden-württembergischen Gewässern vorkommenden Mikroschadstoffe wird aus den Ergebnissen der Literaturrecherche und einer anschließenden Bewertung der erfassten Biotestverfahren, eine aus drei Modulen bestehende Testbatterie für den Einsatz im aquatischen Umweltmonitoring vorgeschlagen.

2 Welche Biotestverfahren für die Bewertung von Belastungen für aquatische Lebewesen gibt es?

2.1 Was sind Biotestverfahren, Bioassays und effektbasierte Methoden?

Im allgemeinen Sprachgebrauch werden die Begriffe Biotest und Bioassay häufig synonym verwendet. Im vorliegenden Bericht wird jedoch zwischen den Begriffen *Biotestverfahren*, *Bioassays* und *effektbasierten Methoden* unterschieden. *Biotestverfahren* werden in dieser Studie als noch in der Entwicklung stehende Verfahrensvorschläge betrachtet, wohingegen *Bioassays* bereits als anwendungstauglich beurteilt werden, d. h. dass mindestens ein erprobtes SOP (*Standard Operating Procedure*)-Protokoll existiert. Ist ein Bioassay in der routinemäßigen Anwendung im Umweltmonitoring etabliert, wird dieser auch als *effektbasierte Methode (effect based tool)* bezeichnet. Bioassays, die in diesem Bericht betrachtet werden, sind experimentelle Verfahren, die biologische Reaktionen auf die Exposition mit mikroschadstoffhaltigen Wasserproben konzentrationsabhängig quantifizieren können. Diese Verfahren können sowohl intakte Organismen (*in vivo* - Methoden) als auch Subsysteme, insbesondere Zellen (*in vitro* - Methoden) nutzen.

Biologische Effekte können auf verschiedenen Ebenen biologischer Komplexität erfasst werden (siehe Zusammenstellung in Abbildung 1).

beobachtbare Effekttypen bei Verwendung von Bioassays		
Molekulare Effekte Interaktion mit •Proteinen (Enzymen, Rezeptoren) •Nukleinsäuren (RNA, DNA) •Fettsäuren (Membranen)	Physiologische Effekte Störung von: •Energiemetabolismus •Kommunikationsprozessen •Biomolekül-Synthese •Stressantwort	Aggregierte Effekte (adverse outcome) •Letalität •Reproduktion •Wachstum •Verhalten

Abbildung 1 Biologische Effekte gruppiert nach biologischen Komplexitätsebenen, die zur Beschreibung von biologischen Reaktionen auf chemische Belastungen in Bioassays genutzt werden (nach Busch et al. 2016).

Auf molekularer Ebene können beispielsweise Interaktionen von Chemikalien mit Proteinen detektiert werden. Vielfach werden heutzutage dafür genetisch veränderte Zellen oder auch zellfreie Aktivitätstests eingesetzt. Chemikalien-Biosystem-Interaktionen können auf höherer Ebene zu Störungen physiologischer Prozesse wie z. B. der Zell-Zell-Kommunikation, dem Energiehaushalt oder der Modifikation von Syntheseprozessen führen. Auch diese Störungen lassen sich mit entsprechenden Indikatorsystemen detektieren. Störungen, die

auf molekularer oder physiologischer Ebene detektiert werden, können ebenfalls auf schädliche Auswirkungen in Organismen hindeuten. Aggregierte Beobachtungen an intakten Organismen, wie beispielsweise Effekte auf das Wachstum, die Vermehrung oder das Verhalten, können durch den Einsatz von Organismen-basierten Testsystemen detektiert werden.

2.2 Systematische Literaturrecherche zur Identifizierung geeigneter Bioassays

Mit Hilfe einer systematischen Literaturrecherche sollte zunächst ein Überblick über alle bisher verfügbaren, potentiell für das Gewässermonitoring tauglichen Biotestverfahren gewonnen werden, um diese anschließend hinsichtlich ihrer Tauglichkeit und Einsatzreife zu bewerten. Basierend auf den Ergebnissen wird abschließend eine Biotestmodulbatterie vorgeschlagen, die aus dem hier erfassten Stand der Forschung abgeleitet ist. In der Literaturrecherche wurden Studien erfasst, die Biotestverfahren beschreiben, welche die folgenden Kriterien erfüllen:

- Anwendbarkeit für aquatische Systeme;
- Anwendung für definierte Stoffe, Stoffgemische oder Umweltproben;
- Methodenbeschreibung vorhanden;
- Erfassung biologischer Effekte (keine Einzelstoffdetektoren);
- *in vitro*- und *in vivo*-Testsysteme (unter Ausschluss von *in-situ* Untersuchungen), d. h. akute Testsysteme mit relativ kurzer Expositionszeit. Diese Testsysteme haben aufgrund von standardisierten Testbedingungen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. In der Regel können damit auch mehrere Proben parallel untersucht werden.

Die systematische Literaturrecherche wurde in der bibliographischen Datenbank *Web of Science*[™] durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung bezüglich der verwendeten Suchstrategie ist dem Anhang 1 zu entnehmen.

Das Ergebnis dieser Recherche ergab 75 wissenschaftliche Studien, die als relevant für die Fragestellung dieses Vorhabens eingestuft wurden. Diese Studien stammen v. a. aus Zeitschriften mit Spezialisierung auf den Themenbereich Chemikalien in der (aquatischen) Umwelt (z. B. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (7), *Environmental Monitoring and Assessment* (5), *Water Research* (9), *Water Science and Technology* (7)). Knapp zwei Drittel der Veröffentlichungen stammen aus universitären Einrichtungen, der Rest aus außeruniversitären Forschungseinrichtungen (z. B. *Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology* (Eawag), *Norwegian Institute for Water Research*) und Behörden

(z. B. *US Environmental Protection Agency*). Zusätzlich wurden drei ausgewählte Übersichtsarbeiten hinzugefügt, in denen Bioassays entweder in Pionierstudien im Monitoring eingesetzt wurden (Triebkorn et al. 2015; Escher et al. 2014) oder im Hinblick auf eine Verwendung im Monitoring bewertet wurden (Kienle et al. 2015).

Das Ergebnis der systematischen Literaturrecherche ist in Anhang 2 als Referenzliste dargestellt.

2.3 Systematische Erschließung verfügbarer Biotestverfahren

Unter Einbeziehung der drei Übersichtsarbeiten und der 75 Studien der systematischen Literaturrecherche konnten insgesamt 209 Bioassays identifiziert werden. Um diese systematisch vergleichen zu können, wurde ein Karteisystem angelegt, in welchem einheitliche Informationen zu jedem Bioassay erfasst wurden. Die für jeden Assay erfassten Kriterien sind in Tabelle 1 dargestellt. Unterstrichene Unterkriterien wurden für alle 209 Bioassays erfasst, während alle weiteren Kriterien nur bei Verfügbarkeit der Information berücksichtigt wurden. Eine detaillierte Beschreibung zur Kriterienauswahl befindet sich im Anhang 3.

Tabelle 1 Zusammenfassung der Kategorien für die Assay-Erschließung

Effektdetektion	<u>Effektdetektionskategorie</u> <u>Unterkategorie</u>
------------------------	---

Bioassay-Name	
----------------------	--

Bioassay-System	<u>System</u> <u>Organismus</u> Organ Zelltyp Zelllinie Rezeptor Reportergeräten
------------------------	--

Bioassay-Durchführung	Medium Testformat Testvolumen Expositionszeit Referenzsubstanz <u>messbarer Effekt</u> <u>Detektion</u> Metabolische Aktivierung Für Umweltproben erprobt Probenvolumen Durchsatz
------------------------------	---

Bioassay-Qualitätssicherung	Validitätskriterien explizit angegeben Ringtest kommerzielles System Standardisiertes Protokoll
------------------------------------	--

Referenz	Methode <u>Anwendung</u>
-----------------	-----------------------------

Effektdetektionskategorien

Um zu einer Auswahl geeigneter Bioassays für die Detektion spezifischer oder unspezifischer biologischer Wirkungen von Mikroschadstoffen zu gelangen, wurden die hier berücksichtigten Bioassays in verschiedene Kategorien der Effektdetektion einsortiert. Ziel war es, die Effekttypen, die in der jeweiligen Kategorie detektiert werden, in einem Begriff zusammenzufassen, der erkennbar macht, welche Art biologischer Effekte mit dem jeweiligen Assay erfasst wird. So wurden beispielsweise die häufig benutzten Terme „Dioxin-ähnliche Wirkung“ oder „Herbizid - Wirkung“ nicht verwendet, da sich diese auf eine chemische Stoffklasse bzw. auf einen Verwendungszweck der Chemikalien beziehen, nicht aber ein biologisches Effektdetektionsprinzip erkennen lassen. Nachfolgend sind die verwendeten Effektdetektionskategorien aufgelistet und erläutert:

allgemeine Toxizität Organismen

- Bioassays, die durch die Beobachtung von Effekten auf beispielsweise Wachstum, Letalität, Reproduktion oder Verhalten (vgl. Abbildung 1), unterschiedliche biologische Reaktionen aggregieren und dafür intakte Organismen für die Detektion nutzen

allgemeine Toxizität Zellen

- Bioassays, die keinen spezifischen Effekt messen, sondern allgemein zytotoxische Effekte erfassen und zellbasiert sind
- Zytotoxische Effekte werden häufig unter Verwendung hoher Stoffkonzentrationen als Kontrolle in zellbasierten Bioassays verwendet, um spezifische Effekte (wie rezeptorvermittelte Reaktionen) und unspezifische Zytotoxizität voneinander abzugrenzen

phytotoxische Effekte

- Bioassays, die Störungen von pflanzenspezifischen Prozessen auf suborganismischer Ebene erfassen
- Spezifisch wird die Inhibierung der Photosyntheseleistung durch phytotoxische Chemikalien beobachtet

hormonartige Effekte

- Bioassays, die spezifisch die Inhibierung/Aktivierung von Hormonrezeptoren analysieren
- Unterteilung nach dem jeweils betrachteten Rezeptor in die Unterkategorien östrogene, androgene, glucocorticoide, progesterone und thyroide Effekte

mutagene/gentoxische Effekte

- Bioassays, die mutagene oder gentoxische Effekte messen, wie beispielsweise DNA-Schäden (z. B. Ames-Test) oder die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen (z. B. UmuC-Assay), welche indirekt auf DNA-Schädigung hinweisen

neurotoxische Effekte

- Bioassays, die spezifisch Effekte auf das Nervensystem erfassen, wie zum Beispiel die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE)
- keine unspezifischen Bioassays, die beispielsweise das Verhalten von Fischen als Indikator für neurotoxische Effekte verwenden, diese sind unter der Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“ gelistet

Immuntoxizität und oxidativer Stress

- Bioassays, die Reaktionen des Immunsystems detektieren oder das Auftreten von oxidativem Stress anzeigen
- Unterteilung in die folgenden vier Unterkategorien: Immuntoxizität, oxidativer Stress, Membranschädigung und Proteinschädigung

metabolische Enzyme & Rezeptoren

- alle Bioassays, die spezifisch Chemikalieneffekte auf die Aktivität metabolischer Enzyme messen oder auf eine spezifische Chemikalien-Rezeptorbindung hinweisen
- Unterteilung in die Unterkategorien: Aktivierung der Biotransformation, allgemeine Stressantwort, Bindung an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR)-Signalweg und Retinsäuresignalweg

sonstige spezifische Effekte

- Bioassays, die in keine der bisher genannten Kategorien einsortiert werden konnten und einen spezifischen Effekt detektieren
- Unterteilung in die zwei Unterkategorien Hypoxie und Zellzykluskontrolle

Eine vollständige Liste mit den 209 Bioassays, sortiert nach Effektdetektionskategorien, inkl. der Angaben zur Spezies/Zelllinie, dem analysierbaren Effekt, sowie den jeweiligen Referenzen ist dem Anhang 4 zu entnehmen.

2.4 Zusammenfassung und Ergebnis der Literaturrecherche

Die Verteilung der durch die systematische Literaturrecherche identifizierten und erfassten 209 Bioassays in die verschiedenen Effektdetektionskategorien ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

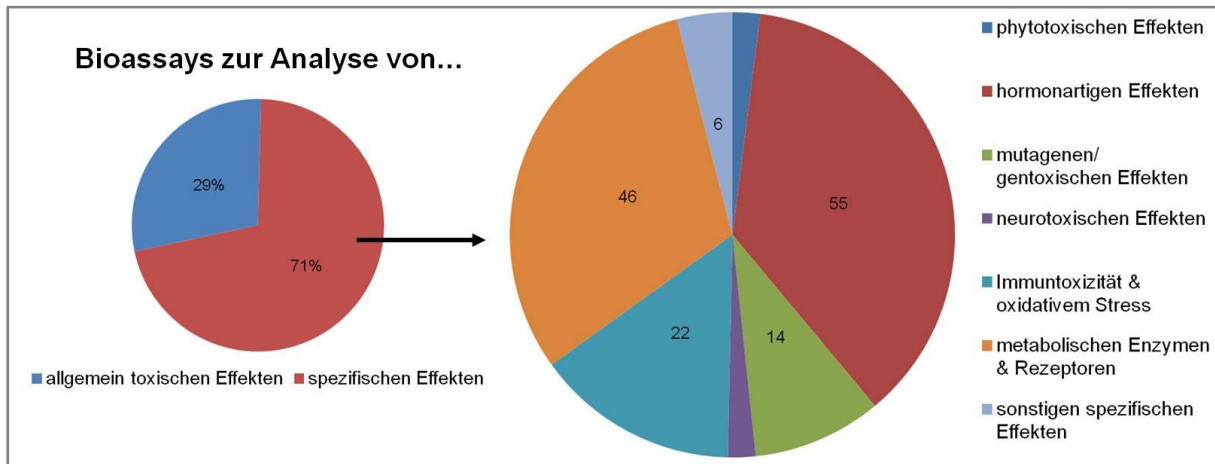


Abbildung 2 Verteilung der in der systematischen Literaturrecherche identifizierten Bioassays über die verschiedenen Effektdetektionskategorien.

Die größte Gruppe an Bioassays steht demnach für die Detektion hormonartiger Effekte zur Verfügung. Zahlreiche Bioassays existieren auch für die Detektion von Effekten auf Enzyme der Biotransformation und deren Rezeptoren. 60 der betrachteten Bioassays detektieren allgemeine toxische Effekte, darunter befinden sich 48 organismische und 12 zelluläre Bioassays. 149 der 209 Bioassays detektieren spezifische Effekte, diese Bioassays sind aufgeteilt in folgende Kategorien der Effektdetektion: phytotoxische Effekte ($n = 3$), hormonartige Effekte ($n = 55$), mutagene/gentoxische Effekte ($n = 14$), neurotoxische Effekte ($n = 3$), Immuntoxizität und oxidativer Stress ($n = 22$), metabolische Enzyme und Rezeptoren ($n = 46$), sowie sonstige spezifische Effekte ($n = 6$).

3 Welche biologischen Wirkweisen gilt es im Monitoring zu erfassen?

Ziel des Berichtes ist, herauszuarbeiten, welche Bioassays für die Detektion von Chemikalien und Chemikalienmischungen, wie sie in Baden-Württemberg auftreten, eine sinnvolle Erweiterung zum chemischen Monitoring darstellen würden.

Grundlage hierfür ist das „Spurenstoffinventar der Fließgewässer in Baden-Württemberg“ (Lehmann et al., 2014), in welchem die chemisch-analytisch erfassten Konzentrationen der im Jahr 2012/2013 in Baden-Württemberg routinemäßig analysierten Mikroschadstoffe dokumentiert sind. Der Datensatz enthält Informationen zu 86 Mikroschadstoffen, die in insgesamt 383 Beprobungen an 33 Standorten analysiert wurden. Für 74 der 86 Stoffe wurde mindestens einmal eine Konzentration im Gewässer oberhalb des stoffspezifischen Detektionslimits gemessen. 12 Stoffe lagen somit in allen Messungen unterhalb des Detektionslimits. Zur Einordnung und Bestimmung der Wirkweisen der erfassten Mikroschadstoffe wurden diese mit den Befunden einer ausführlichen Analyse zu Mikroschadstoffen in Europas Flüssen mit dem Titel „*Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring*“ (Busch et al. 2016) verglichen. Durch die Analyse der Daten von sechs verschiedenen chemischen Monitoringstudien (Tabelle 2) konnte in dieser vergleichenden Untersuchung gezeigt werden,

- dass die Anzahl der je Monitoringstudie betrachteten Chemikalien sehr unterschiedlich war (siehe Tabelle 2, beispielsweise wurden in Studie #2 etwa 400 Chemikalien analysiert, wohingegen in Studie #5 ca. 60 Chemikalien analysiert wurden);
- dass von den insgesamt fast 970 gemessenen organischen Chemikalien nur rund die Hälfte (426) davon quantitativ in europäischen Flüssen nachgewiesen wurde;
- sowie dass lediglich 13 von den 426 in den europäischen Flüssen nachgewiesenen Substanzen, in allen sechs Studien analysiert wurden.

Tabelle 2 Europäische, wissenschaftliche Monitoringstudien; analysiert in Busch et al. (2016)

Dataset No	River catchment	No of compounds	Sites	Study
#1	Rhine	~ 190	10 WWTP effluents	Schymanski et al. 2014
#2	Rhine	~ 400 (mainly Pesticides)	5 rivers over time	Moschet et al. 2014
#3	Mulde/Saale	~ 210	29 sites	Schulze et al. unpublished
#4	Danube	~ 340	68 sites	Danube (JDS3*)
#5a #5b	Rhine	~ 60	9 sites, resp. (upstream, downstream and WWTP effluents)	Munz et al. unpublished
#6	Danube Novisad	~225	3 sites	Novisad (Danube, Brack et al. unpublished)

Bei den 13 in allen Studien detektierten Chemikalien handelt es sich um klassische Abwassermarker wie z. B. Sucralose und Koffein oder die Pharmaka Diclofenac und Carbamazepin. Auch die in weiten Teilen Europas bereits verbotenen Herbizide Diuron und Atrazin wurden in allen Studien detektiert.

Abbildung 3 zeigt die breite Verteilung der gemessenen Konzentrationen dieser 13 Substanzen in den Europäischen Flüssen, welche von wenigen ng/L bis hin zu 10 µg/L z. B. für die Benzotriazole streut. Dabei unterscheiden sich die Konzentrationen einer Substanz sowohl innerhalb einer Studie, als auch zwischen den Studien teilweise um 4 bis 5 Größenordnungen. Dieses Spektrum ist durch eine breite Verteilung der Probennahmestellen erklärt, welche in den einzelnen Studien sowohl Kläranlagenausflüsse als auch unbelastete Standorte einschließen.

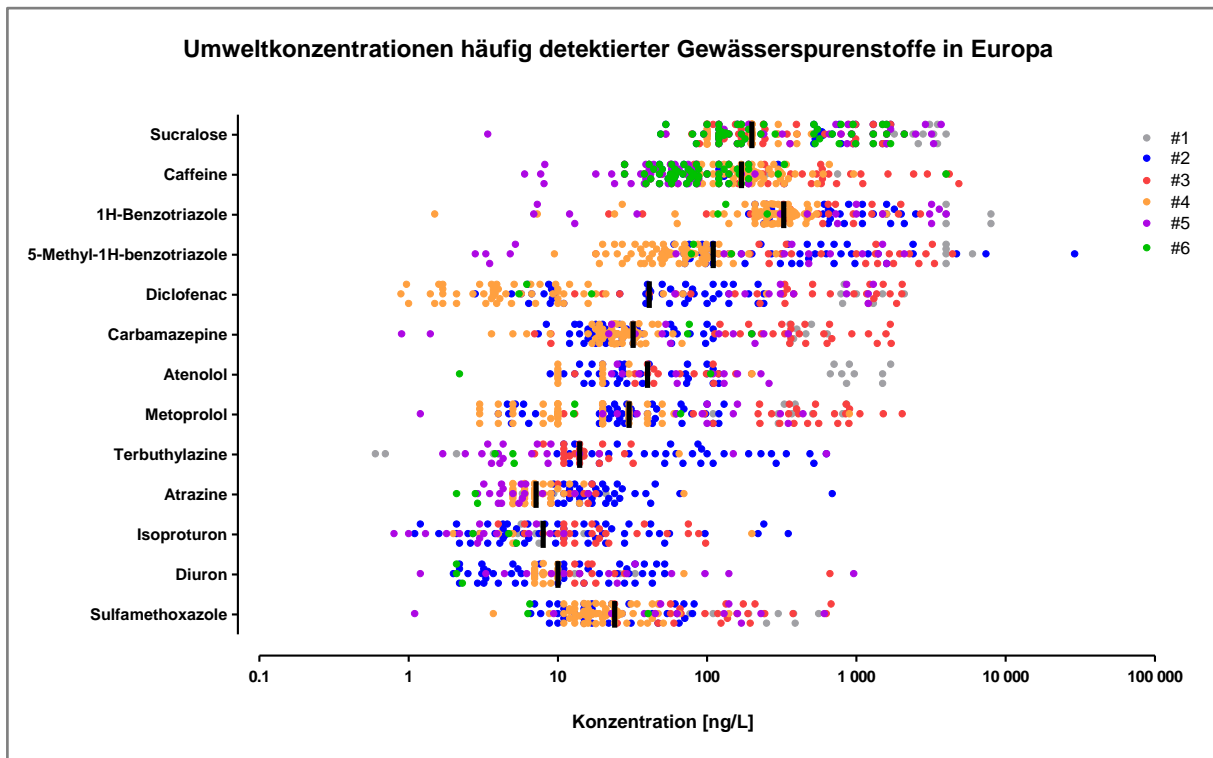


Abbildung 3 Umweltkonzentrationen der 13 Chemikalien, die in allen Monitoringstudien detektiert wurden. Jeder Punkt entspricht einer Konzentration an einem Standort in einer Monitoringstudie. Daten der verschiedenen Studien sind mit verschiedenen Farben dargestellt. Die mittlere Konzentration pro Substanz ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet (übernommen aus Busch et al. 2016).

9 dieser 13 europaweit gefundenen Substanzen wurden auch in Baden-Württemberg analysiert. Die Konzentrationen dieser 9 Stoffe in Baden-Württemberg sind dem Spurenstoffbericht 2012/2013 (Lehmann et al., 2014) entnommen und in Abbildung 4 als schwarze Punkte abgebildet.

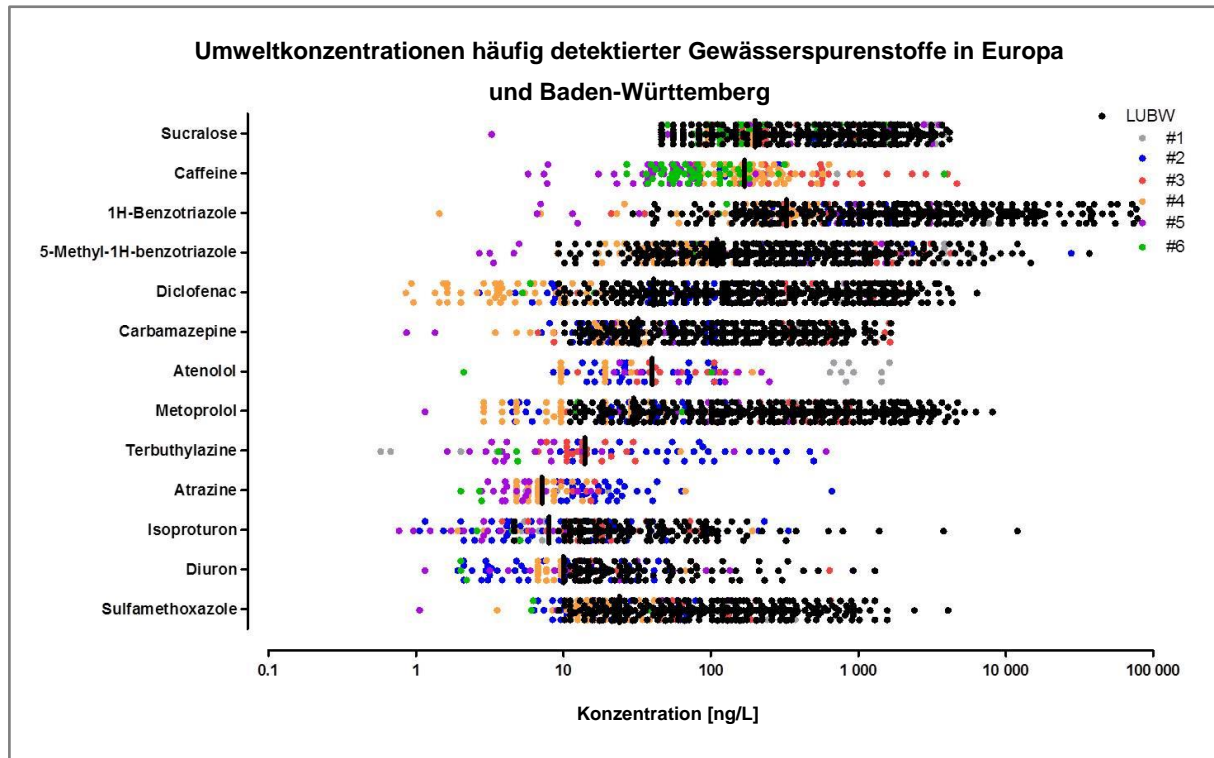


Abbildung 4 Umweltkonzentrationen der 13 Chemikalien, die in den in Busch et al. (2016) analysierten Monitoringstudien detektiert wurden (bunt) im Vergleich zu den Daten aus dem Spurenstoffbericht 2012/2013 aus Baden-Württemberg (LUBW) (schwarz). Jeder Punkt entspricht einer Konzentration an einem Standort in einer Monitoringstudie.

Aus Abbildung 4 sind folgende Punkte ableitbar:

- Die für Europa repräsentative Studie bildet auch die Situation in Baden-Württemberg ab.
- Das Detektionslimit für Spurenstoffe ist im Routine-Monitoring prinzipiell höher als in investigativen wissenschaftlichen Studien.
- Für Sucralose und Carbamazepin scheint es einen definierten Konzentrationsbereich zu geben, in dem diese Substanzen in Oberflächengewässern vorkommen. Vermutlich ließen sich diese Konzentrationen direkt in Abwasseranteile umrechnen.
- Für einzelne Probennahmezeitpunkte und -stellen in Baden-Württemberg liegen die gemessenen Konzentrationen einzelner Stoffe (z. B. 1H-Benzotriazol und Metoprolol) höher als in der europäischen Vergleichsstudie. Dies ist auf die Einbeziehung zahlreicher Probennahmestellen bzw. -zeitpunkten in Kläranlagen-Zuläufen sowie die detaillierte zeitliche Auflösung des Monitorings in Baden-Württemberg zurückzuführen.

Die Verteilung aller in Baden-Württemberg analysierten Spurenstoffe hinsichtlich ihrer Verwendung ist in Abbildung 5 dargestellt. Ungefähr die Hälfte der Spurenstoffe umfassen Industriechemikalien (48 %), gefolgt von Pharmaka (31 %) und Pestiziden (14 %).

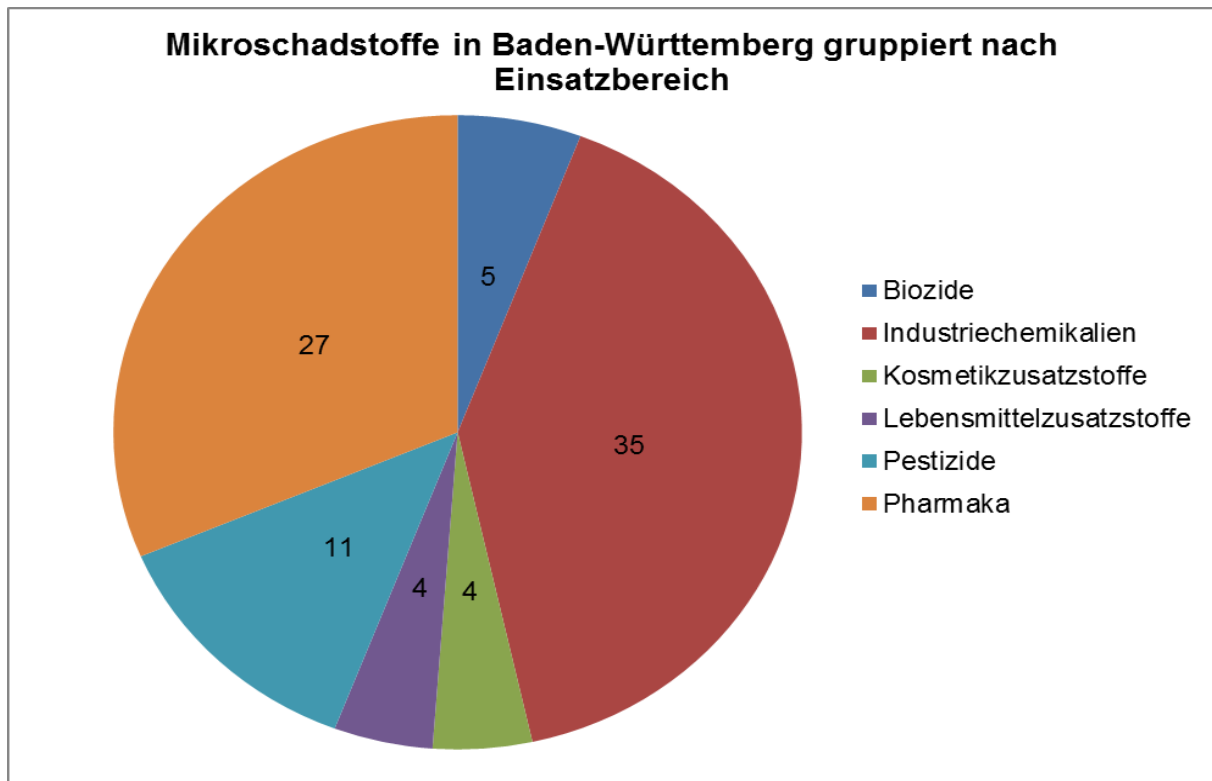


Abbildung 5 Verteilung der in Baden-Württemberg analysierten Substanzen hinsichtlich ihrer Verwendung.

In der bereits beschriebenen Vergleichsstudie (Busch et al. 2016) wurden die biologischen Wirkweisen der in Europas Flüssen detektierten Chemikalien recherchiert und sowohl molekulare biologische Zielstrukturen als auch Wirkprofile dokumentiert. Basierend auf diesen Daten wurden für alle in Baden-Württemberg detektierten Stoffe biologische Wirkweisen zugeordnet. Eine bekannte biologische Wirkweise konnte so für mehr als die Hälfte der Stoffe (48 von 74 Spurenstoffen (ca. 65 %)) identifiziert und zugeordnet werden (Abbildung 6).

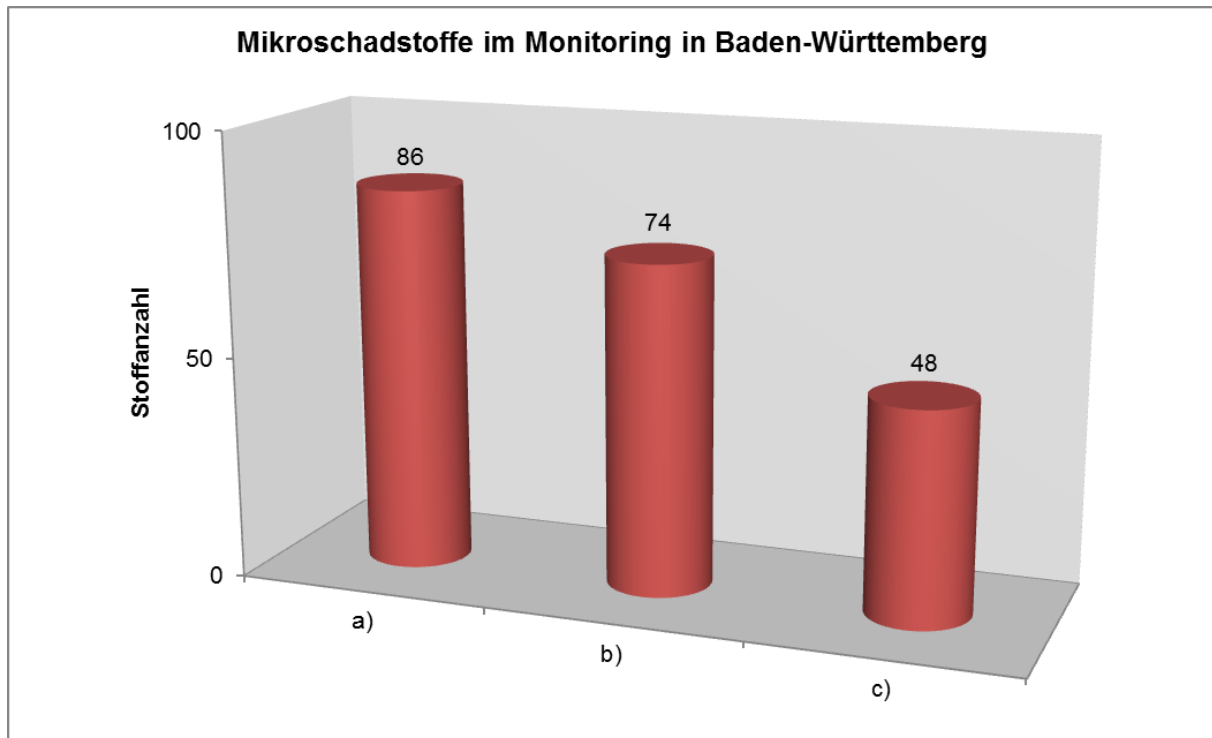


Abbildung 6 Anzahl der Spurenstoffe a) deren Vorkommen in Baden-Württemberg mittels chemischer Analyse untersucht wurde (Stoffe analysiert), b) deren Konzentration in mindestens einer Messung oberhalb des Detektionslimits lag (Stoffe detektiert) und c) denen eine Wirkweise zugeordnet werden konnte.

Bei den 26 Stoffen, die oberhalb des Detektionslimits lagen, denen jedoch keine Wirkweise zugeordnet werden konnte, handelt es sich zum größten Teil um Industriechemikalien, sowie um Transformationsprodukte von Pharmaka bzw. Röntgenkontrastmittel. Im Anhang 5 sind die 74 detektierten Stoffe mit den jeweils zugeordneten Wirkweisen tabellarisch aufgelistet.

Insgesamt wurden 18 Wirkweisen identifiziert, deren Verteilung in Abbildung 7 dargestellt ist.

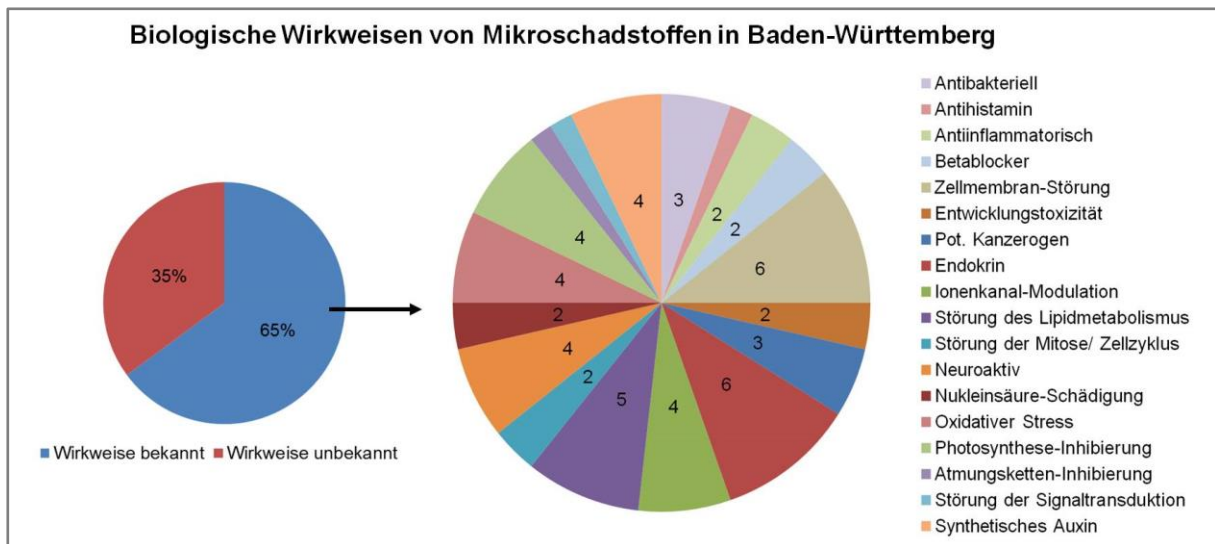


Abbildung 7 Verteilung spezifischer, biologischer Wirkweisen für 48 der 86 in Baden-Württemberg analysierten Spurenstoffe (Vorgehen und Datengrundlage aus Busch et al. 2016).

Neben der Prüfung, inwieweit verfügbare Bioassays Kriterien zur praktikablen Durchführbarkeit, Sensitivität und Spezifität, Robustheit und Wiederholbarkeit sowie zur Durchsatzkapazität erfüllen, sollte auch geprüft werden, welche Wirkweisen von Chemikalien mit den verfügbaren Bioassays detektierbar sind, für welche in der Umwelt vorkommenden Wirkweisen noch keine Bioassays zur Verfügung stehen und mit welchen Bioassays Stoffe mit unbekannter biologischer Wirkung erfasst werden könnten.

4 Welche Bioassays sind für das Gewässermonitoring zu empfehlen?

Aus den Ergebnissen der systematischen Literaturrecherche soll im Folgenden unter Berücksichtigung der in Baden-Württemberg gemessenen Chemikalien und deren biologischen Wirkweisen eine Testbatterie für das Gewässermonitoring vorgeschlagen werden. In der hier beschriebenen systematischen Recherche wurden 209 Bioassays identifiziert, die in 9 Effektdetektionskategorien zusammengefasst wurden (vgl. Kapitel 2.3). Des Weiteren wurden für die in Baden-Württemberg detektierten Chemikalien 18 verschiedene biologische Wirkweisen identifiziert, sowie der Anteil an Stoffen bestimmt, deren biologische Wirkweise unbekannt ist. Um einen Vorschlag für eine geeignete Testbatterie zu erarbeiten wurden in einem zweistufigen Verfahren aus der Vielzahl der identifizierten Bioassays zuerst diejenigen Bioassays herausgefiltert, die sich für die Anwendung im Umweltmonitoring eignen, um diese anschließend einem Vergleich mit den in Baden-Württemberg detektierten Chemikalien und deren Wirkweisen zu unterziehen.

Für die Eignungsprüfung, wurden alle Bioassays hinsichtlich folgender Kriterien geprüft:

- Standardisiertes Protokoll vorhanden?
- Referenzsubstanz bekannt?
- Verwendung in der Regulatorik (z. B. Abwassertestung) etabliert?
- Anwendung in einer Monitoringstudie in Baden-Württemberg (Triebskorn, 2015)?
- Bewertung in einer Expertenbefragung (Kienle et al., 2015)?
- Sensitivität in einer wissenschaftlichen Studie zur Evaluierung von *in vitro* Bioassays für das Gewässermonitoring (Escher et al. 2014)?

Alle 209 Bioassays wurden anhand des in Tabelle 3 beschriebenen Farbcodes nach diesen sechs Kriterien bewertet.

Tabelle 3 Farbschema zur Bewertung der Bioassays

Standardisierung und Einsatz (a-d)	Bewertung (e)	Sensitivität (f)
Ja	gut	sehr hoch
	gut bis mäßig	hoch
	mäßig	niedrig
Nein	schlecht	sehr niedrig
	keine Bewertung	nicht verwendet

Das detaillierte Vorgehen ist in Anhang 6 beschrieben und soll hier nur kurz am Beispiel der Bioassays zur Detektion von östrogenwirksamen Stoffen erläutert werden.

Systematische Bioassay-Auswahl am Beispiel der Detektion östrogenener Effekte

In Tabelle 4 sind alle, in der Literaturrecherche identifizierten und zur Detektion des östrogenen Potentials einer Chemikalie oder Umweltprobe relevanten, Bioassays aufgelistet und nach dem oben beschriebenen Schema bewertet. Der hER α -HeLa-9903-Assay (Nr. 80) hat in 4 Kriterien gute Bewertungen (grün). Weitere Bioassays, wie zum Beispiel der YES-Assay (Nr. 66) oder der ER-CALUX[®]-Assay (Nr. 76) wurden je dreimal positiv bewertet. Im Vergleich zu den Transaktivierungsassays fiel allerdings der häufiger angewendete YES-Assay in der Studie von Escher et al. (2014) (vgl. Tabelle 4, Spalte f) als weniger sensitiv auf. Als Ergebnis dieser Analyse wird der hER α -HeLa-9903-Assay (Nr. 80) für eine Testbatterie vorgeschlagen, da für diesen Assay zudem bereits ein standardisiertes Testprotokoll verfügbar ist (OECD GL 455 (2015)).

Weiterhin gilt es zu überlegen, ob Bioassays, die einen biologisch umfassender aggregierenden Effekt detektieren, wie zum Beispiel die östrogenabhängige Zellwachstumsrate (Proliferationsrate) oder die Störung der Biosynthese von 17 β -Estradiol in eine erweiterte Testbatterie aufgenommen werden sollten. Hierfür kämen der E-Screen-Assay (Nr. 74) und der Steroidsynthese Assay (Nr. 75) (OECD GL 456, 2011) in Frage. In der zuvor beschriebenen Studie erwiesen sich beide Bioassays allerdings ebenfalls als weniger sensitiv im Vergleich zum hER α -HeLa-9903-Assay (Escher et al. 2014; Tabelle 4, Spalte f).

Anti-östrogene Effekte können mit dem Anti-ER-CALUX[®]-Assay (Nr. 77) detektiert werden. Dieser Bioassay erwies sich allerdings in der betrachteten wissenschaftlichen Studie als nicht sensitiv (Escher et al. 2014; Tabelle 4, Spalte f).

Tabelle 4 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „östrogene Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay - Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
64	ChgH -GFP Medaka	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey
65	cyp19a1b- GFP Zebraabärbling	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
66	YES-Assay	Green	Green	Red	Red	Green	Red
67	Plasma Vitellogenin Konzentration	Green	Red	Red	Green	Yellow	Grey
68	Genexpression ER	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
69	Genexpression VTG	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
70	Genexpression EcR	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
71	ex vivo Steroidgenese-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
72	ex vivo Steroidgenese-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
73	(hER, medER)-yeast- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
74	E-Screen-Assay	Red	Green	Red	Green	Grey	Yellow
75	Steroidsyntheseassay	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow
76	ER-CALUX [®] -Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Green
77	Anti ER-CALUX [®] -Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Red
78	MELN-Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Grey
79	HELN-ER α -Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Yellow
80	hER α -HeLa-9903-Assay	Green	Green	Red	Green	Grey	Green
81	ER α -transFACTORIAL-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
82	ER α -GeneBLAzer-Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
83	HELN-ER β -Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
84	ERE-cisFACTORIAL-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
85	MCF7-ERE-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Yellow
86	MCF7 Zellproliferationsassay	Red	Red	Red	Red	Green	Grey
87	ER Transaktivierungsassay	Red	Green	Red	Green	Green	Grey
88	MVLN Zellassay	Red	Green	Red	Green	Green	Grey
89	T47D-KBluc Zellassay	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

4.1 Vorauswahl der Bioassays für das Gewässermonitoring

Die Auswahl aller für eine Testbatterie in Frage kommenden Bioassays nach den hier erklärten Prinzipien ist für jede Effektdetektionskategorie (siehe Kapitel 2.2) ausführlich im Anhang 6 erläutert. Die für jede Effektdetektionskategorie am besten bewerteten Bioassays sind in Tabelle 5 zusammengefasst und kommen für einen Einsatz im Monitoring in Frage. Dabei sind Bioassays, die hier als prioritär für einen Einsatz in einer potentiellen Testbatterie angesehen werden, fett markiert. Die in dieser Tabelle aufgelistete Auswahl an Bioassays dient im Weiteren als Grundlage zur Entwicklung und Empfehlung einer Testbatterie. Dazu wird im Folgenden überprüft, welche der in Baden-Württemberg detektierten Chemikalien (und Wirkweisen) potentiell mit diesen Bioassays (und Effektdetektionskategorien) erfasst würden.

Tabelle 5 Zusammenfassung der vorausgewählten Bioassays inklusive der Angabe zu Effektdetektions- und Subeffektkategorien (Fett markiert = prioritär)

Assay- Bioassay Code*		Effektdetektionskategorie (Subeffektkategorie)
1	<i>Daphnia magna</i> akuter Immobilisierungstest	allgemeine Toxizität Organismen
7	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Algenwachstumshemmungstest	
21	<i>Danio rerio</i> Fischembryotoxizitätstest (FET)	
34	<i>Vibrio fischeri</i> Microtox Bioassay TM	
61	<i>Chlorella vulgaris</i> Imaging-PAM Assay	phytotoxische Effekte
80	hERα-HeLa-9903-Assay	hormonartige Effekte (östrogene Effekte)
76	ER-CALUX [®] -Assay	
87	ER Transaktivierungsassay	
66	YES-Assay	
74	E-screen- Assay	
88	MLN Zellaassay	
75	Steroidsyntheseassay	
77	Anti ER-CALUX [®] - Assay	(anti-östrogene Effekte)
93	Anti- AR-CALUX[®]-Assay	(anti-androgene Effekte)
95	Anti-MDA-kb2-Assay	(androgene Effekte)
94	MDA-kb2-Assay	
92	AR-CALUX [®] -Assay	
108	PR-CALUX [®] -Assay	(progesterone Effekte)
109	Anti-PR-CALUX [®] -Assay	(anti-progesterone Effekte)
100	GR-CALUX[®]-Assay	(glucocorticoide Effekte)
104	GR-Switchgear-Assay	
105	GR-MDA-kb2-Assay	
101	Anti-GR-CALUX [®] -Assay	(anti-glucocorticoide Effekte)
113	TR-CALUX [®] -Assay	(thyroide Effekte)
120	Ames-Test	mutagene/ gentoxische Effekte
122	Mikrokern-Test	
123	UmuC-Test	
133	AChE-Inhibierungsassay	neurotoxische Effekte
140	Jurkat E6.1 I κ B- Assay	Immuntoxizität und
147	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay	oxidativer Stress
163	EROD Aktivitätsmessung	metabolische Enzyme und Rezeptoren (Aktivierung der Biotransformation)
159	PXR-cis/transFACTORIAL-Assay	
162	CAR-yeast-Assay	
174	PPARγ-transFACTORIAL-Assay	(PPAR Signalweg)
183	DR-CALUX[®]-Assay	(AhR Signalweg)
182	AhR-CALFLUX-Assay	

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays wie in Anhang 4 gelistet

Durch eine Gegenüberstellung der 13 priorisierten vorausgewählten Bioassays mit den 74 in Baden-Württemberg detektierten Chemikalien und ihren 18 bekannten biologischen Wirkweisen, wurden Übereinstimmungen und Lücken sowohl auf Seite der biologischen Effektdetektion als auch auf Seite der chemikalienorientierten Wirkweisenbeschreibung identifiziert. Dabei wurden folgende Aspekte berücksichtigt:

- Ist die bekannte Wirkweise einer Chemikalie potentiell mit einem bestimmten Assay detektierbar, d. h. stimmen die biologische Zielstruktur der Chemikalie und der Rezeptor im Bioassay überein oder ist der potentiell betroffene Signalweg im Testorganismus vorhanden?
- Detektiert der Bioassay eine bestimmte Stoffgruppe, welcher die entsprechende Chemikalie zuzuordnen ist?
- Sind von einer Chemikalie, aufgrund ihrer Wirkweise oder Stoffgruppenzuordnung, multiple und unspezifische Effekte zu erwarten?

Bei dem Versuch Übereinstimmungen zwischen den Wirkweisen, die für einzelne Chemikalien bekannt sind, und den einzelnen Effektdetektionskategorien der betrachteten Bioassays zu finden, wurde deutlich, dass dies nicht ohne weiteres möglich ist, da die Wissensbasis auf beiden Seiten zu heterogen ist. Das heißt, eine 1:1 Zuordnung einer bestimmten Chemikalie zu einem bestimmten, potentiell responsiven Bioassay ist hier nicht einfach vorzunehmen. Beispielsweise gibt es keinen Bioassay, der spezifisch die Inhibierung der Cyclooxygenase detektiert. Dies ist der therapeutische Wirkmechanismus schmerzstillender Pharmaka wie Diclofenac und Ibuprofen im Menschen. Eine toxische Summenwirkung solcher Mikroschadstoffe auf Umweltorganismen kann derzeit nur mit Hilfe von organismischen oder allgemein Toxizität indizierenden Bioassays erfasst werden. Ähnliches gilt für Chemikalien mit unbekannter Wirkweise. Im Gegensatz dazu gibt es klare Übereinstimmungen von Wirkweise und Effektdetektor beispielsweise für östrogen-wirksame Substanzen, die direkt mit einem Östrogenrezeptor-Assay erfasst werden können, oder Acetylcholinesterase (AChE)-hemmende Insektizide, die mit einem AChE-Inhibierungsassay detektierbar sind. Bei der Auswahl der Bioassays gilt es hier insbesondere auch die Sensitivitätsproblematik zu beachten. Während organismische Tests (wie beispielsweise der Fischembryotest) insbesondere gegenüber Stoffen mit chronischer Wirkproblematik, wie hormonwirksame oder kanzerogene Stoffe, weitaus weniger sensitiv reagieren als spezifische Bioassays, können AChE Inhibitoren mit dem sensitiven Organismus Wasserfloh (*Daphnia magna* Immobilisierungsassay) oder spezifisch Photosystem II inhibierende Herbizide mit dem organismischen Algenwachstumstest mit entsprechender Sensitivität

erfasst werden. Die Gegenüberstellung zeigt auch, dass einigen bereits anwendungstauglichen Bioassays keine nachgewiesenen Spurenstoffe mit entsprechend bekannter Wirkweise zugeordnet werden können. Dies gilt beispielsweise für den GR-CALUX® Assay welcher glucocorticoide Effekte detektiert, da derzeit für keine Chemikalie des Spurenstoffinventars eine solche Wirkweise bekannt ist. Das genaue Vorgehen der Gegenüberstellung der Spurenstoffe mit ihren Wirkweisen und der Bioassays mit den entsprechenden Effektdetektionskategorien ist im Anhang 7 beschrieben, die Gegenüberstellung in Form einer Tabelle ist im Anhang 8 dargestellt.

4.2 Vorschlag einer Biotestmodulbatterie für das Umweltmonitoring

Aus den Ergebnissen der systematischen Literaturrecherche zu verfügbaren Biotestverfahren, deren Eignungsbewertung und Gegenüberstellung mit potentiell zu detektierenden Chemikalien und deren Wirkweisen (vgl. Anhang 7 und 8) lässt sich abschließend folgender in Abbildung 8 zusammenfassend dargestellter Vorschlag für eine in 3 Module aufgeteilte Biotestbatterie herleiten.

Vorschlag einer modularen Testbatterie

Modul I	Spezifisch detektierbare Stoffe
<ul style="list-style-type: none"> • Akuter Immobilisierungstest (<i>Daphnia magna</i>) • Fischembryotest (<i>Danio rerio</i>) • Algenwachstumshemmtest (<i>P. subcapitata</i>) • hERα-HeLa-9903-Assay • Ames-Test 	<ul style="list-style-type: none"> Insektizide Herbizide Stoffe mit östrogen-ähnlicher Wirkung Gentoxische/mutagene Stoffe
Modul II	Spezifisch detektierbare Stoffe
<ul style="list-style-type: none"> • DR-CALUX[®]-Assay/EROD Aktivitätsmessung • Imaging-PAM-Assay • AChE-Inhibierungsassay 	<ul style="list-style-type: none"> Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe mit Dioxin-ähnlicher Wirkung Photosynthesehemmer AChE-Hemmer (z.B. bestimmte Organophosphate und Insektizide)
Modul III	Spezifisch detektierbare Stoffe
<ul style="list-style-type: none"> • Anti-AR-CALUX[®]-Assay • GR-CALUX[®]-Assay • PPARγ-transFACTORIAL- Assay • Nrf2/ARE-cisFACTORIAL 	<ul style="list-style-type: none"> potentiell anti-androgen wirkende Stoffe Glucocorticoid-Rezeptor bindende Stoffe PPARγ-Rezeptor bindende Stoffe (z.B. PFCs) Stoffe, die potentiell oxidativen Stress in Zellen hervorrufen können (z.B. PFCs)
<ul style="list-style-type: none"> • und weitere in Tabelle 5 gelistete Bioassays, je nach Bedarf 	

Abbildung 8 Biotestbatterie-Vorschlag zur Detektion kombinierter Chemikalienwirkungen von Mikroverunreinigungen im Rahmen des Gewässermonitorings in Baden-Württemberg.

Modul I enthält Bioassays zur Detektion aggregierter (organismischer), sowie spezifischer (potentielle Langzeitschäden indizierende) Chemikalien-Effekte. Für jeden Bioassay des Modul I existiert ein standardisiertes Protokoll, so dass dieses Modul I direkt eingesetzt werden könnte. Es wird hier vorgeschlagen zunächst 3 organismische Bioassays in eine Testbatterie aufzunehmen, da diese die aggregierten Effekte der meisten Chemikalien detektieren sollten (ca. 90% der detektierten Stoffe mit zugeordneter Wirkweise) (Abbildung 8, Modul I). Es kann angenommen werden, dass dies auch für Chemikalien mit unbekannter Wirkweise gilt. Dabei ist bekannt, dass der Daphnien-Test besonders sensitiv gegenüber Insektiziden und der Algen-Test sensitiv gegenüber bestimmten Herbiziden reagiert. Für den Fischembryotest kann hier keine spezifische Stoffgruppe genannt werden, für welche dieser Bioassay als besonders sensitiv gilt. Die Verwendung einer Kombination von Organismen ermöglicht neben der Detektion einer potentiellen Hauptwirkung auch eine Abbildung von unbekanntem Nebenwirkungen. Darüber hinaus sollten Bioassays in die Testbatterie aufgenommen werden, die schädliche chronische Wirkungen anzeigen, welche in den organismischen Bioassays aufgrund der kurzen Beobachtungszeiten nur schlecht erfassbar sind. Dazu zählen östrogene Effekte und gentoxische Effekte. Deshalb wird die Aufnahme eines östrogen-responsiven Bioassays (z. B. hER α -HeLa-9903-Assay) und des Ames-Testes in die Testbatterie vorgeschlagen (Abbildung 8, Modul I). Ein Bioassay, der östrogene Effekte in einer Wasserprobe in Baden-Württemberg detektiert, würde das Summenergebnis der Wirkung von mindestens 5 Stoffen anzeigen (Bisphenol A, Nonylphenol, Estradiol, Estron, und Octylphenol). Auch beim Ames-Test sind 5 Übereinstimmungen zu verzeichnen. Hier ist allerdings unklar, wie sensitiv bzw. wie stark die Summenwirkung verschiedener gentoxischer Stoffe in Wasserproben ausfällt. Ein Sensitivitätsvergleich der 3 in Tabelle 5 vorgeschlagenen Bioassays der Effektdetektionskategorie „gentoxisch/mutagen“ mit einer standardisierten gentoxischen Chemikalien-Mischung wäre hier angeraten, um den Einsatz dieser Bioassays und die Interpretation entsprechender Monitoring-Ergebnisse zu klären und zu erleichtern.

Modul II enthält Bioassays die spezifisch das Vorhandensein bestimmter Stoffgruppen bzw. Wirkweisen indizieren. Herbizide, die speziell die Photosynthese hemmen, würden sowohl mit dem Algenwachstums-inhibierungstest als auch mit dem speziellen Photosynthesehemmtest (I-PAM) erfasst. Für die allgemeine Testbatterie wäre demnach das I-PAM System nicht nötig, stünde aber als zusätzliche Methode z. B. für spezifische, Photosystem II-Inhibitoren versus anderer Herbizide betreffende Monitoring-Fragen zur Verfügung (Abbildung 8, Modul II). Hierbei ist zu beachten, dass eine Standardisierung für

den Photosynthese-Hemmtest (Imaging-PAM-Assay) noch aussteht, dieser jedoch bereits zur Analyse von Umweltproben genutzt wurde (Escher et al., 2014; Jia et al., 2015).

Ähnlich ist der Einsatz des AChE-Inhibierungs-Assays zu bewerten. Es ist gezeigt, dass insbesondere Wasserflöhe sehr sensitiv auf Acetylcholinesterase-hemmende Chemikalien reagieren. Der Daphnien-Test wäre somit zur prinzipiellen Detektion der Summeneffekte solcher Chemikalien in Gewässern ausreichend aber nicht spezifisch. Sollte ein spezifisches Interesse an Summenwirkungen, hervorgerufen von Chemikalien mit dieser spezifischen Wirkweise (z. B. Organophosphate, bestimmte Insektizide, aber auch Stoffe deren Effekt auf dieses molekulare System bisher nicht bekannt ist), bestehen, so kann dieser Bioassay in eine Testbatterie integriert werden (Abbildung 8, Modul II). Hier gilt es die Tauglichkeit des DIN-Standard-Protokolls (DIN 38415-1:1995-02) für die Testung von Umweltproben genauer zu evaluieren, da in ersten Versuchen auch unspezifische Effekte aufgrund von gelöster organischer Substanz (*dissolved organic matter*) bei der Untersuchung komplexer Umweltproben beschrieben wurden. Alternativansätze sind in der Literatur beschrieben (siehe auch Anhang 5, neurotoxische Effekte).

Dioxin-ähnliche Wirkungen können von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) hervorgerufen werden. Eine direkte Bindung und Aktivierung des Ah-Rezeptors, eine Wirkung, die für diese Stoffgruppe bekannt ist, wird mittels des DR-CALUX[®]-Assays detektiert, eine assoziierte Aktivierung eines Indikator-Enzyms kann mit Hilfe des EROD-Assay detektiert werden. Auch diese Bioassays können zur Detektion von Summeneffekten, hervorgerufen durch Chemikalien dieser Stoffgruppe, im Rahmen des Monitorings eingesetzt werden (Abbildung 8, Modul II). Ein systematischer Bioassay-Vergleich unter Verwendung verschiedener Referenzstoffe scheint hier sinnvoll, um anhand der Sensitivität und Spezifität entsprechend den am besten geeigneten Bioassay auswählen zu können. Vorteil des kommerziellen Systems (DR-CALUX[®]) ist das Vorhandensein eines einheitlichen Protokolls, Nachteile sind die potentiell höheren Kosten und eventuell auftretende Probleme im Zusammenhang mit einer behördlich geforderten Offenlegung des Messprinzips. Für den EROD-Assay existiert ein standardisiertes Protokoll für die Durchführung *in vivo* bzw. *in situ* (ISO 23893-2, 2007), jedoch nicht für eine Durchführung *in vitro* (z. B. mit permanenten Fischzelllinien).

Alle weiteren, potentiell für den Einsatz tauglichen Bioassays sind in Modul III zusammengefasst. Für diese Bioassays besteht insbesondere hinsichtlich der Interpretierbarkeit der Messergebnisse noch Forschungs- bzw. Etablierungsbedarf. Für die rezeptorbasierten Bioassays GR-CALUX[®] und Anti-AR-CALUX[®] wurde keine

Übereinstimmung mit einer Chemikalienwirkweise der in Baden-Württemberg detektierten Chemikalien gefunden. Es gibt jedoch Evidenzen, dass Mikroverunreinigungen anti-androgene bzw. glucocorticoide Wirkungen hervorrufen können. Bevor diese Bioassays sinnvoll in einer Routine-Testbatterie eingesetzt werden, sollten sowohl die Identifizierung repräsentativer Positivstoffe als auch die biologischen Informationen zur Effektpropagation, d. h. Evidenzen zu schädlichen Langzeitauswirkung solcher Stoffe genauer bekannt sein, um Messergebnisse entsprechend interpretieren zu können (Abbildung 8, Modul III).

Eine Stoffgruppe, die multiple Wirkungen in Organismen hervorrufen kann, sind per- und polyfluorierte Chemikalien (PFC) wie z. B. Perfluoroctansulfonsäure (PFOS). Für einige der in Baden-Württemberg detektierten PFC sind Wirkungen, wie die Störung des PPAR Signalweges, des Lipidmetabolismus und oxidativer Stress beschrieben. Auch ein negativer Einfluss auf Zellmembranen, Nukleinsäurestrukturen oder den Hormonhaushalt sind in der Literatur beschrieben. Es ist deshalb davon auszugehen, dass aggregierte Summeneffekte dieser Stoffe in organismischen Bioassays detektierbar sein sollten, aber auch dies müsste in einer gezielten Studie bestätigt werden. Des Weiteren stehen der PPAR γ -transFACTORIAL-Assay sowie der Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay zur Verfügung (Abbildung 8, Modul III). Wie bereits oben beschrieben, müsste die Spezifität und Sensitivität dieser Bioassays für diese Stoffgruppe geprüft, sowie die Interpretation von Effekten in diesen Bioassays, hinsichtlich ihrer Bedeutung für die langfristige Gesundheit von Organismen, geklärt werden. Ein Bioassay, der in Summe die Effekte von Chemikalien detektiert, die oxidativen Stress verursachen (wie z. B. der Nrf2-Assay), kann z. B. als Erweiterung zum Ames-Test oder als genereller Indikator für chemische Belastung sinnvoll sein. Eine Weiterentwicklung und genaue Charakterisierung solcher Bioassays zur detaillierten Klärung des Potentials dieser Bioassays im Rahmen eines effektbasierten Monitorings scheint hier empfehlenswert.

Wie bereits zuvor beschrieben, kommen alle in Tabelle 5 aufgelisteten Bioassays für einen Einsatz im Gewässermonitoring in Frage. Die hier erfolgte Priorisierung steht dem Einsatz ähnlich geeigneter, möglicherweise in entsprechenden Laboren bereits etablierter Bioassays nicht gegenüber, sondern ist als Entscheidungsgrundlage und -hilfe zu verstehen.

In Abbildung 9 ist zusammenfassend dargestellt, wie viele der in Baden-Württemberg detektierten Stoffe mit bekannter Wirkweise (48 Stoffe) mithilfe des jeweiligen Moduls erfasst würden. Es wird davon ausgegangen, dass auch die Wirkung eines Großteils der Stoffe mit unbekannter Wirkweise durch die Kombination von organismischen und spezifischen Bioassays mit dieser Testbatterie erfasst würde.

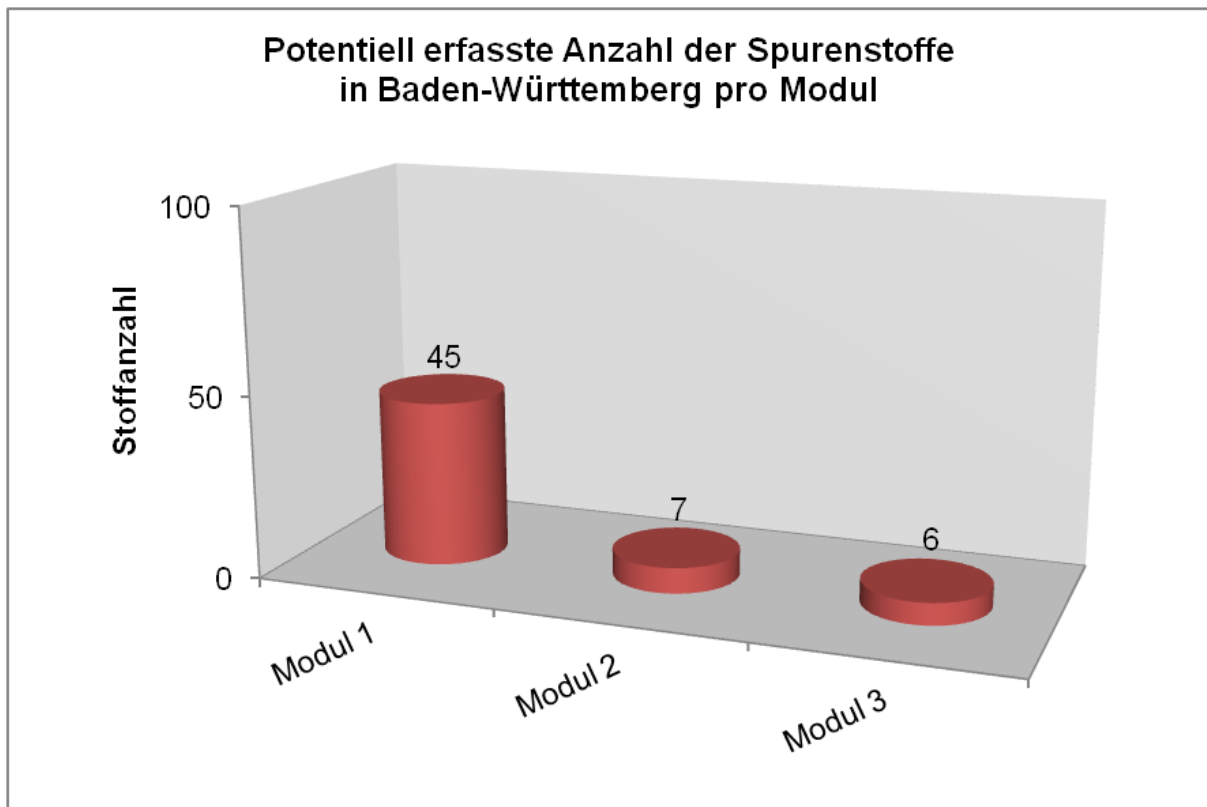


Abbildung 9 Anzahl der Chemikalien des Spurenstoffinventars Baden-Württembergs mit bekannter Wirkweise, die potentiell mit dem jeweiligen Modul der vorgeschlagenen Testbatterie erfasst würden. Es wird davon ausgegangen, dass die Bioassays der 3 Module auch die Wirkung eines Großteils der Stoffe mit unbekannter Wirkweise erfassen.

Je nach Anzahl und Konzentration der Spurenstoffe in einem Gewässer kann ein Bioassay die Summe der Wirkung aller vorhandener und im entsprechenden Bioassay wirksamer Stoffe erfassen. Ein Vergleich der toxischen Potenz verschiedener Umweltproben ist somit direkt möglich und über den Grad der Verdünnung bzw. Anreicherung der jeweiligen Probe quantifizierbar. Dies wurde unter Verwendung von 100 verschiedenen Bioassays eindrucksvoll in einer internationalen Pionierstudie gezeigt (Escher et al., 2014). Auf nationaler Ebene wird hier eine Pilotstudie angeraten, um den Einsatz, die Tauglichkeit und eine Überführung in den Routinebetrieb der hier vorgeschlagenen Modultestbatterie zu erarbeiten.

5 Wie lassen sich Biotest-Ergebnisse bewerten und interpretieren?

5.1 Bewertung von Biotestergebnissen

Die Bewertung der chemischen und ökologischen Qualität von Gewässern nach der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) erfolgt bislang anhand der gemessenen Konzentrationen von sogenannten prioritären Stoffen und flusseinzugsgebietspezifische Kontaminanten. Für die Bewertung werden die ermittelten Konzentrationen mit europäisch (für prioritäre Stoffe) oder national festgelegten Umweltqualitätsnormen (*environmental quality standards* - EQS) verglichen. Diese EQS geben Konzentrationen an, die den nachhaltigen Schutz von Mensch und Umwelt gewährleisten sollen und die in Gewässern nicht überschritten werden sollten (European Commission, 2011). In Bezug auf die Überwachung der Einhaltung von EQS stehen chronische toxische Wirkungen und damit i.d.R. niedrige Stoffkonzentrationen in der Umwelt im Vordergrund. Umweltproben müssen daher für die chemische Analytik angereichert (und oftmals zusätzlich vorgereinigt) werden. Für die biotestgestützte Analytik ist ebenfalls i. d. R. eine Anreicherung erforderlich, da die biologischen Effekte auf relativ kurzen Zeitskalen, d. h. im Bereich von Stunden erfasst werden sollen (während die negativen Auswirkungen für chronische Effekte auf langen Zeitskalen beurteilt werden). In diesem Zusammenhang wird von einer Extraktion der Umweltprobe gesprochen und die Anreicherung (der Kontaminanten) wie folgt beschrieben:

$$(Gl. 1) \quad AF (Extraktion) = \frac{V (Wasser)}{V (Extrakt)}$$

wobei AF für Anreicherungsfaktor und V für Volumen steht.

Für die Anreicherung von Umweltproben stehen verschiedene Verfahren aus der chemischen Analytik zur Verfügung, welche bereits in für die bioassaygestützte Analyse von Umweltproben angewendet wurden (z. B. König et al., 2017; Neale et al., 2017). Es ist darauf hinzuweisen, dass die vorliegenden Erfahrungen mit angereicherten Proben für die Verwendung in Bioassays noch überschaubar sind und derzeit noch keine standardisierten oder universell akzeptierten Protokolle existieren. Bei der Durchführung eines Anreicherungsverfahrens sind Kontrollen (z. B. Leerwertkontrollen) mitzuführen, um verfahrensbedingte Einflüsse auf das Biotestergebnis ausschließen zu können. Der aus einer angereicherten Umweltprobe gewonnene Extrakt wird über Verdünnungsreihen hinsichtlich seiner konzentrationsabhängigen Effekte geprüft:

$$(Gl. 2) \quad VF (Bioassay) = \frac{V (Extrakt)}{V (Bioassaymedium \text{ und } Extrakt)}$$

wobei VF für Verdünnungsfaktor und V für Volumen steht.

Die Detektion biologischer Effekte von Extrakten aus Umweltproben hängt von der Gesamtkonzentration der in einer Probe enthaltenen wirksamen Substanzen ab. Die Wirksamkeit einer Probe kann, ähnlich wie für Einzelstoffe, durch Messungen entlang eines Konzentrationsgradienten erfasst und direkt mit der einer entsprechenden Referenzsubstanz verglichen und bewertet werden. Hierfür kann der relative Anreicherungsfaktor (im englischen Sprachgebrauch: *relative enrichment factor* – REF) genutzt werden (Escher & Leusch, 2012). Für die Berechnung des REFs wird der Anreicherungsfaktor (AF) aus dem Extraktionsprozess (Gl. 1) mit dem Verdünnungsfaktor (VF, Gl. 2) für den Bioassay multipliziert:

$$(Gl. 3) \quad REF = AF (Extraktion) * VF (Bioassay)$$

Die damit universell skalierte Expositionskonzentration kann für die Bewertung verwendet werden (z. B. REF = 1: Konzentration an Stoffen im Bioassay-Expositionsmedium $\hat{=}$ Konzentrationen in nativer Umweltprobe; REF > 1 (z. B. 10): Stoffe im Biotestmedium liegen angereichert vor (z. B. 10-fach konzentriert im Vergleich zur Umweltprobe); REF < 1: Umweltprobe wurde verdünnt, Konzentrationen im Biotestsystem entsprechend niedriger als im Original). Mit Hilfe des REFs lässt sich die summarische Wirksamkeit einer Umweltprobe direkt mit der Wirksamkeit einzelner Stoffe (z. B. Referenzsubstanz) vergleichen bzw. normieren (siehe Abbildung 10). Wenn eine Umweltprobe bei einem Anreicherungsfaktor von beispielsweise 100 einen halbmaximalen Effekt hervorruft (REF₅₀), entspricht dieser REF einer Konzentration der Referenzsubstanz von hier beispielhaft 10 µg/L (EC₅₀).

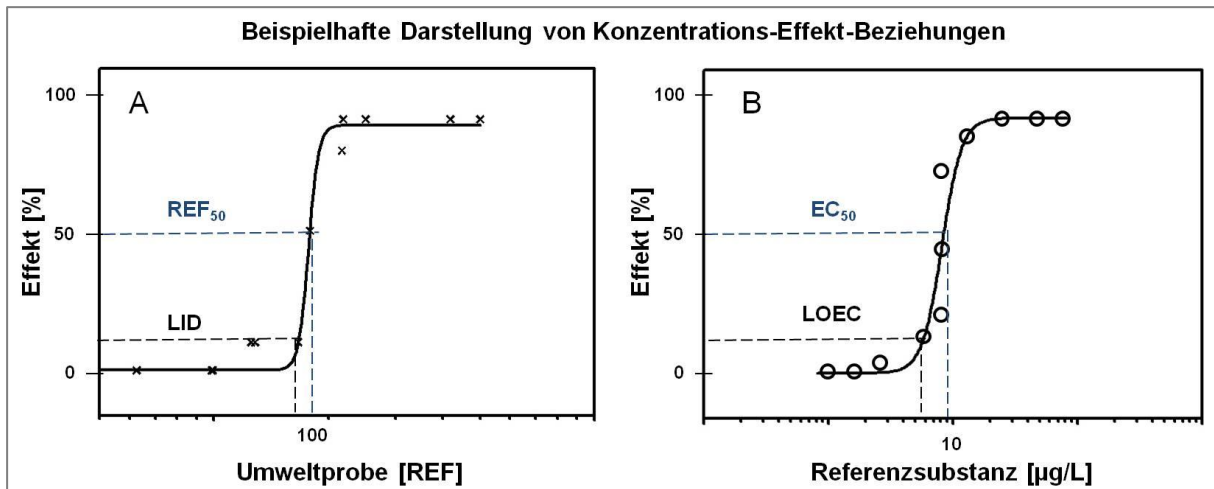


Abbildung 10 Konzentrations-Effekt-Beziehungen nach der Analyse einer Probe mithilfe eines Bioassays. A) Beispielhafte Darstellung eines Ergebnisses einer Umweltprobenanalyse (Konzentration als relativer Anreicherungsfaktor (REF) angegeben); B) Beispielhafte Darstellung einer Dosis-Wirkungskurve der Referenz-Substanz im selben Bioassay (Konzentrationsangabe in µg/L). LID = *lowest ineffective dilution*, LOEC = *lowest observed effect concentration*.

Durch Division der einmalig zu ermittelnden Effektkonzentration (z. B. EC₅₀ oder LOEC) für die Referenzsubstanz durch den umweltprobenspezifisch zu ermittelnden äquipotenten REF₅₀ (bzw. LID) kann jeweils eine bioanalytische Äquivalenzkonzentration (*bioanalytical equivalent concentration* - BEQ) berechnet werden:

$$(Gl. 4) \quad BEQ_{bio} = \frac{EC(\text{Referenzsubstanz})}{REF(\text{Umweltprobe})}$$

Der BEQ im angegebenen Beispiel wäre demnach 0,1 µg/L (EC₅₀/REF₅₀). Unter der Annahme, dass sich die Konzentrations-Effekt-Beziehung der Umweltprobe ähnlich verhält, wie die der Referenzsubstanz, ließe sich hier schlussfolgern, dass die unverdünnte Umweltprobe eine Kontamination enthält, die äquivalent zur Wirkung von 0,1 µg/L der Referenzsubstanz ist. Damit hat die Verwendung des BEQ den Vorteil, dass die abgeleiteten wirkäquivalenten Stoffkonzentrationen direkt mit festgelegten Grenzwert-Konzentrationen, etwa den EQS-Werten, verglichen werden können. Würde der hier exemplarisch dargestellte BEQ beispielsweise das Ergebnis einer Östrogeneffektanalyse darstellen, so könnte dieser Wert von 0,1 µg/L direkt mit dem festgelegten Umweltqualitätsstandard für 17β-Estradiol (EQS = 4.0·10⁻⁴ µg/L) verglichen und eine Bewertung des Risikos für Wasserorganismen vorgenommen werden.

Das hier vorgestellte BEQ - Konzept lehnt sich an ein Vorgehen an, das bereits seit längerem von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Beurteilung der

Humantoxizität für „dioxinähnliche“ Stoffe verwendet wird. Dabei werden für die Beurteilung der Wirkstärke verschiedener organischer Stoffe und deren Gemische Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) verwendet, um die unterschiedlichen Wirksamkeiten der Stoffe zu berücksichtigen. Die relative Wirksamkeit eines „dioxinähnlichen“ Stoffes wird im Vergleich zu der Referenzsubstanz 2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8 TCDD) auf Grundlage von *in vivo*- und *in vitro*-Daten bewertet. Um das toxische Potential einer Mischung zu kalkulieren (Toxizitätsäquivalent-TEQ), werden dann die Produkte aus TEF und der jeweiligen Konzentration der verschiedenen Stoffe aufaddiert (Van den Berg et al., 1998).

Dieses Vorgehen lässt sich einfach für Bioassays anwenden, die spezifische Effekte detektieren, wie beispielsweise östrogene Wirkung oder auch Photosyntheseinhibition. Es impliziert allerdings hinreichende Kenntnisse über die relative Wirksamkeit einzelner Stoffe für den jeweiligen Bioassay. Das Vorgehen funktioniert ebenfalls für die Analyse apikaler Endpunkte wie die Algenwachstumsinhibition. Unmittelbar überzeugend kann es angewendet werden, wenn die verwendeten Referenzsubstanzen eine Bioassay-spezifische Wirkweise haben und für diese bereits ein EQS-Wert existiert (z. B. 17 β -Estradiol für östrogene Wirkung und Diuron für Photosynthese-Inhibition sowie auch Algenwachstumsinhibition). Bioassays, die apikale Endpunkte in Daphnien und Fischembryonen analysieren, sind einerseits einer Effektinterpretation direkt zugänglich, da biologische Qualitätselemente (wie sie für die EQS-Ableitung nach der WRRL verstanden werden) unmittelbar erfasst sind. Andererseits sind die in den standardisierten Protokollen als verfahrenstechnische Positivkontrollen verwendeten Referenzsubstanzen (Zinksulfat, 3,4-Dichloranilin) als Bewertungsreferenzen im dargestellten Sinne untauglich, da es sich bei diesen Stoffen nicht um relevante Umweltkontaminanten handelt. Hier wären also zusätzliche Anstrengungen erforderlich, falls das skizzierte Bewertungsvorgehen angewendet werden soll. Mit Dichlorvos und Diclofenac befinden sich Stoffe auf der Liste prioritärer Substanzen nach der WRRL die sich als Bewertungsreferenzen (für Daphnien und Fischembryonen) ähnlich dem dargestellten Beispiel für Diuron und Algen entwickeln ließen. Auch wenn ein effektbasiertes Umweltmonitoring mit Biotestverfahren die Summenwirkung einer komplexen Mischung und nicht die Wirkung einzelner Substanzen erfasst, ist es hinsichtlich der Bewertung zunächst eher mit Verfahren der chemischen Analytik zu vergleichen als mit ökologischen Verfahren zur Bewertung von Stresseffekten auf das Ökosystem. Es wird der Grad der Kontamination eines Gewässers in seiner Summe über Wirkanalyse erfasst und bewertet.

5.2 Effektbasiertes Monitoring im Rahmen des Vorsorgeprinzips

Der Bezug gemessener Effektkonzentrationen auf bekannte Umweltqualitätsnormen (EQS) erlaubt also eine direkte Bewertung der Kontamination und kann damit, auch ohne Kenntnis über einzelne Kontaminanten, einen direkten Hinweis darauf geben, ob Mikroschadstoffe ursächlich für einen schlechten ökologischen Zustand sein können. Betrachtet man die 86 in Baden-Württemberg gemessenen Mikroschadstoffe, so lässt sich über eine einfache Analyse ein Summengefährdungsquotient beispielsweise für jeden untersuchten Standort berechnen. Hierzu werden die Umweltkonzentrationen der Chemikalien (z. B. Maximalwert oder 95. Perzentil pro Standort) durch die Effektkonzentration (z. B. LOEC oder 5. Perzentil) der jeweiligen Substanz in einer bestimmten Spezies bzw. in einem bestimmten Bioassay geteilt und anschließend alle Quotienten eines Standortes aufsummiert. Das genaue Vorgehen ist beispielsweise in Busch et al. (2016) beschrieben. Das Ergebnis einer solchen Analyse für Baden-Württemberg ist in Abbildung 11 dargestellt.

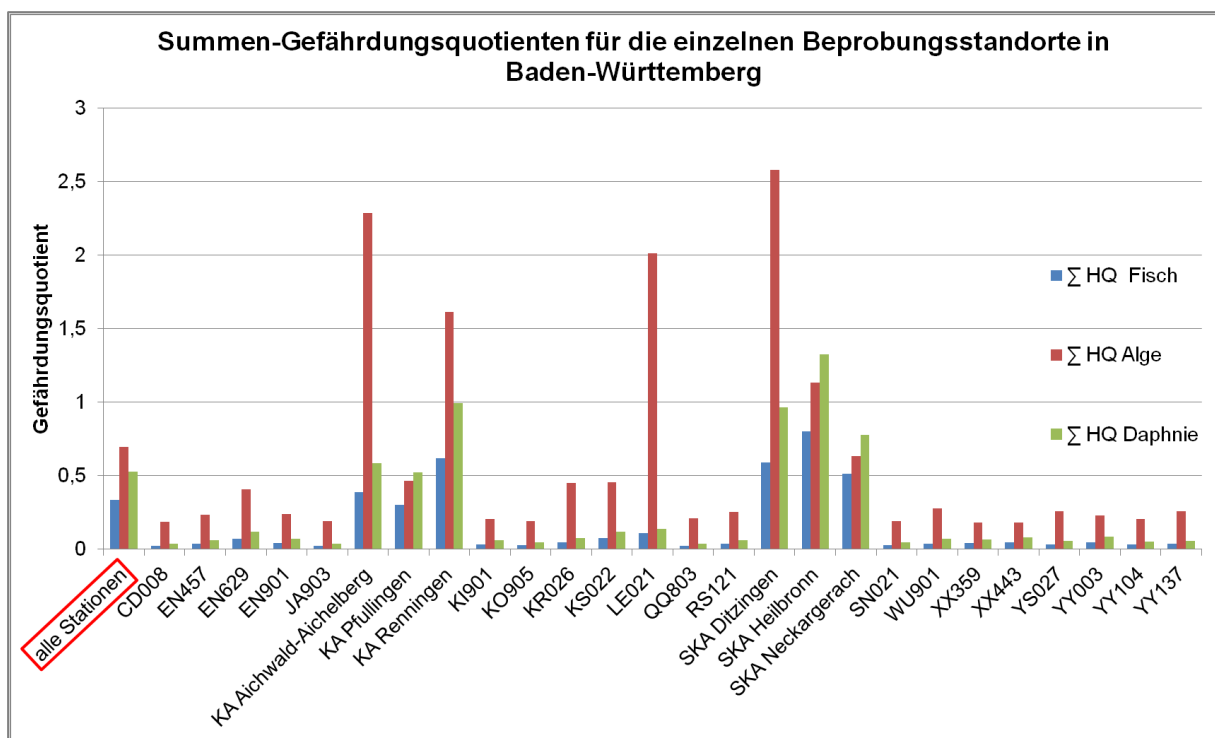


Abbildung 11 Summengefährdungsquotienten für Algen, Daphnien und Fische berechnet nach Busch et al. (2016) mit den Konzentrationen der in Baden-Württemberg monatlich erfassten Mikroschadstoffe an 26 Standorten, sowie der Gesamtkonzentration aller Standorte (rot markiert).

Es ist zu erkennen, dass der Gefährdungsquotient für Algen, Wasserflöhe und Fische jeweils an den Kläranlagenstandorten am höchsten ist. Teilweise ist der errechnete Summengefährdungsquotient höher als 1, was bedeutet, dass im entsprechenden Biotestsystem bereits mit unverdünnter Probe biologische Effekte zu erwarten wären. Ein

Gefährdungsquotient von 0,5 bedeutete einen zu erwartenden Effekt bei einer Anreicherung der Umweltprobe um den Faktor 2. Ein Vergleich von beispielsweise Algentestergebnissen in Form von REF₅₀ Werten mit den hier durch die Herbizid- und Triclosanbelastung bestimmten Gefährdungsquotienten würde bei Nichtübereinstimmung (REF₅₀ niedriger als über Summengefährdungsquotient erwartet) direkt auf die Anwesenheit weiterer algentoxischer Stoffe hinweisen.

Insbesondere für den Algenwachstumsinhibierungstest konnte bereits gezeigt werden, dass gemessene Effekte häufiger durch die chemisch-analytisch erfassten Herbizide erklärbar sind (Neale et al. 2016, König et al. 2016). Im Gegensatz dazu ließen sich Ergebnisse eines Bioassays, der spezifisch östrogene Effekte analysiert, mit Umweltproben in der Studie von Neale und Kollegen nur zu unter einem Prozent durch die chemisch analysierten Stoffe mit bekannter östrogener Wirkung erklären. Diese Studien deuten die Lücken im chemischen Monitoring an und weisen auf das Potential von effektbasiertem Monitoring hin.

Für die Extrapolation von Effektbeobachtungen auf andere Komplexitätsstufen kann das, im Bereich der toxikologischen Forschung sich zunehmend entwickelnde, *Adverse Outcome Pathway* (AOP)-Konzept von Ankley und Kollegen (2010) herangezogen werden. Das AOP-Konzept (Ankley et al., 2010) wurde entwickelt, um Beobachtungen und Wissen über molekulare, biologische Reaktionen bei Chemikalienexposition für die Umweltrisikobewertung von Chemikalien nutzbar zu machen. Der Grundgedanke dabei ist, dass schädliche Wirkungen eines Stoffes auf Populationen oder ganze Ökosysteme bereits in einem früheren Stadium in veränderten biologischen Reaktionsketten auf molekularer Ebene erkennbar sind. Für diese Annahme finden sich einige gut dokumentierte Beispiele, wie im Report der europäischen Umweltagentur von 2001: „*Late lessons form early warnings: the precautionary principle 1896-2000*“ (European Environment Agency, 2001). Obwohl das AOP-Konzept wissenschaftlich weitreichende Akzeptanz findet und sich auch bis in die prospektive Chemikalienrisikobewertung hinein breite Aktivitäten entfaltet haben, bestehen noch erhebliche Wissenslücken für die Nutzung in dem hier betrachteten Kontext. Insbesondere gelten erst einige wenige der potenziell zahlreichen biologischen Reaktionsketten als gut beschrieben und damit für eine Nutzung im Bereich der Risikobewertung geeignet. Für die Prognose schädlicher Auswirkungen auf aquatische Lebensgemeinschaften auf der Basis von Biotest-Ergebnissen für stichprobenartig geprüfte Umweltproben stellen sich neben den oben erörterten Anforderungen noch eine Reihe weiterer Herausforderungen. Insbesondere wäre es sachlich geboten für die Bioassays die zur Umweltbeobachtung eingesetzt werden, die Beziehungen zu den relevanten AOPs eindeutig und quantitativ zu kennen. Weiterhin wird für eine wachsende Anzahl von AOPs zwar die Kausalität zwischen chemischer Belastung und schädlicher Effekte für einzelne

Stoffe etabliert, die Frage der Beurteilung von Kombinationseffekten durch Mischungsexpositionen ist bislang jedoch nicht geklärt. Schließlich wäre auch das Expositionsregime bei der Bewertung zu reflektieren: Umweltproben stellen in der Regel räumliche und zeitliche Schnappschüsse (Stichproben) dar. Ähnlich einer chemisch orientierten Analytik können diese zur Erfassung von Spitzenbelastungen beitragen, wenn eine ereignisgestützte Probennahmestrategie vorliegt. Für die Bewertung von Langzeit- oder Durchschnittsbelastungen wären alternative Strategien der zeitgemittelten oder repräsentativ angelegten Probennahme anzuwenden. Diese müssten hinsichtlich der erforderlichen Anreicherungstechniken für die Bioassayuntersuchungen erst aus den vorliegenden Methoden adaptiert werden.

6 Schlussfolgerung und Handlungsbedarf

In den letzten 16 Jahren wurde eine große Anzahl an Biotestverfahren (209) in der Wissenschaft entwickelt und insbesondere für die Einzelstofftestung verwendet. Die vorliegende Studie zeigt, dass momentan nur ein Bruchteil dieser Verfahren, nämlich 36 Bioassays, für die Anwendung im Gewässer-Monitoring schon geeignet ist.

Durch einen direkten systematischen Vergleich der verfügbaren Bioassays (Stand der Forschung) und der in Baden-Württemberg derzeit detektierten Mikroschadstoffe wurde in dieser Studie eine in 3 Module gegliederte Testbatterie entwickelt. Dabei stimmen die hier erarbeiteten Empfehlungen der einzusetzenden Bioassays mit den Befunden einer von Kienle und Kollegen durchgeführten Expertenbefragung aus dem Jahr 2015 prinzipiell überein, gehen jedoch insgesamt über deren Vorschlag hinaus. Die hier durchgeführte systematische Analyse unter Berücksichtigung der Mikroschadstoffe Baden-Württembergs ergab, dass organismische Biotestverfahren derzeit essentiell für ein biologisches Gewässermonitoring sind, da Bioassays, die spezifische Effekte erfassen, zum größten Teil noch in der Entwicklung stehen bzw. zum Teil noch keine Assays für nachweisbare Mikroschadstoffe und deren spezifische Effekte bekannt sind. Bereits anwendbare, spezifische *in vitro* - Biotestverfahren detektieren meist chronische Effekte und stellen somit eine sinnvolle Ergänzung zu organismischen Kurzzeittests dar.

Ein großer Vorteil bei der Nutzung von effektbasierten Methoden für die Umweltbeobachtung und das Gewässermonitoring ist, dass nicht eine Vielzahl von Substanzen chemisch analysiert werden muss, sondern dass Umweltproben in ihrer komplexen stofflichen Zusammensetzung durch die Bioassays weitgehend komplett charakterisiert werden. Damit kann die Vielzahl der darin möglicherweise erhaltenen, auch unbekannt, Stoffe über deren Effekte erfasst werden. Die genaue Stoffzusammensetzung bleibt dabei zwar unbekannt, durch wirkungsspezifische Bewertungsreferenzen können die beobachteten Mischungseffekte von Bioassays jedoch in stoffäquivalente Konzentrationen umgewandelt werden. Diese können dann analog zu einer stoffkonzentrationsbasierten Bewertung von Umweltkontaminanten genutzt werden und berücksichtigen jedwede Kombinationswirkung für die beobachteten Effekte.

Insbesondere im Bereich der Probenanreicherung sowie bei der Etablierung und Standardisierung von umweltrelevanten Referenzsubstanzen und deren Umweltqualitätsnormen bzw. äquivalenter definierter Bewertungsmaßstäbe besteht derzeit Entwicklungsbedarf. Weiterhin ist der Einsatz einiger potentiell geeigneter Bioassays im

Routine-Monitoring aufgrund fehlender Standardisierung noch nicht möglich. Diese Problematik wurde bereits von Kienle und Kollegen erörtert (Kienle et al., 2015).

Eine Pilotstudie könnte die Einsatzreife und Handhabbarkeit der vorgeschlagenen Modultestbatterie prüfen und die angesprochenen Limitierungen adressieren und beseitigen. Beprobungsstandorte in Baden-Württemberg könnten dabei auf Grundlage der berechneten Gefährdungsquotienten gewählt werden (vgl. Kapitel 5). Um insbesondere die Fragen nach der Anreicherung und Bewertung der Bioassay-Ergebnisse praktisch zu erproben und schließlich effektbasierte Verfahren im Gewässermonitoring zu etablieren sollten in einer Pilotstudie zunächst Bioassays des Modul I verwendet werden.

7 Referenzliste

- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J. a, Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–41. doi:10.1002/etc.34
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1887–1899. doi:10.1002/etc.3460
- DIN 38415-1:1995-02: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest), Beuth Verlag GmbH, Berlin
- EG-Wasserrahmenrichtlinie Nr. 2000/60/EC, 2000. Europäische Kommission, Brüssel
- Escher, B., Leusch, F., 2012. Dose response assessment, in: *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*. IWA Publishing, London
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., Burg, B. Van Der, Linden, S.C. Van Der, Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with *in vitro* bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956. doi:10.1021/es403899t
- European Commission, 2011. Common Implementation Strategy for the WFD, Guidance Document No. 27, Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards. doi:10.2779/43816
- European Environment Agency, 2001. Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896–2000. Environmental issue report No 22. doi:10.1136/oem.59.11.789-a

- International Organization for Standardization (ISO), 2002. Water quality — Biochemical and physiological measurements on fish — Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD, ISO 23893-2).
- Jia, A., Escher, B.I., Leusch, F.D.L., Tang, J.Y.M., Prochazka, E., Dong, B., Snyder, E.M., Snyder, S.A., 2015. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Res.* 80, 1–11. doi:10.1016/j.watres.2015.05.020
- Kienle, C., Gauch, R., Werner, I., Häner, A., 2015. Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Ökotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf
- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut.* 220, 1220–1230. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.011
- Küster, E., 2005. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquat. Toxicol.* 75, 76–85. doi:10.1016/j.aquatox.2005.07.005
- Lehmann, M., Scherer, I., Stier, K., Maier, U., 2014. Spurenstoffinventar der Fließgewässer in Baden-Württemberg, August 2014. LUBW - Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg Referat 41 – Gewässerschutz, Karlsruhe
- Neale, P.A., Munz, N.A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherová, K., Kienle, C., Novák, J., Seiler, T.-B., Shao, Y., Stamm, C., Hollender, J., 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785–795. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.141
- OECD, 2006. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1-26. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264069923-en
- OECD, 2015. Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264243040-en

- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264203709-en
- OECD, 2011. Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264122642-en
- OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264069947-en
- Omicinski, C.J., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Peters, J.M., 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120. doi:10.1093/toxsci/kfq338
- Triebkorn, R., 2015. Belastung der Argen unterhalb des Regenklärbeckens Dürren, A96 Gebrazhofen. Steinbeis-Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie, Rottenburg und Physiologische Ökologie der Tiere, Universität Tübingen
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–92. doi:10.1289/ehp.98106775

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Beobachtbare Effekttypen bei Verwendung von Bioassays	S. 3
Abbildung 2	Bioassays zur Analyse von Effekten	S. 9
Abbildung 3	Umweltkonzentrationen häufig detektierter Gewässerspurenstoffe in Europa	S. 12
Abbildung 4	Umweltkonzentrationen häufig detektierter Gewässerspurenstoffe in Europa und Baden-Württemberg	S. 13
Abbildung 5	Mikroschadstoffe in Baden-Württemberg gruppiert nach Einsatzbereich	S. 14
Abbildung 6	Mikroschadstoffe im Monitoring in Baden-Württemberg	S. 15
Abbildung 7	Biologische Wirkweisen von Mikroschadstoffen in Baden-Württemberg	S. 16
Abbildung 8	Vorschlag einer modularen Testbatterie	S. 24
Abbildung 9	Potentiell erfasste Anzahl der Spurenstoffe in Baden-Württemberg pro Modul	S. 28
Abbildung 10	Beispielhafte Darstellung von Konzentrations-Effekt-Beziehungen	S. 31
Abbildung 11	Summengefährdungsquotient für die einzelnen Beprobungsstandorte in Baden-Württemberg	S. 33

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammenfassung der Kategorien für die Assay-Erschließung	S. 6
Tabelle 2	Europäische, wissenschaftliche Monitoringstudien	S. 11
Tabelle 3	Farbschema zur Bewertung der Bioassays	S. 18
Tabelle 4	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „östrogene Effekte“	S. 19
Tabelle 5	Zusammenfassung der vorausgewählten Bioassays inklusive der Angabe zu Effektdetektions- und Subeffektkategorien	S. 21
Tabelle 6	Detailliertes Farbschema zur Bewertung der Bioassays	S. 75
Tabelle 7	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“	S. 76
Tabelle 8	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „allgemeine Toxizität Zellen“	S. 78
Tabelle 9	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „phytotoxische Effekte“	S. 79
Tabelle 10	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „androgene Effekte“	S. 80
Tabelle 11	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „progesterone Effekte“	S. 81
Tabelle 12	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „glucocorticoide Effekte“	S. 81
Tabelle 13	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „thyroide Effekte“	S. 82
Tabelle 14	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „mutagene/gentoxische Effekte“	S. 83
Tabelle 15	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „neurotoxische Effekte“	S. 84
Tabelle 16	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „Immuntoxizität und oxidativer Stress“ und speziell „Immuntoxizität“	S. 85
Tabelle 17	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „Immuntoxizität und oxidativer Stress“ und speziell „oxidativer Stress“	S. 86
Tabelle 18	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „Aktivierung der Biotransformation“	S. 87
Tabelle 19	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „PPAR Signalweg“	S. 88
Tabelle 20	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „Bindung an den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)“	S. 89
Tabelle 21	Bewertung weiterer Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“	S. 90
Tabelle 22	Bewertung der Bioassays in der Kategorie „sonstige spezifische Effekte“	S. 91

9 Anhang

Anhang 1 – Erläuterungen zur systematischen Literaturrecherche

Definition der Suchterme

Für die systematische Literaturrecherche wurden Stichworte (*keywords*) definiert, die in *Web of Science* zur Suche genutzt wurden. Die ausgewählten Stichworte sollten dabei so spezifisch wie nötig und möglich sein, um zum einen nicht zu viel relevante Literatur zu verlieren und zum anderen für dieses Vorhaben nicht relevante Literatur so gut wie möglich auszuschließen. Die unter Punkt 2.2 beschriebenen Kriterien erklären, welche Art von Studien in diesem Projekt Beachtung finden sollten. Basierend auf diesen Kriterien wurden, wie im Folgenden beschrieben, die Suchterme für die systematische Recherche gewählt.

Dabei wurden alle Studien erfasst, die mit der folgenden Suchstrategie gefunden wurden:

*water -Bezug zum aquatischen System,

AND monitoring OR environment* - Zusammenhang mit Monitoring oder Umwelt, AND bioassay* OR biotest* OR bioanalytic* OR biosensor* - Synonyme für Biotestverfahren,

AND tox* - Bezug zu Toxikologie.

Des Weiteren wurden folgende Stichworte definiert, die gezielt zum Ausschluss bestimmter Suchergebnisse führen sollten:

NOT chemosensor - keine Chemosensoren, d. h. keine artifiziellen biologischen Systeme, die gezielt Einzelchemikalien detektieren, z. B. ELISA

NOT chronic OR life cycle OR long-term - nur *in vitro*- und akute *in vivo*-Bioassays, jedoch keine chronischen Tests

NOT sediment OR soil - keine Studien, die Sediment oder Bodenproben analysiert haben

NOT risk assess* - die Einbindung von „AND risk assess*“ wurde geprüft, führte aber zu keiner Verbesserung der Suchergebnisse (Studien, die sich zwar mit Risikobewertung, aber nicht zwingend mit der Durchführung von Bioassays beschäftigt haben).

Mit Hilfe einer ersten Sichtung der Suchergebnisse wurde überprüft, ob die gefundenen Studien relevant für das vorliegende Projekt waren. Wenn wiederholt Literaturstellen gefunden wurden, deren Thematik als für dieses Vorhaben irrelevant eingestuft wurde (z. B. toxische Organismen, toxische Algen, humantoxikologische Untersuchungen mit Ratten und Mäusen), so wurden diese Terme schrittweise, durch Anpassung der Suchstrategie mithilfe des Operators NOT, ausgeschlossen.

Folgende Suchstrategie wurde für die systematische Literaturrecherche final verwendet:

	*water
AND	monitoring OR environment*
AND	bioassay* OR biotest* OR bioanalytic* OR biosensor*
AND	tox*
NOT	sediment OR soil
NOT	toxic specie* OR toxic orga* OR algal tox*
NOT	risk assess*
NOT	bloom*
NOT	chronic OR life cycle OR long-term
NOT	chemosensor*
NOT	rat OR mouse

Zusätzlich wurde der zu untersuchende Publikationszeitraum auf 16 Jahre begrenzt (2000-2016) und ein *Web of Science* Filter zur Eingrenzung auf das Forschungsfeld *environmental sciences, ecology* genutzt. Mit dieser angegebenen Suchstrategie wurden 333 Literaturstellen identifiziert (Stand 01.07.2016), von welchen 25% als für dieses Projekt als relevant eingestuft wurden. In einem nächsten Prüfschritt wurden alle Studien entfernt, die keine Methodenbeschreibung zum verwendeten Bioassay bzw. keinen entsprechenden Verweis enthielten.

Anhang 2 - Referenzliste als Ergebnis der Literaturrecherche

- Ahmed, H. & Häder, D.P., 2011. Monitoring of waste water samples using the ECOTOX biosystem and the flagellate alga *Euglena gracilis*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 216(1-4), pp. 547–560.
- Allinson, M. et al., 2010. *In vitro* and immunological assessment of the estrogenic activity and concentrations of 17beta-estradiol, estrone, and ethinyl estradiol in treated effluent from 45 wastewater treatment plants in Victoria, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), pp. 576–86.
- Arias-Barreiro, C.R. et al., 2010. Ecotoxicological characterization of tannery wastewater in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Environmental Biology*, 31(4), pp. 471–475.
- Barbério, A., Voltolini, J.C. & Mello, M.L.S., 2011. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, 20(4), pp. 927–935.
- Beauregard, T. & Ridal, J., 2000. Evaluation of six simple bioassays for the determination of drinking water quality-Canadian results. *Environmental Toxicology*, 15(4), pp. 304–311.
- Bicchi, C. et al., 2009. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of the Total Environment*, 407(6), pp. 1842–51.
- Castillo, L.E., Pinnock, M. & Martinez, E., 2000. Evaluation of a battery of toxicity tests for use in the assessment of water quality in a Costa Rican laboratory. *Environmental Toxicology*, 15(4), pp. 312–321.
- Cavallin, J.E. et al., 2014. Integrated assessment of runoff from livestock farming operations: Analytical chemistry, *in vitro* bioassays, and *in vivo* fish exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(8), pp. 1849–1857.
- Chou, P.-H., Matsui, S. & Matsuda, T., 2006. Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents. *Water Science & Technology*, 53(11), p.35.
- Chu, W.-L. et al., 2009. Validation of a new yeast-based reporter assay consisting of human estrogen receptors α/β and coactivator SRC-1: Application for detection of estrogenic activity in environmental samples. *Environmental Toxicology*, 24(5), pp. 513–521.
- Daniel, M. et al., 2004. Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 6(11), pp. 855–65.

- DeFu, H. et al., 2015. Toxicity bioassays for water from black-odor rivers in Wenzhou, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), pp. 1731–1741.
- Dewhurst, R.E. et al., 2002. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban groundwater quality. *Chemosphere*, 47(5), pp. 547–54.
- Dewhurst, R.E. et al., 2005. Toxicity testing of groundwater quality. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 19(1), pp. 17–24.
- Dong, Y. & Zhang, J., 2010. Testing the genotoxicity of coking wastewater using *Vicia faba* and *Hordeum vulgare* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), pp. 944–8.
- Dries, J. et al., 2014. Evaluation of acute ecotoxicity removal from industrial wastewater using a battery of rapid bioassays. *Water Science & Technology*, 70(12), p.2056.
- Elad, T. et al., 2011. Online monitoring of water toxicity by use of bioluminescent reporter bacterial biochips. *Environmental Science and Technology*, 45(19), pp. 8536–8542.
- Elad, T. & Belkin, S., 2013. Broad spectrum detection and “barcoding” of water pollutants by a genome-wide bacterial sensor array. *Water research*, 47(11), pp. 3782–90.
- Escher, B.I. et al., 2012. Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 14(11), pp. 2877–85.
- Fang, Y.-X. et al., 2012. Use of TIE techniques to characterize industrial effluents in the Pearl River Delta region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76(2), pp. 143–52.
- Fatima, R.A. & Ahmad, M., 2006. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. *Chemosphere*, 62(4), pp. 527–37.
- Froment, J., Thomas, K. V & Tollefsen, K.E., 2016. Automated high-throughput *in vitro* screening of the acetylcholine esterase inhibiting potential of environmental samples, mixtures and single compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, pp. 74–80.
- Gu, M.B. & Choi, S.H., 2001. Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43(2), pp. 147–54.
- Gupta, K., Gaumat, S. & Mishra, K., 2012. Studies on phyto-genotoxic assessment of tannery effluent and chromium on *Allium cepa*. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, 33(3), pp. 557–63.

- Hallare, A. V. et al., 2005. Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: developmental toxicity and stress protein responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 104(1-3), pp. 171–87.
- Hu, X. et al., 2013. Occurrence and potential causes of androgenic activities in source and drinking water in China. *Environmental Science and Technology*, 47(18), pp. 10591–600.
- Iqbal, M., 2016. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere*, 144, pp. 785–802.
- Jarošová, B. et al., 2014. Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(18), pp. 10970–82.
- Jia, A. et al., 2015. *In vitro* bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Research*, 80, pp. 1–11.
- Karadima, C. & Iliopoulou-Georgudaki, J., 2006. Application of three bioassays for acute toxicity evaluation of raw dairy effluents. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15(6), pp. 497–502.
- Karadima, C., Theodoropoulos, C. & Iliopoulou-Georgudaki, J., 2009. Environmental hazard assessment of cheese manufacturing effluent treated for hydrogen production. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(3), pp. 428–34.
- Keenan, P.O. et al., 2007. Clear and present danger? The use of a yeast biosensor to monitor changes in the toxicity of industrial effluents subjected to oxidative colour removal treatments. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 9(12), pp. 1394–401.
- Kim, B.C. & Gu, M.B., 2005. A Multi-Channel Continuous Water Toxicity Monitoring System: Its Evaluation and Application to Water Discharged from a Power Plant. *Environmental Monitoring and Assessment*, 109(1-3), pp. 123–133.
- Kovalchuk, O. et al., 2003. Novel plant bioassays for monitoring the genotoxicity of drinking water from the inhabited areas of the Ukraine affected by the Chernobyl accident. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(5), pp. 847–53.
- Kurauchi, K. et al., 2005. *In vivo* visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environmental Science and Technology*, 39(8), pp. 2762–8.

- Kusk, K.O. et al., 2011. Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by *in vivo* and *in vitro* assays. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 30(2), pp. 413–26.
- Leusch, F.D.L. et al., 2014. Assessment of wastewater and recycled water quality: a comparison of lines of evidence from *in vitro*, *in vivo* and chemical analyses. *Water Research*, 50, pp. 420–31.
- Li, J. et al., 2014. A yeast bioassay for direct measurement of thyroid hormone disrupting effects in water without sample extraction, concentration, or sterilization. *Chemosphere*, 100, pp. 139–145.
- Li, M.-H., 2016. Development of *in vivo* biotransformation enzyme assays for ecotoxicity screening: *In vivo* measurement of phases I and II enzyme activities in freshwater planarians. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, pp. 19–28.
- De Liguoro, M. et al., 2014. A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(5), pp. 3546–3557.
- Llorente, M.T. et al., 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of sewage treatment plant effluents in rainbow trout cells (RTG-2). *Water Research*, 46(19), pp. 6351-8.
- Ma, X.Y. et al., 2014. Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*, 468-469, pp. 1–11.
- Makene, V.W. & Pool, E.J., 2015. The assessment of inflammatory activity and toxicity of treated sewage using RAW264.7 cells. *Water and Environment Journal: the Journal / the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 29(3), pp. 353–359.
- Maradona, A. et al., 2012. Utilization of multiple organisms in a proposed early-warning biomonitoring system for real-time detection of contaminants: preliminary results and modeling. *Journal of Hazardous Materials*, 219-220, pp. 95–102.
- Margot, J. et al., 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Science of the Total Environment*, 461-462, pp. 480–98.
- van de Merwe, J.P. & Leusch, F.D.L., 2015. A sensitive and high throughput bacterial luminescence assay for assessing aquatic toxicity – the BLT-Screen. *Environmental Science: Processes Impacts*, 17(5), pp. 947–955.

- Neale, P.A. et al., 2012. Bioanalytical assessment of the formation of disinfection byproducts in a drinking water treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 46(18), pp. 10317–25.
- Nehls, S. & Segner, H., 2005. Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(8), pp. 2078–2087.
- Novak, L.J. et al., 2000. Acute toxicity of storm water associated with de-icing/anti-icing activities at Canadian airports. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), pp. 1846–1855.
- Ossana, N.A., Castañé, P.M. & Salibián, A., 2013. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(3), pp. 486–97.
- Pablos, M.V. et al., 2009. Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), pp. 1594–600.
- Park, J. et al., 2016. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, pp. 147–53.
- Pathiratne, A., Hemachandra, C.K. & De Silva, N., 2015. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(12), p.730.
- Petala, M. et al., 2009. Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. *Water Research*, 43(20), pp. 5063–5074.
- Planelló, R. et al., 2015. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environmental Toxicology*, 30(4), pp. 383–395.
- Ren, S. & Frymier, P.D., 2003. Comparative Study of Two Bioassays for Applications in Influent Wastewater Toxicity Monitoring. *Journal of Environmental Engineering*, 129(3), pp. 216–221.
- Richards, S.M., Kelly, S.E. & Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), pp. 637–44.

- Rouvalis, A. & Iliopoulou-Georgudaki, J., 2010. Comparative assessment of olive oil mill effluents from three-phase and two-phase systems, treated for hydrogen production. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(4), pp. 432–6.
- Sazykin, I.S. et al., 2016. Biosensor-based comparison of the ecotoxicological contamination of the wastewaters of Southern Russia and Southern Germany. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(3), pp. 945–954.
- Schindler Wildhaber, Y. et al., 2015. Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone. *Water Research*, 75, pp. 324–35.
- Schmitt, M., Gellert, G. & Lichtenberg-Fraté, H., 2005. The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Research*, 39(14), pp. 3211–8.
- Schneider, I., Oehlmann, J. & Oetken, M., 2015. Impact of an estrogenic sewage treatment plant effluent on life-history traits of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(3), pp. 272–281.
- Schrank, S.G. et al., 2009. Generation of endocrine disruptor compounds during ozone treatment of tannery wastewater confirmed by biological effect analysis and substance specific analysis. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 59(1), pp. 31–8.
- Shen, Y.J. et al., 2012. Microbial fuel-cell-based toxicity sensor for fast monitoring of acidic toxicity. *Water Science and Technology*, 65(7), pp. 1223–1228.
- Shoji, R. et al., 2000. Formulating bioassay data of chemicals and environmental water. *Water Science and Technology*, 42(3-4), pp. 115–124.
- Shoji, R. et al., 2002. Preservation of human cell bioassay device for the on-site evaluation of environmental waters. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 46(11-12), pp. 355–62.
- Siddiqui, A.H., Tabrez, S. & Ahmad, M., 2011. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 179(1-4), pp. 241–253.
- Stalter, D. et al., 2016. Fingerprinting the reactive toxicity pathways of 50 drinking water disinfection by-products. *Water Research*, 91, pp. 19–30.

-
- Surujlal-Naicker, S., Gupta, S.K. & Bux, F., 2015. Evaluating the acute toxicity of estrogen hormones and wastewater effluents using *Vibrio fischeri*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 21(4), pp. 1094–1108.
- Tang, J.Y.M. et al., 2012. *In vitro* bioassay for reactive toxicity towards proteins implemented for water quality monitoring. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 14(3), pp. 1073–81.
- Tang, J.Y.M. et al., 2014. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Research*, 60, pp. 289–99.
- Vujosević, M. et al., 2008. Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using the *Allium* anaphase-telophase test. *Environmental Monitoring and Assessment*, 147(1-3), pp. 75–81.
- Wigh, A. et al., 2016. Proposal to optimize ecotoxicological evaluation of wastewater treated by conventional biological and ozonation processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), pp. 3008–3017.
- Xu, T. et al., 2013. Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. *Ecological Indicators*, 28, pp. 125–141.
- Yi, X. et al., 2009. A toxicity monitoring study on identification and reduction of toxicants from a wastewater treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), pp. 1919–24.

Anhang 3 - Beschreibung des Bioassay-Karteisystems

Für jeden Bioassay wurden im Rahmen des Projektes eine Kartei in Excel mit detaillierten Informationen hinsichtlich der Einordnung des Bioassays in eine Kategorie der Effektdetektion, dem Mess-System selbst, sowie zur Durchführung und Qualitätssicherung angelegt. Zum Füllen der Karteikarten wurden zum einen die recherchierten Literaturstellen und zum anderen die Originalliteratur bzw. wenn vorhanden, die standardisierten Protokolle (z. B. OECD Guideline) genutzt. Für jede Kategorie wurden entsprechend verschiedene Unterkategorien festgelegt, die nötig und sinnvoll erschienen, um einen Assay eindeutig zu charakterisieren. Diese sind im Folgenden erläutert.

Effektdetektion

Für die Sortierung der Bioassays wurden Kategorien der Effektdetektion gebildet, welche eine allgemeine Beschreibung der Effekttypen darstellen, die in der jeweiligen Kategorie mittels Bioassays detektiert werden. Zusätzlich wurde eine Unterkategorie gebildet, in der entweder der zu untersuchende Organismus (für allgemeine Toxizität) oder der spezifizierte Effekt genannt wurde.

Bioassay-Name

Jeder Bioassay sollte eine eindeutige Bezeichnung erhalten.

Bioassay-System

Um welches biologische System es sich bei jedem Assay handelt, beschreibt die Kategorie „System“. Dabei gibt es z. B. organismische Systeme (*in vivo*), gentechnisch veränderte Organismen (*in vivo*, gentechnisch verändert), Zellen (*in vitro*) und gentechnisch veränderten Zellen (*in vitro*, gentechnisch verändert). Außerdem wurde der verwendete Organismus dokumentiert. Handelt es sich beispielsweise um *in vivo* Bioassays, die Effekte auf bestimmte Organe analysieren (z. B. Kiemen, Leber, Niere) so wurde dies ebenfalls dokumentiert, wobei bei Verwendung von Fischembryonen „Embryo“ als Organ deklariert wurde. Handelt es sich hingegen um zell-basierte *in vitro* Bioassays, so wurden zusätzlich zum Organ, der Zelltyp (z. B. Tumorzelle) und die Zelllinie dokumentiert. Falls ein Bioassay beispielsweise die Aktivierung oder Inhibierung einer bestimmten biologischen Zielstruktur (Rezeptor) durch Chemikalien erfasst, so wurde auch dies dokumentiert. Zudem wurde das Reporter-gen notiert, falls es sich um Transaktivierungsassays handelt, bei denen durch die Bindung einer Chemikalie an einen spezifischen Rezeptor die Expression beispielsweise des Luciferase-Gens induziert wird und so schließlich die Analyse der Lumineszenz erfolgt.

Bioassay-Durchführung

In der Kategorie „Bioassay-Durchführung“ wurden technische Details und Informationen zusammengestellt, die für die Durchführung der Tests im Labor relevant sind. Dies beinhaltet zunächst Informationen zu dem verwendeten Medium, sowie das verwendete Format, d. h. wird der Bioassay in Glasgefäßen, Mikrotiterplatten o. ä. durchgeführt. Weiterhin war es das Ziel, Informationen zum Testvolumen zu dokumentieren, wobei dies neben der zu analysierenden Probe (Umweltprobe oder Einzelsubstanz) auch das Medium enthält. Zudem wurde die Expositionszeit erfasst, d. h. über welche Zeitspanne erfolgt die Exposition des Organismus bzw. der Zelle mit der zu untersuchenden Substanz bzw. Probe. Weiterhin wurde dokumentiert, ob eine Referenzsubstanz bzw. Positivkontrolle definiert sind. Dies ist zum einen für die Eichung eines Bioassays in verschiedenen Laboren notwendig und zum anderen erforderlich, um eine entsprechende Potenz einer Umweltprobe zu ermitteln (*bioanalytical equivalent concentrations*- BEQs, siehe Kapitel 5). Zudem wurde dokumentiert, was beobachtet wird, also der ermittelte Effekt (z. B. Wachstum, Rezeptorbindung, etc.) und wie dieser Effekt detektiert wird, also die Methode der Messung der Effekte (z. B. Fluoreszenzmessung, mikroskopische Untersuchung, etc.).

Da in den hier analysierten Studien keine einheitliche Methodenbeschreibung vorhanden war, konnten insgesamt nicht alle Kriterien für alle Bioassays durchgehend erfasst werden. Oft verwiesen die Autoren auf Methodenbeschreibungen in anderen, früheren Studien.

Bioassay-Qualitätssicherung

Um Bioassays im Monitoring und somit in verschiedenen Laboren einsetzen zu können, bedarf es einem Mindestmaß an Qualitätssicherung in Hinblick auf stabile und reproduzierbare Ergebnisse. Deshalb wurde erfasst, ob es sich bei einem Bioassay um ein kommerzielles Testsystem handelt und/oder ob ein normiertes Protokoll für den betrachteten Bioassay vorliegt (z. B. OECD Richtlinie, ISO Norm). Des Weiteren wurde geprüft, inwieweit Validitätskriterien explizit angegeben sind, wie es beispielsweise in OECD Richtlinien der Fall ist (z. B. wie müssen interne Positiv- bzw. Negativkontrollen aussehen, damit der Test als valide gilt). Weiterhin sollte erfasst werden, ob Ringversuche zur Verifizierung des jeweiligen Bioassays durchgeführt wurden. Da dies aus den gefundenen Literaturstellen schwer zu erschließen war, wurde weitere Literatur insbesondere zu Ringversuchen hinzugezogen.

Referenz

Abschließend wurden die Referenz für das jeweilige Biotestverfahren, d. h. die Originalliteratur, die den jeweiligen Bioassay ausführlich beschreibt, sowie die Referenzen zur Anwendung des erfassten Bioassays, d. h. die Studien aus der systematischen Literaturrecherche bzw. die Übersichtsarbeiten, die den jeweiligen Bioassay verwendet haben, erfasst.

Ein Ausschnitt der Bioassay-Kartei ist in Anhang 4 dargestellt.

Anhang 4 – Übersicht der identifizierten Bioassays

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Bioassay-Karteisystem. Dieser beinhaltet die Effektdetektionskategorie, Spezies/ Zelllinie, beobachtbaren Effekt und Referenzen.

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
1	allg. Tox. Organismen	akuter Immobilisierungstest	<i>Daphnia magna/Ceriodaphnia dubia</i>	Sterblichkeit, Immobilisierung	De Liguoro et al. 2014; Yi et al. 2009; Pablos et al. 2009; Schrank et al. 2009; Dewhurst et al. 2005; Dewhurst et al. 2002; Fang et al. 2012; Maradona et al. 2012; Castillo et al. 2000; Beauregard & Ridal 2000; Novak et al. 2000; Kienle 2015; OECD Test guideline 202 (2004); ISO 6341: 1996
2	allg. Tox. Organismen	akuter Immobilisierungstest-Daphtoxkit FTM magna	<i>Daphnia magna</i>	Sterblichkeit, Immobilisierung	Arias-Barreiro et al. 2010; Karadima et al. 2009; Daniel et al. 2004
3	allg. Tox. Organismen	akuter Immobilisierungstest-Daphtoxkit FTM pulex	<i>Daphnia pulex</i>	Sterblichkeit, Immobilisierung	Rouvalis et al. 2010; Karadima et al. 2006
4	allg. Tox. Organismen	akuter Immobilisierungstest-Thamnotoxkit FTM	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Sterblichkeit, Immobilisierung	Rouvalis et al. 2010; Karadima et al. 2009; Karadima et al. 2006; Daniel et al. 2004; Novak et al. 2000; Kienle 2015
5	allg. Tox. Organismen	Daphnia IQ Toxicity Test	<i>Daphnia magna</i>	Inhibierung Galaktose Metabolismus/ Enzymaktivität	Novak et al. 2000
6	allg. Tox. Organismen	ECOTOX system	<i>Euglena gracilis</i>	Bewegung	Ahmed & Häder, 2011
7	allg. Tox. Organismen	Algenwachstumsinhibierungstest	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstumsinhibierung	Escher et al. 2014; Wigh et al. 2016; Jia et al. 2015; De Liguoro et al. 2014; Fang et al. 2012; Kienle 2015; OECD Test Guideline No. 201. (2002); ISO 8692:2004; ISO 8692:2012
8	allg. Tox. Organismen	Algenwachstumsinhibierung-Algaltoxkit	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Wachstumsinhibierung	Daniel et al. 2004
9	allg. Tox. Organismen	Algenwachstumsinhibierung- Algal microplate screen	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Wachstumsinhibierung	Daniel et al. 2004

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
10	allg. Tox. Organismen	Algenwachstumshemmung-kombinierter Algenassay	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstumshemmung	Schindler Wildhaber et al. 2015; Tang et al. 2014; Margot et al. 2013; Maradona et al. 2012; Neale et al. 2012
11	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- root elongation bioassay	<i>Lactuca sativa</i>	Wachstumshemmung	Park et al. 2016; Arias-Barreiro et al. 2010; Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000
12	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- <i>Allium cepa</i> test	<i>Allium cepa</i>	Wachstumshemmung	Pathiratne et al. 2015; Gupta et al. 2012; Barberio et al. 2011; Siddiqui et al. 2011; Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000
13	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- seed germination assay	<i>Brassica spp.</i> , <i>Cucumis spp.</i> , <i>Panicum spp.</i> , <i>Phaseolus spp.</i>	Wachstumshemmung	Siddiqui et al. 2011
14	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- <i>L. minor</i> growth inhibition test	<i>Lemna minor</i>	Wachstumshemmung	Fang et al. 2012; Kienle 2015; OECD Test guideline 221 (2006); ISO 20079:2005
15	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- <i>Hydra attenuata</i> assay	<i>Hydra attenuata</i>	Wachstumshemmung	Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000
16	allg. Tox. Organismen	Wachstumshemmung- ostracode growth inhibition test/ OSTRACODTOXKIT F®	<i>Heterocypris incongruens</i>	Wachstumshemmung	Wigh et al. 2016
17	allg. Tox. Organismen	<i>Vicia faba</i> bioassay	<i>Vicia faba</i>	Zytotoxizität	Iqbal 2016
18	allg. Tox. Organismen	Nematodentest	<i>Panagrellus redivivus</i>	Wachstum, Überleben	Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000
19	allg. Tox. Organismen	Mouthpart Deformities	<i>Chironomus riparius</i>	sublethale Effekte	Planello et al. 2015
20	allg. Tox. Organismen	Froschembryoteratogenitätsassay (FETAX)	<i>Xenopus tropicalis</i> / embryo	Sterblichkeit, teratogene Effekte	De Fu et al. 2015; Pablos et al. 2009; ASTM E1439 - 98

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
21	allg. Tox. Organismen	Fischembryotoxizitätstest (FET)	<i>Danio rerio</i> / embryo	lethale, sublethale Effekte	Escher et al. 2014; Wigh et al. 2016; Schindler Wildhaber et al. 2015; De Fu et al. 2015; Fang et al. 2012; Rouvalis et al. 2010; Karadima et al. 2009; Hallare et al. 2005; Tribskorn et al. 2015; Kienle 2015; OECD Test guideline 236: 2013; ISO 15088:2008
22	allg. Tox. Organismen	Fischembryotoxizitätstest (FET) 120h	<i>Danio rerio</i> / larvae	sublethale Effekte	Escher et al. 2014
23	allg. Tox. Organismen	Fischlarventoxizitätstest (FELST)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> / larvae	Sterblichkeit, sublethale Effekte	Margot et al. 2014; Kienle 2015; OECD Test guideline 210: 2013
24	allg. Tox. Organismen	Reproduktion- rotifer reproduction inhibition test/ ROTOXKIT	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Reproduktion	Wigh et al. 2016, Novak et al. 2000; ISO 20666:2008
25	allg. Tox. Organismen	Reproduktion- Daphnia reproduction test	<i>Ceriodaphnia dubia</i> ; <i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	Schindler Wildhaber et al. 2015; Petala et al. 2009; Kienle 2015 ; OECD Test Guideline 211 (2012); ISO 20665:2008
26	allg. Tox. Organismen	Reproduktion- <i>Gammarus pulex</i> test	<i>Gammarus pulex</i>	Reproduktion	Schneider et al. 2015
27	allg. Tox. Organismen	Entwicklung- <i>Acartia tonsa</i> early life stages test	<i>Acartia tonsa</i>	Entwicklung Larve zu Jungtier	Kusk et al. 2011
28	allg. Tox. Organismen	Reproduktion- Chronischer Schneckenreproduktionstest	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Mortalität, Reproduktion	Tribskorn et al. 2015; Kienle 2015; OECD Test Guideline 242 (2016)
29	allg. Tox. Organismen	Verhalten- <i>H. azteca</i> bioassay	<i>Hyalella azteca</i>	Verhaltensänderung	Maradona et al. 2012
30	allg. Tox. Organismen	Verhalten- <i>L. variegatus</i> bioassay	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Verhaltensänderung	Maradona et al. 2012
31	allg. Tox. Organismen	Frassaktivitätstest	<i>Gammarus pulex</i>	Frassaktivität, Sterblichkeit	Kienle 2015
32	allg. Tox. Organismen	Rapidtoxkit	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Inhibierung Partikelaufnahme	Dries et al. 2014

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
33	allg. Tox. Organismen	Verhalten- Zebrafärblingsembryonen und -larven / LMR	<i>Danio rerio</i> / embryo	Messung lokomotor Aktivität	Kienle 2015
34	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- Microtox™	<i>Vibrio fischeri</i>	bakterielle Zytotoxizität	Stalter et al. 2016; Jia et al. 2015; Surujjal-Naicker et al. 2015; Tang et al. 2014; Leusch et al. 2014; Escher et al. 2014; Vazquez et al. 2013; Neale et al. 2012; Arias-Barreiro et al. 2010; Schrank et al. 2009; Bicchi et al. 2009; Dewhurst et al. 2005; Dewhurst et al. 2002; Novak et al. 2000 ; ISO 11348-3:2007; DIN 38412 L34/341
35	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- ToxAlert™	<i>Vibrio fischeri</i>	bakterielle Zytotoxizität	Dewhurst et al. 2002
36	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- BioTox	<i>Vibrio fischeri</i>	bakterielle Zytotoxizität	Dries et al. 2014
37	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität-Luminescent bacteria bioassay	<i>Qinghaiensis vibrio</i>	bakterielle Zytotoxizität	DeFu et al. 2015
38	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- Bacterial Luminescence Toxicity Screen	<i>Photobacterium leiognathi</i>	bakterielle Zytotoxizität	van de Merwe et al. 2015
39	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- ToxScreen test	<i>Photobacterium leiognathi</i>	bakterielle Zytotoxizität	Dries et al. 2014
40	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- Lux bacteria toxicity test	<i>E. coli</i> HB101 pUCD607	bakterielle Zytotoxizität	Fang et al. 2012
41	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- photobacterium test	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	bakterielle Zytotoxizität	Escher et al. 2014; Allinson et al. 2010
42	allg. Tox. Organismen	Hefe Zellproliferationsassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zellproliferation	Schmitt et al. 2005;
43	allg. Tox. Organismen	Hefe Zellproliferationsassay (GreenScreen)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zellproliferation	Keenan et al. 2007; Daniel et al. 2004
44	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- Bioluminescent Reporter Bacterial Biochips	<i>E. coli</i> / RFM443; GC2	bakterielle Zytotoxizität	Elad et al. 2011

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
45	allg. Tox. Organismen	bakterielle Zytotoxizität- Multi-Channel Continuous Toxicity Monitoring System	Bacteria/ GC2	bakterielle Zytotoxizität	Kim et al. 2005
46	allg. Tox. Organismen	<i>E.coli</i> - CellSense assay	<i>E.coli</i>	Elektronentransportkette	Daniel et al. 2004
47	allg. Tox. Organismen	<i>E.coli</i> -genome-wide reporter bacterial live cell array	<i>E.coli</i>	Genexpressionsanalyse	Elad & belkin 2013
48	allg. Tox. Organismen	Microbial Fuel Cell (MFC)	Bacteria	Elektronentransportkette	Shen et al. 2012
49	allg. Tox. Zellen	Shk1 Assay	<i>Pseudomonad/</i> Shk1	Zytotoxizität	Ren and Frymier 2003
50	allg. Tox. Zellen	WST-1- Assay	<i>Mus/</i> RAW264.7	Zytotoxizität	Makene et al. 2015
51	allg. Tox. Zellen	XTT- Assay	<i>Mus/</i> RAW264.7	Zytotoxizität	Makene et al. 2015
52	allg. Tox. Zellen	Caco 2- Assay	<i>Homo sapien/</i> Caco 2	Zytotoxizität	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Neale et al. 2012; Kienle 2015
53	allg. Tox. Zellen	NRU- Assay	<i>Oncorhynchus mykiss/</i> RTG-2	Zytotoxizität	Llorente et al. 2012; Pablos et al. 2009; Kienle 2015
54	allg. Tox. Zellen	MTT-Assay	<i>Oncorhynchus mykiss/</i> RTG-2; <i>Homo sapiens/</i> MCF-7; MDA-kb2; MVLN	Zytotoxizität	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Neale et al. 2012; Hu et al. 2013; Kusk et al. 2011; Kienle 2015
55	allg. Tox. Zellen	ATP Gehaltsassay	<i>Oncorhynchus mykiss/</i> RTG-2	Zytotoxizität	Llorente et al. 2012
56	allg. Tox. Zellen	Kenacid Blue Protein-Assay	<i>Oncorhynchus mykiss/</i> RTG-2	Zytotoxizität	Llorente et al. 2012
57	allg. Tox. Zellen	Alamar Blue- Assay	<i>Cricetina/</i> CHO	Zytotoxizität	Kusk et al. 2011
58	allg. Tox. Zellen	SK-N-SH- Assay	<i>Homo sapiens/</i> SK-N-SH	Zytotoxizität in Neuroblastomzellen	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
59	allg. Tox. Zellen	Acid Phosphatase Assay	<i>Homo sapiens/</i> HepG2	Zytotoxizität	Shoji et al. 2000

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
60	allg. Tox. Zellen	LDL Aufnahmeassay	<i>Homo sapiens</i> / HepG2	Zytotoxizität	Shoji et al. 2002; Shoji et al. 2000
61	phytotoxische Effekte	Photosynthese-Imaging-PAM Assay	<i>Chlorella vulgaris</i>	Photosyntheserate	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Leusch et al. 2014; Kienle 2015
62	phytotoxische Effekte	Photosynthese-LuminoTox SAPS	<i>Chlorella vulgaris</i>	Photosyntheserate	Dries et al. 2014
63	phytotoxische Effekte	Photosynthese- kombinierter Algentest	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Photosyntheserate	Schindler Wildhaber et al. 2015; Tang et al. 2014; Margot et al. 2013; Maradona et al. 2012; Neale et al. 2012; Kienle 2015
64	hormonartige Effekte	ChgH -GFP Medaka	<i>Oryzias latipes</i> / larvae	östrogene Aktivität	Kurauchi et al. 2005
65	hormonartige Effekte	cyp19a1b- GFP Zebrafisch	<i>Danio rerio</i> / embryo	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
66	hormonartige Effekte	YES- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Jia et al. 2015; Schindler Wildhaber et al. 2015; Schneider et al. 2015; Escher et al. 2014; Margot et al. 2013; Kusk et al. 2011; Chu et al. 2009; Kurauchi et al. 2005; Burnison et al. 2003; Kienle 2015; ISO/CD 19040-1
67	hormonartige Effekte	Plasma Vitellogenin Konzentration	<i>Oncorhynchus mykiss</i> ; <i>Pimephales promelas</i>	östrogene Aktivität (Vtg-Produktion)	Margot et al. 2013; Cavallin et al. 2014; Kienle 2015; ISO 23893-3:2013
68	hormonartige Effekte	Genexpression ER	<i>Pimephales promelas</i>	östrogene Effekte (relative Menge ER mRNA)	Cavallin et al. 2014; Triebkorn et al. 2015
69	hormonartige Effekte	Genexpression VTG	<i>Pimephales promelas</i>	östrogene Effekte (relative Menge Vtg mRNA)	Cavallin et al. 2014
70	hormonartige Effekte	Genexpression EcR	<i>Chironomus riparius</i>	östrogene Effekte (relative Menge EcR mRNA)	Planello et al. 2015
71	hormonartige Effekte	ex vivo Steroidgenese-Assay	<i>Pimephales promelas</i>	Testosteron-produktion	Cavallin et al. 2014
72	hormonartige Effekte	ex vivo Steroidgenese-Assay	<i>Pimephales promelas</i>	Testosteron-, Estradiol-Produktion	Cavallin et al. 2014

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
73	hormonartige Effekte	(hER, medER)-yeast- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014; Allinson et al. 2010
74	hormonartige Effekte	E-Screen- Assay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7	Zellproliferation	Escher et al. 2014; Leusch et al. 2014; Bicchi et al. 2009; Tribskorn et al. 2015; Kienle 2015
75	hormonartige Effekte	Steroidsyntheseassay	<i>Homo sapiens/</i> H295R	Estradiol-Produktion	Escher et al. 2014; Kusk et al. 2011; Kienle 2015; OECD Test guideline 456 (2011)
76	hormonartige Effekte	ER-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens/</i> U2-OS	Induktion ER	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Kienle 2015
77	hormonartige Effekte	Anti ER-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens/</i> U2-OS	Hemmung ER	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Kienle 2015
78	hormonartige Effekte	MELN- Assay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Wigh et al. 2016; Kienle 2015
79	hormonartige Effekte	HELN-ER α - Assay	<i>Homo sapiens/</i> HeLa	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
80	hormonartige Effekte	hER α -HeLa-9903- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HeLa	(anti-)östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014; Tribskorn et al. 2015; OECD Test guideline 455 (2015)
81	hormonartige Effekte	ER α -transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HepG2	Induktion ER	Escher et al. 2014
82	hormonartige Effekte	ER α -GeneBLAzer- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HEK 293T	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
83	hormonartige Effekte	HELN-ER β - Assay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7; HeLa	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
84	hormonartige Effekte	ERE-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HepG2	Induktion ERE	Escher et al. 2014
85	hormonartige Effekte	MCF7-ERE- Assay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
86	hormonartige Effekte	MCF-7 Zellproliferationsassay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Kusk et al. 2011

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
87	hormonartige Effekte	ER Transaktivierungsassay	<i>Homo sapiens</i> / MVLN	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Kusk et al. 2011
88	hormonartige Effekte	MVLN Zellassay	<i>Homo sapiens</i> / MVLN	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Jarosova et al. 2014; Triebskorn et al. 2015
89	hormonartige Effekte	T47D-KBluc Zellassay	<i>Homo sapiens</i> / T47D-Kbluc	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Cavallin et al. 2014
90	hormonartige Effekte	YAS- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	Jia et al. 2015; Schindler Wildhaber et al. 2015; Escher et al. 2014;
91	hormonartige Effekte	AR Transaktivierungsassay	<i>Cricetinae</i> / CHO	androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Kusk et al. 2011
92	hormonartige Effekte	AR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion AR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Leusch et al. 2014
93	hormonartige Effekte	Anti AR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Hemmung AR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
94	hormonartige Effekte	MDA-kb2 - Assay	<i>Homo sapiens</i> / MDA-kb2	androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Wigh et al. 2016; Escher et al. 2014; Cavallin et al. 2014; Hu et al. 2013
95	hormonartige Effekte	Anti-MDA-kb2 - Assay	<i>Homo sapiens</i> / MDA-kb2	anti-androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014; Hu et al. 2013; Triebskorn et al. 2015
96	hormonartige Effekte	MCF7-ARE- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MCF-7	androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
97	hormonartige Effekte	AR-transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion AR	Escher et al. 2014
98	hormonartige Effekte	AR-GeneBLazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HEK 293T	androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
99	hormonartige Effekte	HELN-AR (PALM)- Assay	<i>Homo sapiens</i> / PC3	androgene Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
100	hormonartige Effekte	GR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion GR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
101	hormonartige Effekte	Anti GR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Hemmung GR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
102	hormonartige Effekte	GR-GeneBLazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HEK 293T	Induktion GR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
103	hormonartige Effekte	Anti GR-GeneBLazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HEK 293T	Hemmung GR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
104	hormonartige Effekte	GR-Switchgear- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HT1080	GR Signalweg Aktivierung	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
105	hormonartige Effekte	GR-MDA-kb2- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MDA-kb2	glucocorticoide Effekte (Rezeptorbindung)	Wigh et al. 2016; Escher et al. 2014
106	hormonartige Effekte	GR-transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion GR	Escher et al. 2014
107	hormonartige Effekte	PR Proteinexpression	<i>Homo sapiens</i> / MCF-7	Proteinexpression	Kusk et al. 2011
108	hormonartige Effekte	PR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion PR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
109	hormonartige Effekte	Anti PR-CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Hemmung PR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
110	hormonartige Effekte	PR-GeneBLazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HEK 293T	Rezeptorbindung	Escher et al. 2014
111	hormonartige Effekte	Steroidsyntheseassay	<i>Homo sapiens</i> / H295R	Progesteronsynthese	Escher et al. 2014
112	hormonartige Effekte	Steroidsyntheseassay	<i>Homo sapiens</i> / H295R	17 α OH-Progesteronsynthese	Escher et al. 2014
113	hormonartige Effekte	TR- CALUX [®] - Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion TR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
114	hormonartige Effekte	T-SCREEN- Assay	<i>Rattus</i> / GH3	Zellwachstum	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Kusk et al. 2011
115	hormonartige Effekte	THR α 1-transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion THR α 1	Escher et al. 2014

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
116	hormonartige Effekte	HELN-TR- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HeLa	thyroide Effekte (Rezeptorbindung)	Escher et al. 2014
117	hormonartige Effekte	kolorimetrischer Bioassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	thyroide Effekte (Rezeptorbindung)	Li et al. 2014
118	hormonartige Effekte	Chemilumineszenz Bioassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	thyroide Effekte (Rezeptorbindung)	Li et al. 2014
119	mutagene/ gentoxische Effekte	Reverse mutation test	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E.coli</i>	Punktmutation	Stalter et al. 2016; Jia et al. 2015; Schindler Wildhaber et al. 2015; Escher et al. 2014; Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000; Kienle 2015; OECD test guideline 471 (1997); ISO 11350:2012
120	mutagene/ gentoxische Effekte	Ames-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E.coli</i>	Punktmutation	Stalter et al. 2016; Schindler Wildhaber et al. 2015; Kienle 2015; ISO 11350:2012
121	mutagene/ gentoxische Effekte	Fluctuation Ames- Test	<i>Salmonella typhimurium</i>	Punktmutation	Beaugard & Ridal 2000; Castillo et al. 2000; Kienle 2015
122	mutagene/ gentoxische Effekte	Mikrokern-Test	<i>Allium cepa</i> ; <i>Vicia faba</i> ; <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Cricetinae</i> / CHO; <i>Oncorhynchus mykiss</i> /RTG-2; <i>homo sapiens</i>	Bildung von Mikrokernen	Pathiratne et al. 2015; Gupta et al. 2012; Barberio et al. 2011; Iqbal 2016; Dong & Zhang 2010; Ossana et al. 2013; Llorente et al. 2012 ; Escher et al. 2014; Tribskorn et al. 2015; Kienle 2015; OECD test guideline 487 (2014); ISO 29200:2013; ISO 21427-1. 2006; ISO 21427-2:2006;
123	mutagene/ gentoxische Effekte	UmuC-Test	<i>Salmonella typhimurium</i>	Induktion der SOS-Antwort der Zelle	Stalter et al. 2016; Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Tang et al. 2014; Leusch et al. 2014; Neale et al. 2012; Kienle 2015; ISO 13829 (2000)
124	mutagene/ gentoxische Effekte	Fpg-modifizierter Comet Assay	<i>Danio rerio</i>	DNA-Schäden	Wigh et al. 2016
125	mutagene/ gentoxische Effekte	Comet Assay	<i>Oncorhynchus mykiss</i> / RTG-2	DNA-Schäden	Nehls & Segner 2005; Kienle 2015

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
126	mutagene/ gentoxische Effekte	SOS-Chromotest	<i>E.coli/</i> PQ37	Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen	Escher et al. 2014; Triebkorn et al. 2015
127	mutagene/ gentoxische Effekte	Mitotischer Index	<i>Allium cepa</i> ; <i>Vicia faba</i> ; <i>Hordeum vulgare</i>	Chromosomale Schäden	Pathiratne et al. 2015; Gupta et al. 2012; Siddiqui et al. 2011; Vujosevic et al. 2008; Kovalchuk et al. 2003; Dong & Zhang 2010
128	mutagene/ gentoxische Effekte	Schwesterchromatidaustausch- Assay	<i>Vicia faba</i> ; <i>Hordeum vulgare</i>	Rekombination (DNA)	Dong & Zhang 2010
129	mutagene/ gentoxische Effekte	homologe Rekombination- Assay	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rekombination (DNA)	Kovalchuk et al. 2003
130	mutagene/ gentoxische Effekte	Hefe Gentoxizitätsassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DNA-Schäden	Keenan et a. 2007; Schmitt et al. 2005; Daniel et al. 2004
131	mutagene/ gentoxische Effekte	<i>E. coli</i> - Assay (pRecA-lux)	<i>E. coli/</i> MG1655; RFM443; DPD2794	DNA-Schäden	Sazykin et al. 2016; Elad et al. 2011; Kim et al. 2005; Gu & Choi 2001
132	mutagene/ gentoxische Effekte	DNA Schädigung <i>E.coli</i>	<i>E. coli/</i> MV4108; MV1161	Interaktion mit DNA	Stalter et al. 2016
133	neurotoxische Effekte	AChE-Inhibierungsassay	<i>Electrophorus electricus</i> (Enzym)	AChE-Hemmung	Froment et al. 2016; Escher et al. 2014; Kienle 2015; DIN 38415-1:1995-02
134	neurotoxische Effekte	AChE-Inhibierungsassay	<i>Lithobates catesbeianus</i>	AChE-Hemmung	Ossana et al. 2013
135	neurotoxische Effekte	Daphnia magna chitobiase Aktivitätsassay	<i>Daphnia magna</i>	Chitobiase Aktivität	Richards et al. 2008
136	Immuntoxizität & oxidativer Stress	THP1 Zytokinproduktionsassay	<i>Homo sapiens/</i> THP1	IL1beta-Produktion	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014; Kienle 2015
137	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Interleukin 6-produktionsassay	Mus/RAW264.7	IL6-Produktion	Makene et al. 2015; Kienle et al. 2015
138	Immuntoxizität & oxidativer Stress	NO Ausschüttungsassay	Mus/RAW264.7	NO Ausschüttung	Makene et al. 2015
139	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Phagozytose-Aktivitätsassay	<i>Elliptio complanata</i>	Phagozytose-Aktivität	Kienle 2015

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
140	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Jurkat E6.1 IκB- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Jurkat E6.1	Entzündungsreaktion	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
141	Immuntoxizität & oxidativer Stress	NF-κB- Geneblazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / THP1	Entzündungsreaktion	Stalter et al. 2016; Escher et al. 2014
142	Immuntoxizität & oxidativer Stress	NF-κB-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion NF-κB	Escher et al. 2014
143	Immuntoxizität & oxidativer Stress	NF-κB-CALUX- Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2- OS	Induktion NF-κB	Escher et al. 2014
144	Immuntoxizität & oxidativer Stress	AREc32- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MCF-7	Induktion Nrf2	Stalter et al. 2016; Jia et al. 2015; Tang et al. 2014; Escher et al. 2014; Escher et al. 2012; Neale et al. 2012
145	Immuntoxizität & oxidativer Stress	ARE GeneBLAZer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion Nrf2	Stalter et al. 2016
146	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Nrf2-MDA-MB- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MDA-MB	Induktion Nrf2	Jia et al. 2015
147	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion Nrf2	Escher et al. 2014
148	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Nrf2-CALUX- Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2- OS	Induktion Nrf2	Escher et al. 2014; Kienle 2015
149	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Nrf2-keap- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MDA-MB-231-745	Induktion ARE	Escher et al. 2014
150	Immuntoxizität & oxidativer Stress	Lipidperoxidationsassay	<i>L. catesbeianus</i> / larvae	Lipidperoxidation	Ossana et al. 2013; Petala et al. 2009; Kienle 2015
151	Immuntoxizität & oxidativer Stress	ROS Bildungsassay	<i>Oncorhynchus mykiss</i> / RTG-2	oxidativer Stress	Escher et al. 2014
152	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (Proteinschädigung)	<i>E. coli</i> / MG1655; TV1061	Proteinschädigung	Stalter et al. 2016; Escher et al. 2014; Tang et al. 2012; Neale et al. 2014
153	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (plpA-lux; grpE::luxCDABE)	<i>E. coli</i> / MG1655; TV1061	Proteinschädigung	Sazykin et al. 2016; Kim et al. 2005

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
154	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (pFabA-lux)	<i>E. coli</i> / MG1655; DPD2540	Membranschädigung	Sazykin et al. 2016; Kim et al. 2005; Gu&Choi 2001
155	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (pKatG- lux)	<i>E. coli</i> / MG1655	Detektion Hydroperoxide	Sazykin et al. 2016; Gu & Choi 2001
156	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (pSoxS-lux)	<i>E. coli</i> / MG1655	Detektion Superoxid-anionen und NO	Sazykin et al. 2016
157	Immuntoxizität & oxidativer Stress	<i>E.coli</i> -Assay (pmicF-lux)	<i>E. coli</i> / DH5 α	oxidativer Stress	Elad et al. 2011
158	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Genexpression cyp1a	<i>Danio rerio</i> / embryo	Cytochrom P450 1A1 Induktion	Escher et al. 2014
159	metabolische Enzyme & Rezeptoren	PXR-cis/transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion PXR	Escher et al. 2014
160	metabolische Enzyme & Rezeptoren	HG5LN PXR- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HeLa	Induktion PXR	Escher et al. 2014
161	metabolische Enzyme & Rezeptoren	CAR-transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion CAR	Escher et al. 2014
162	metabolische Enzyme & Rezeptoren	CAR-yeast- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion CAR	Escher et al. 2014
163	metabolische Enzyme & Rezeptoren	EROD Aktivitätsmessung	<i>Oncorhynchus mykiss</i> / RTG-2	Cytochrom P450 1A1 Induktion	Fatima & Ahmad 2006; Pablos et al. 2009, Li 2016, Kienle 2015
164	metabolische Enzyme & Rezeptoren	P450 Enzymassay (ECOD)	<i>Dugesia japonica</i>	7-EC O-deethylase (ECOD) Aktivität	Li 2016
165	metabolische Enzyme & Rezeptoren	P450 Enzymassay (MCOD)	<i>Dugesia japonica</i>	7-MC O-deethylase (MCOD) Aktivität	Li 2016
166	metabolische Enzyme & Rezeptoren	P450 Enzymassay (PROD)	<i>Dugesia japonica</i>	7-PR O-dealkylase (PROD) Aktivität	Li 2016
167	metabolische Enzyme & Rezeptoren	P450 Enzymassay (BROD)	<i>Dugesia japonica</i>	7-BR O-dealkylase (BROD) Aktivität	Li 2016
168	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Phase II Enzymassay (DTD)	<i>Dugesia japonica</i>	DT-diaphorase (DTD) Aktivität	Li 2016

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
169	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Phase II Enzymassay (COMT)	<i>Dugesia japonica</i>	catechol-O-methyltransferase (COMT) Aktivität	Li 2016
170	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Phase II Enzymassay (UDPGT)	<i>Dugesia japonica</i>	uridine 5'-di-phospho-glucuronosyltransferase (UDPGT) Aktivität	Li 2016
171	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Phase II Enzymassay (ARS)	<i>Dugesia japonica</i>	arylsulfatase (ARS) Aktivität	Li 2016
172	metabolische Enzyme & Rezeptoren	PPAR α -transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens/</i> Hep-G2	Induktion PPAR α	Escher et al. 2014
173	metabolische Enzyme & Rezeptoren	CALUX-PPAR α - Assay	<i>Homo sapiens/</i> U2-OS	Induktion PPAR α	Escher et al. 2015
174	metabolische Enzyme & Rezeptoren	PPAR γ -transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens/</i> Hep-G2	Induktion PPAR γ	Escher et al. 2014
175	metabolische Enzyme & Rezeptoren	PPAR γ -GeneBLAzer- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HEK 293H	Induktion PPAR γ	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
176	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Anti PPAR γ -GeneBLAzer- Assay	<i>Homo sapiens/</i> HEK 293H	Hemmung PPAR γ	Jia et al. 2015; Escher et al. 2015
177	metabolische Enzyme & Rezeptoren	HELN-PPAR γ - Assay	<i>Homo sapiens/</i> HeLa	Induktion PPAR γ	Escher et al. 2015
178	metabolische Enzyme & Rezeptoren	CALUX-PPAR γ 2- Assay	<i>Homo sapiens/</i> U2-OS	Induktion PPAR γ	Escher et al. 2016
179	metabolische Enzyme & Rezeptoren	MCF7-PPAR- Assay	<i>Homo sapiens/</i> MCF-7	Induktion PPAR γ	Escher et al. 2014
180	metabolische Enzyme & Rezeptoren	AhR assay- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae/</i> YCM3	Induktion AhR-Genexpression	Chou et al. 2006; Escher et al. 2014
181	metabolische Enzyme & Rezeptoren	AhR Transaktivierungsassay	<i>Mus/</i> Hepa1.12cR	Transaktivierung	Kusk et al. 2011
182	metabolische Enzyme & Rezeptoren	AhR CAFLUX- Assay	<i>Rattus/</i> H4IIE	Induktion AhR	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
183	metabolische Enzyme & Rezeptoren	DR-CALUX [®] - Assay	<i>Rattus/</i> H4IIE	Induktion AhR	Pablos et al. 2009; Kienle 2015

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
184	metabolische Enzyme & Rezeptoren	AhR-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion AhR	Escher et al. 2014
185	metabolische Enzyme & Rezeptoren	MCF7DRE- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MCF-7	Bindung AhR	Escher et al. 2014
186	metabolische Enzyme & Rezeptoren	H4IIEluc- Assay	<i>Rattus</i> / H4IIE	Bindung AhR	Escher et al. 2014; Tribskorn et al. 2015
187	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Genexpression hspb11	<i>Danio rerio</i> / embryo	Induktion hspb11- Genexpression	Escher et al. 2014
188	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Proteinexpression HSP 70	<i>Danio rerio</i> / embryo	Stressproteinlevel	Hallare et al. 2005; Tribskorn et al. 2015
189	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Genexpression hsc 70	<i>Chironomus</i> <i>riparius</i>	relative Menge hsp70, hsc70 mRNA	Planello et al. 2015
190	metabolische Enzyme & Rezeptoren	HSE-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion HSE	Escher et al. 2014
191	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Katalaseaktivität	<i>L. catesbeianus</i> / larvae	Enzymaktivität	Ossana et al. 2013; Kienle 2015 ([131-133] aus Kienle)
192	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Glutathion-S-transferase- Aktivität	<i>L. catesbeianus</i> / larvae; <i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i> ; <i>Chironomus</i>	Enzymaktivität	Planello et al. 2015, Ossana et al. 2013; Petala et al. 2009
193	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Glutathionperoxidase-Aktivität	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	Enzymaktivität	Petala et al. 2009
194	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Superoxiddismutas-Aktivität	<i>L. catesbeianus</i> / larvae	Enzymaktivität	Ossana et al. 2013
195	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Haem peroxidase-Aktivität	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	Enzymaktivität	Petala et al. 2009

Nr.	Effektdetektionskategorie	Bioassay-Name	Spezies/Zelllinie	Effekt	Referenz
196	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Genexpression CYP 4G	<i>Chironomus riparius</i>	metabolische Aktivität (relative Menge CYP4G mRNA)	Planello et al. 2015
197	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Assay zur Bestimmung Glutathion-Gehalt	<i>L. catesbeianus</i> / larvae, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	GSH-Gehalt	Ossana et al. 2013; Petala et al. 2009
198	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Assay zur Bestimmung Glycogen-Gehalt	<i>Chironomus riparius</i>	Glycogengehalt	Planello et al. 2015
199	metabolische Enzyme & Rezeptoren	Assay zur Bestimmung Protein-Gehalt	<i>L. catesbeianus</i> / larvae	Proteingehalt	Ossana et al. 2013, Gupta et al. 2012
200	metabolische Enzyme & Rezeptoren	MCF7-RARE- Assay	<i>Homo sapiens</i> / MCF-7	Induktion RAR	Escher et al. 2014
201	metabolische Enzyme & Rezeptoren	P19/A15- Assay	<i>Mus</i> / P19/A15	Induktion RAR	Escher et al. 2014
202	metabolische Enzyme & Rezeptoren	ROR β -transFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion ROR β	Escher et al. 2014
203	metabolische Enzyme & Rezeptoren	hRAR-Yeast Assay- Assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion RAR	Escher et al. 2014
204	sonstige spezifische Effekte	hypoxia-switchgear- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HT1080	Hypoxie	Jia et al. 2015; Escher et al. 2014
205	sonstige spezifische Effekte	HIF-1a-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion HIF-1a	Escher et al. 2014
206	sonstige spezifische Effekte	p53- Geneblazer- Assay	<i>Homo sapiens</i> / HCT-116	Induktion p53	Stalter et al. 2016; Escher et al. 2014
207	sonstige spezifische Effekte	p53-cisFACTORIAL- Assay	<i>Homo sapiens</i> / Hep-G2	Induktion p53	Escher et al. 2014
208	sonstige spezifische Effekte	p53-CALUX- Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion p53	Escher et al. 2014
209	sonstige spezifische Effekte	p53-CALUX +S9- Assay	<i>Homo sapiens</i> / U2-OS	Induktion p53	Escher et al. 2014

Anhang 5 – Übersicht der betrachteten Substanzen und deren Wirkweisen

Anwendung *	Substanz	CAS	Wirkweise
Ph Psychopharmaka	Carbamazepin	298-46-4	Ionenkanal-Modulation
TP Ph	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin	58955-93-4	unbekannt
Ph Analgetikum	Diclofenac	15307-86-5	Antiinflammatorisch
Ph Antibiotikum	Sulfamethoxazol	723-46-6	Antibakteriell
TP Ph	Acetyl-Sulfamethoxazol	21312-10-7	Antibakteriell
Ph Antibiotikum	Clarithromycin	81103-11-9	Antibakteriell
Ph Beta Blocker	Metoprolol	37350-58-6	Betablocker
Ph Beta Blocker	Sotalol	3930-20-9	Betablocker
Ph Lipidregulation	Bezafibrat	41859-67-0	Störung des Lipidmetabolismus
Ph Psychopharmaka	Lamotrigin	84057-84-1	Ionenkanal-Modulation
Ph Antihistamin	Cetirizin	83881-51-0	Antihistamin
Ph Psychopharmaka	Gabapentin	60142-96-3	Ionenkanal-Modulation
Ph Analgetikum	Ibuprofen	15687-27-1	Antiinflammatorisch
Ph Psychopharmaka	Oxazepam	604-75-1	Neuroaktiv
TP Ph	N-Acetyl-4-aminoantipyrin	83-15-8	unbekannt
TP Ph	N-Formyl-4-aminoantipyrin	1672-58-8	unbekannt
Ph Hypertonie	Hydrochlorothiazid	58-93-5	Ionenkanal-Modulation
Ph Antidiabetikum	Metformin	657-24-9	Störung der Signaltransduktion
Ph Kontrastmittel	Amidotrizoesäure	117-96-4	unbekannt
Ph Kontrastmittel	Iomeprol	78649-41-9	unbekannt
Ph Kontrastmittel	Iopamidol	60166-93-0	unbekannt
Ph Kontrastmittel	Iopromid	73334-07-3	unbekannt
	Bisphenol A (BPA)	80-05-7	Endokrin
H + B	Diuron	330-54-1	Photosynthese-Inhibierung
H + B	Isoproturon	34123-59-6	Photosynthese-Inhibierung
F	Carbendazim	10605-21-7	Störung der Mitose/ Zellzyklus
H	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	94-75-7	Synthetisches Auxin
H	Mecoprop	93-65-2	Synthetisches Auxin
H + B	Terbutryn	886-50-0	Photosynthese-Inhibierung
H	2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (MCPA)	94-74-6	Synthetisches Auxin
H	Bentazon	25057-89-0	Photosynthese-Inhibierung
I + B	Diethyltoluamid (DEET)	134-62-3	unbekannt
B	Triclosan	3380-34-5	Störung des Lipidmetabolismus
FA	Acesulfam K	55589-62-3	unbekannt
FA Süßstoff	Cyclamat	139-05-9	unbekannt
FA Süßstoff	Saccharin	81-07-2	Pot. Kanzerogen
FA Süßstoff	Sucralose	56038-13-2	unbekannt
IC PFC	Perfluorohexansäure (PFHxA)	307-24-4	Entwicklungstoxizität
IC PFC	Perfluoroheptansäure (PFHpA)	375-85-9	Entwicklungstoxizität
IC PFC	Perfluorooctansäure (PFOA)	335-67-1	Störung des Lipidmetabolismus; Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Endokrin
IC PFC	Perfluorononansäure (PFNA)	375-95-1	Störung des Lipidmetabolismus; Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Endokrin
IC PFC	Perfluorodecansäure (PFDA)	335-76-2	Störung des Lipidmetabolismus; Endokrin
IC PFC	Perfluorobutansäure (PFBtA)	375-22-4	unbekannt
IC PFC	Perfluoropentansäure (PFPtA)	2706-90-3	unbekannt
IC PFC/ TP I	Perfluorooctansulfonsäure (PFOS)	1763-23-1	Störung des Lipidmetabolismus; Zellmembran-Störung
IC Korrosionsinhibitor	1H-Benzotriazol	95-14-7	unbekannt

Anwendung *	Substanz	CAS	Wirkweise
IC Korrosionsinhibitor	4-Methyl-1H-benzotriazol	29878-31-7	unbekannt
IC Korrosionsinhibitor	5-Methyl-1H-benzotriazol	136-85-6	unbekannt
IC	Perfluorohexansulfonat (PFHxS) (Anion)	355-46-4	Zellmembran-Störung
IC Flammschutzmittel	Tris(2-chloroethyl)phosphat	115-96-8	Neuroaktiv
IC	Tris(1-chloro-2-propyl)phosphat	13674-84-5	unbekannt
IC Flammschutzmittel	Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphat (TDCPP)	13674-87-8	Neuroaktiv
IC	TnBP (Tris (n-butyl) phosphat)	126-73-8	unbekannt
IC Flammschutzmittel	Triphenylphosphat	115-86-6	Neuroaktiv
IC	Tri(butoxyethyl)phosphat	78-51-3	unbekannt
IC	Fluoranthren	206-44-0	Störung der Mitose/ Zellzyklus
IC	Triphenylphosphanoxid	791-28-6	unbekannt
IC	4-iso-Nonylphenol	11066-49-2	Endokrin
Ph Kontrazeptivum	Estradiol	50-28-2	Endokrin
IC PFC	Perfluoroundecansäure (PFUnDA)	2058-94-8	Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Nukleinsäure-Schädigung, Endokrin
IC PFC	Perfluorododecansäure (PFDoDA)	307-55-1	Zellmembran-Störung; Nukleinsäure-Schädigung
Ph Steroid	Estron	53-16-7	Endokrin
IC PFC	Perfluorobutanesulfonsäure (PFBS)	375-73-5	Oxidativer Stress
IC PFC	Perfluorodecylsulfonsäure	335-77-3	unbekannt
TP Ph	Guanylharstoff	141-83-3	unbekannt
IC	tert-Oktylphenol	140-66-9	Endokrin
H	Dichlorprop	120-36-5	Synthetisches Auxin
IC PFC/ TP I	Perfluorooctansulfonsäureamid (PFOSA)	754-91-6	Atmungsketten-Inhibierung
PC	HHCB	1222-05-5	unbekannt
PC	AHTN	21145-77-7	unbekannt
IF PFC	1H,1H,2H,2H-Perfluorooctansulfonat	27619-97-2	unbekannt
IC Chelator	NTA (Nitrilotriacetat)	139-13-9	Pot. Kanzerogen
IC Chelator	EDTA (Ethylendinitriilotetraacetat)	60-00-4	Pot. Kanzerogen
IC Chelator	DTPA (Diethylentriaminpentaacetat)	67-43-6	unbekannt

*H = Herbizid; F = Fungizid; B = Biozid; I = Insektizid; Ph = Pharmaka; FA = Lebensmittelzusatzstoff (*Food additive*); N = Narkotika, Anästhetika, Halluzinogen; IC = Industriechemikalie; PC = Personal Care Produkte & Kosmetika

Anhang 6 - Erläuterungen zur Bewertung der Bioassays

Bewertungskriterien

Die einzelnen Kriterien sowie der für die Bewertung der Bioassays verwendete Farbcode sind im Folgenden erläutert.

Standardisiertes Protokoll

Ein standardisiertes Protokoll (z. B. OECD Richtlinie, ISO Norm) ist unumgänglich, um zu gewährleisten, dass ein Bioassay beim Einsatz in verschiedenen Laboren reproduzierbare Ergebnisse liefert. Für dieses Kriterium erfolgte eine Ja/Nein Bewertung.

Referenzsubstanz

Die Kenntnis über das Vorhandensein einer entsprechenden Referenzsubstanz/ Positivkontrolle ist zum einen für die Standardisierung bzw. Eichung eines Bioassays in einem Labor notwendig. Zum anderen ist die Referenzsubstanz für die Interpretation der Bioassay-Ergebnisse wichtig. Dies wird in Kapitel 5 näher erläutert. Auch für dieses Kriterium erfährt jeder Bioassay eine Ja/Nein Bewertung -

Verwendung in der Regulatorik

Es werden in Deutschland bereits Bioassays zur Bewertung der Toxizität von Abwässern, Oberflächengewässern oder Sedimenten angewendet. Bioassays, die in dieser Form bereits eingesetzt werden, erfahren für dieses Kriterium eine positive Bewertung, alle anderen werden als hier negativ markiert. Die Informationen dazu wurden aus Kienle et al. (2015) entnommen.

Anwendung in einer Monitoringstudie in Baden-Württemberg

In einer in Baden-Württemberg durchgeführten Monitoringstudie von Tribskorn und Kollegen wurden neben chemischer Analytik auch Bioassays verwendet (Tribskorn, 2015). Wurde ein Bioassay in dieser Studie angewendet, erfolgte eine positive Bewertung, entsprechend wurde negativ markiert, wenn dies nicht der Fall war.

Bewertung in einer Expertenbefragung

In der von Kienle et al. (2015) durchgeführten Expertenbefragung erfolgte eine Bewertung der betrachteten Bioassays im Hinblick auf die Anwendung im Umweltmonitoring.

Dabei wurden folgende Kriterien betrachtet:

- Anwendbarkeit für Umweltproben
- Empfindlichkeit, Robustheit
- Grad der Validierung / Standardisierung
- Kosteneffizienz und gute routine-mäßige Anwendbarkeit
- Anwendbarkeit in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren.

Des Weiteren wurde berücksichtigt:

- Interpretierbarkeit: Kann der Test zwischen akzeptablen und inakzeptablen Bedingungen auf eine wissenschaftliche und gerichtsfeste Art und Weise entscheiden?
- Relevanz: Kann ein Bezug zu negativen Effekten auf anderen biologischen Organisations-ebenen hergestellt werden?
- Vorausschauende Eigenschaften: Eignet sich der Test als eine Art Frühwarnsystem für chronische bzw. Langzeiteffekte?

Die Ergebnisse dieser Bewertung wurden direkt übernommen. Eine Einstufung erfolgte dabei mit Hilfe eines Farbcodes, wobei eine gute Bewertung (überwiegend 1) grün, eine schlechte Bewertung (überwiegend 3) rot markiert wurde. Hellgrün und gelb bilden mäßige Bewertungen ab (vgl. Tabelle 6).

Sensitivität in einer wissenschaftlichen Studie zur Evaluierung von *in vitro* Bioassays für das Gewässermonitoring

In einer wissenschaftlichen Studie von Escher und Kollegen wurde 2014 untersucht inwieweit verschiedene Bioassays die chemische Belastung verschieden behandelter Abwässer detektieren können und damit eine Aussage zur Wasserqualität erlauben. In dieser Studie wurden im Rahmen eines internationalen Projektes und unter Einbeziehung verschiedener Labore insgesamt 103 *in vitro* Bioassays verwendet und verschiedene Wasserproben (u. a. Abfluss von Kläranlagen, Oberflächenwasser, Trinkwasser) untersucht, um die Effizienz von Wasserbehandlungsprozessen (z. B. in Kläranlagen) abzubilden (Escher et al., 2014). Um Messergebnisse verschiedener Bioassays vergleichen zu können, wurde in Escher et al. 2014 eine einheitliche Konzentrationseinheit, der relative Anreicherungsfaktor (*relative enrichment factor* (REF), siehe Kapitel 5), verwendet. Dieser Faktor beschreibt das Ausmaß der Verdünnung bzw. Anreicherung einer Wasserprobe. Welche Bioassays bei welchem REF mit welcher Wasserprobe reagieren, wurde in Escher et al. mit Hilfe eines Farbcodes gezeigt. Dabei bedeutet ein Effekt bei einem $REF < 1$, dass die

Probe verdünnt werden musste und der Bioassay dementsprechend sensitiv reagiert. Für die Bewertung der Bioassays hinsichtlich ihrer Sensitivität wurde dieser Farbcode entsprechend angepasst. Zeigt ein Bioassay beispielsweise Effekte im Konzentrationsbereich kleiner einem relativen Anreicherungsfaktor von 0,3 wird dieser als sehr sensitiv (grün) markiert. Auf der anderen Seite werden Bioassays mit Effekten im Konzentrationsbereich $REF > 10$ als wenig sensitiv (rot) markiert. Hellgrün und gelb bilden eine hohe ($0,3 < LID < 3$) bzw. niedrige ($3 < LID < 10$) Sensitivität ab (vgl. Tabelle 6). Der hier verwendete Farbcode zur Darstellung der Sensitivität ist in Tabelle 6 abgebildet. Als Effekt wird hierbei der LID (lowest ineffective dilution)- Wert verwendet. Dieser gibt an, ab welcher Verdünnung der Probe kein Effekt zu beobachten ist. Wie der REF ermittelt werden kann, der den LID-Wert aufweist, wird in Kapitel 5 näher erläutert.

Es muss hierbei bedacht werden, dass eine geringe Sensitivität in dieser Studie auch auf das Fehlen einer, für einen Bioassay spezifischen, Substanzgruppe in der Wasserprobe hindeuten kann.

Das verwendete Farbschema zur Bewertung der Biotestverfahren ist in Tabelle 6 nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 6 Detailliertes Farbschema zur Bewertung der Bioassays

Standardisierung und Einsatz (a-d)	Bewertung (e)	Sensitivität (f)
Ja	gut	sehr hoch ($LID < 0,3$ (REF))
	gut bis mäßig	Hoch ($0,3 < LID < 3$)
	mäßig	Niedrig ($3 < LID < 10$)
Nein	schlecht	sehr niedrig ($10 < LID$)
	keine Bewertung	nicht verwendet

Bioassay-Bewertung pro Effektdetektionskategorie

In Kapitel 4 wurde die Bioassays-Auswahl anhand des beschriebenen Bewertungssystems bereits am Beispiel der östrogenen Effektdetektion gezeigt. Im Folgenden ist die Bioassay-Auswahl für jede Effektdetektionskategorie beschrieben.

allgemeine Toxizität Organismen

In der Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“ wurden Bioassays zusammengefasst, die aggregierte Effekte, wie zum Beispiel Wachstum, Letalität, Reproduktion, und Verhalten in Organismen detektieren. Tabelle 7 zeigt alle in dieser Kategorie erfassten Bioassays, mit dem beschriebenen Farbschema zur Bewertung.

Tabelle 7 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
1	akuter Immobilisierungstest	■	■	■	■	■	■
2	akuter Immobilisierungstest- Daphtoxkit FTM magna	■	■	■	■	■	■
3	akuter Immobilisierungstest-Daphtoxkit FTM pulex	■	■	■	■	■	■
4	akuter Immobilisierungstest-Thamnotoxkit FTM	■	■	■	■	■	■
5	Daphnia IQ Toxicity Test (IQ)	■	■	■	■	■	■
6	ECOTOX system	■	■	■	■	■	■
7	Algenwachstumshemmungstest	■	■	■	■	■	■
8	Algenwachstumshemmung- Algatoxkit	■	■	■	■	■	■
9	Algenwachstumshemmung- Algal microplate screen	■	■	■	■	■	■
10	Algenwachstumshemmung-kombinierter Algenassay	■	■	■	■	■	■
11	Wachstumshemmung- root elongation bioassay	■	■	■	■	■	■
12	Wachstumshemmung- Allium cepa test	■	■	■	■	■	■
13	Wachstumshemmung- seed germination assay	■	■	■	■	■	■
14	Wachstumshemmung- L. minor growth inhibition test	■	■	■	■	■	■
15	Wachstumshemmung- Hydra attenuata assay	■	■	■	■	■	■
16	Wachstumshemmung- ostracode growth inhibition test/ OSTRACODTOXKIT F®	■	■	■	■	■	■
17	Vicia faba bioassay	■	■	■	■	■	■
18	Nematodentest	■	■	■	■	■	■
19	Mouthpart Deformities	■	■	■	■	■	■
20	Froschembryoteratogenitätsassay (FETAX)	■	■	■	■	■	■
21	Fischembryotoxizitätstest (FET)	■	■	■	■	■	■
22	Fischembryotoxizitätstest (FET) 120h	■	■	■	■	■	■
23	Fischlarventoxizitätstest (FELST)	■	■	■	■	■	■
24	Reproduktion- rotifer reproduction inhibition test/ ROTOXKIT	■	■	■	■	■	■
25	Reproduktion- Daphnia reproduction test	■	■	■	■	■	■
26	Reproduktion- Gammarus pulex test	■	■	■	■	■	■
27	Entwicklung- Acartia tonsa early life stages test	■	■	■	■	■	■
28	Reproduktion- Chronischer Schneckenreproduktionstest	■	■	■	■	■	■
29	Verhalten- H. azteca bioassay	■	■	■	■	■	■
30	Verhalten- L. variegatus bioassay	■	■	■	■	■	■
31	Frassaktivitätstest	■	■	■	■	■	■
32	Rapidtoxkit	■	■	■	■	■	■
33	Verhalten- Zebraärblingsembryonen und -larven/ LMR	■	■	■	■	■	■
34	bakterielle Zytotoxizität- Microtox™	■	■	■	■	■	■
35	bakterielle Zytotoxizität- ToxAlert™	■	■	■	■	■	■
36	bakterielle Zytotoxizität- BioTox	■	■	■	■	■	■
37	bakterielle Zytotoxizität-Luminescent bacteria bioassay	■	■	■	■	■	■
38	bakterielle Zytotoxizität- Bacterial Luminescence Toxicity Screen	■	■	■	■	■	■
39	bakterielle Zytotoxizität- ToxScreen test	■	■	■	■	■	■
40	bakterielle Zytotoxizität- Lux bacteria toxicity test	■	■	■	■	■	■
41	bakterielle Zytotoxizität- photobacterium test	■	■	■	■	■	■
42	Hefe Zellproliferationsassay	■	■	■	■	■	■
43	Hefe Zellproliferationsassay (GreenScreen)	■	■	■	■	■	■
44	bakterielle Zytotoxizität- Bioluminescent Reporter Bacterial Biochips	■	■	■	■	■	■
45	bakterielle Zytotoxizität- Multi-Channel Continuous Toxicity Monitoring System	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung **Tabelle 7**

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
46	E.coli- CellSense assay						
47	E.coli-genome-wide reporter bacterial live cell array						
48	Microbial Fuel Cell (MFC)						

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

Für die Erfassung von Letalität und Wachstum sind sowohl Kurzzeit- als auch Langzeittests vertreten. Reproduktion und Verhalten lassen sich hingegen nur in längerfristigen Tests untersuchen. Dies ist für ein akut- Gewässermonitoring zunächst eher ungeeignet, was sich im Farbcode in Tabelle 7 widerspiegelt. Etabliert sind die folgenden drei Bioassays, die hier auch die meisten positiven (grünen) Bewertungen zeigen (vgl. Tabelle 7):

- *Daphnia magna* akuter Immobilisierungstest (OECD GL 202, 2004), Nr. 1
- *Pseudokirchneriella subcapitata* Algenwachstumsinhibierungstest (OECD GL 201, 2006), Nr. 7
- *Danio rerio* Fischembryotoxizitätstest (FET) (OECD GL 236, 2013), Nr. 21

Für die spätere potentielle Berücksichtigung in einer Testbatterie würden wir zunächst diese drei Bioassays für die Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“ vorschlagen. Es gibt weitere längerfristige Bioassays, wie beispielsweise den FELS-Test (Fish early life stage test), den *Daphnia magna* Reproduktionstest, oder den *Lemna minor* Pflanzenwachstumsinhibierungstest, die überwiegend positiv bewertet wurden, aber für den Einsatz als Kurzzeit-Akutttest nicht geeignet sind. Auch der Microtox-Assay, ein in der Abwassertestung etablierter Bakterien-Toxizitätsassay für die Indikation von Schwermetallbelastung, ist hier dreimal positiv (grün) bewertet. Eine potentielle Indikation von Schwermetallbelastung ist hier zunächst nicht relevant, da diese bei einer Anreicherung von organischen Mikroschadstoffen nicht erfasst werden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Langzeittests beträgt die Expositionszeit in diesem Bioassay nur 30 Minuten. Ob eine Erfassung einer komplexen Belastung, d. h. die Chemikalienaufnahme in den Testorganismus, sowie die Entfaltung der Wirkung innerhalb dieser Zeit reproduzierbar gewährleistet ist und wie diese Ergebnisse im Hinblick auf potentiell in diesem Bioassay aktive Chemikalien interpretiert werden können, müsste zunächst geklärt werden, wenn dieser Bioassay für die Anwendung im Rahmen des aquatischen Gewässermonitorings berücksichtigt werden soll.

allgemeine Toxizität Zellen

Neben der Betrachtung allgemein toxischer Effekte mit Hilfe komplexer aquatischer Organismen, kann durch den Einsatz verschiedener zellulärer Systeme sowohl eine

spezifische Wirkung als auch die unspezifische Zelltoxizität detektiert werden. In der Effektdetektionskategorie „allgemeine Toxizität Zellen“ sind zunächst alle Bioassays zusammengefasst, die zur Detektion der unspezifischen Zelltoxizität (Zytotoxizität) geeignet sind. Tabelle 8 zeigt eindrucksvoll, dass derzeit keiner der Bioassays dieser Kategorie für den Einsatz im Umweltmonitoring geeignet scheint. Die Bioassays mit Nummer 52 und 54 wurden in Escher et al. 2014 verwendet, waren jedoch weitaus weniger sensitiv als organismische oder spezifische Bioassays. Es wird deshalb zunächst keiner dieser Bioassays für die weitere Betrachtung ausgewählt, allerdings mit dem Hinweis, dass bei der Verwendung von spezifischen *in vitro* zell-basierten Bioassays, z. B. zur Detektion der Aktivierung eines Rezeptors, die unspezifische Zytotoxizität stets mit erfasst werden muss, um Falsch-Positive Signale auszuschließen.

Tabelle 8 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „allgemeine Toxizität Zellen“; Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
49	Shk1 Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
50	WST-1- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
51	XTT- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
52	Caco 2- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
53	NRU- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
54	MTT- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
55	ATP Gehaltsassay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
56	Kenacid Blue Protein-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
57	Alamar Blue- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
58	SK-N-SH- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey
59	Acid Phosphatase Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
60	LDL Aufnahmeassay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

phytotoxische Effekte

Ein Einfluss von phytotoxischen Chemikalien kann sich auf das Wachstum von Pflanzen auswirken. Um diesen Effekt zu detektieren wurde bereits in der Kategorie „allgemeine Toxizität Organismen“ ein Bioassay ausgewählt (Algenwachstumsinhibierungstest). Physiologisch lässt sich die Inhibierung des Wachstums oft auf eine Störung des Pflanzenmetabolismus, konkret der Photosynthese-Leistung zurückführen. Insbesondere Herbizide werden gezielt als Photosynthese-Inhibitoren entwickelt und eingesetzt. Bioassays, die diesen Effekt detektieren, sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Aufgrund der 4-fach positiven Bewertung wird der

- *Chlorella vulgaris* Imaging-PAM Assay, Nr. 61

zur Detektion der Photosynthese-Inhibierung vorgeschlagen.

Tabelle 9 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „phytotoxische Effekte“; Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
61	Photosynthese-Imaging-PAM Assay	■	■	■	■	■	■
62	Photosynthese-LuminoTox SAPS	■	■	■	■	■	■
63	Photosynthese- kombinierter Algentest	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

hormonartige Effekte

Insgesamt befinden sich unter den 209 Bioassays 55, die für die Detektion von hormonartigen Effekten eingesetzt werden können. Komplexe Auswirkungen solcher Effekte auf Organismen können derzeit nur in chronischen Tests untersucht werden. Im Gegensatz dazu kann in Kurzzeit-Bioassays spezifisch (für einzelne Rezeptoren bzw. Hormon-Signalwege) das endokrine Potential von Chemikalien und Umweltproben untersucht werden.

In Tabelle 10 bis Tabelle 13 sind alle dafür zur Verfügung stehenden Bioassays aufgelistet und bewertet. Die Auswahl der Bioassays, welche östrogene Effekte analysieren, wurde bereits im Haupttext dargelegt (Kapitel 4).

androgene Effekte

Endokrine Disruptoren stören oft nicht nur den Östrogen-Signalweg, sondern können gleichzeitig oder unabhängig von ihrer östrogenen Wirkung andere Hormon-Signalwege

beeinflussen. So ist beispielsweise beschrieben, dass bestimmte Umweltchemikalien durch eine Blockierung des Androgenrezeptors eine anti-androgene Wirkung in Organismen hervorrufen können. Die Liste der Bioassays zur Detektion androgener und anti-androgener Effekte ist in

Tabelle 10 dargestellt. Der Anti-MDA-kb2-Assay (Nr. 95) hat hier die meisten positiven (grünen) Bewertungen, scheint allerdings weniger sensitiv als der Anti-AR-CALUX[®]-Assay (Nr. 93) (Escher et al. 2014;

Tabelle 10, Spalte f). Beide Bioassays messen einen anti-androgenen Effekt. Für die weitere Betrachtung und einen potentiellen Einsatz in einer Testbatterie würden wir deshalb den

- Anti AR-CALUX[®]-Assay, Nr. 93

vorschlagen. Potentiell androgene Effekte können mit dem AR-CALUX[®] -Assay (Nr. 92) bzw. dem MDA-kb2-Assay (Nr. 94) detektiert werden. Von einer weiteren Betrachtung in Richtung des Einsatzes im Gewässermonitoring würden wir zunächst absehen, da eine sensitive Bestimmung eines spezifischen Effektes in Umweltproben bisher nicht gezeigt wurde.

Tabelle 10 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „androgene Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
90	YAS -Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
91	AR Transaktivierungsassay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
92	AR-CALUX [®] -Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Red
93	Anti AR-CALUX [®] -Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Yellow
94	MDA-kb2 –Assay	Red	Green	Red	Red	Green	Red
95	Anti-MDA-kb2 –Assay	Red	Green	Red	Green	Green	Red
96	MCF7-ARE-Assay	Red	Red	Red	Red	Green	Red
97	AR-transFACTORIAL-Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
98	AR-GeneBLAzer-Assay	Red	Red	Red	Red	Red	Red
99	HELN-AR (PALM)- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

progesterone Effekte

Zusätzlich zu Östrogen- und Androgenrezeptoren sind auch Progesteronrezeptoren (PR), wichtige Schaltstellen im Hormonhaushalt. Der Einfluss von Umweltchemikalien auf Progesteronrezeptoren ist bisher wenig untersucht. Die Liste an verfügbaren Bioassays ist in Tabelle 11 dargestellt. Aufgrund fehlender Hinweise auf potentiell aktive Umweltchemikalien

bzw. fehlender Sensitivität diese zu detektieren (dies kann bei der Berücksichtigung der Spalte f in Tabelle 11 nicht unterschieden werden) wird hier zunächst kein Bioassay für die weitere Betrachtung vorgeschlagen.

Tabelle 11 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „progesterone Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
107	PR Proteinexpression	■	■	■	■	■	■
108	PR-CALUX [®] -Assay	■	■	■	■	■	■
109	Anti PR-CALUX [®] -Assay	■	■	■	■	■	■
110	PR-GeneBLAzer-Assay	■	■	■	■	■	■
111	Steroidsyntheseassay	■	■	■	■	■	■
112	Steroidsyntheseassay	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

glucocorticoide Effekte

Glucocorticoidrezeptoren (GR) sind die Zielproteine sogenannter Corticosteroide. Sie sind an zahlreichen Prozessen im Organismus beteiligt und haben wichtige Funktionen im Glucose-Stoffwechsel sowie bei Immun- und Stressantwortprozessen. Aus der Liste der GR-Bioassays wird aufgrund der Bewertungen der

- GR-CALUX[®]- Assay, Nr. 100

für die weitere Betrachtung vorgeschlagen (Tabelle 12).

Tabelle 12 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „glucocorticoide Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
100	GR-CALUX [®] -Assay	■	■	■	■	■	■
101	Anti GR-CALUX [®] -Assay	■	■	■	■	■	■
102	GR-GeneBLAzer-Assay	■	■	■	■	■	■
103	Anti GR-GeneBLAzer-Assay	■	■	■	■	■	■
104	GR-Switchgear-Assay	■	■	■	■	■	■
105	GR-MDA-kb2 -Assay	■	■	■	■	■	■
106	GR-transFACTORIAL-Assay	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

thyroide Effekte

Das Thyroid-Hormon-System ist ein komplexes Stoffwechselsystem, welches an der Regulation des Calcium-Stoffwechsel, des Wachstums, der Zelldifferenzierung und vielen weiteren essentiellen Prozessen beteiligt ist. Ähnlich wie für den PR-Rezeptor konnte eine direkte und mit Hilfe von Bioassays nachweisbare Störung durch eine Bindung von Umweltchemikalien an den Thyroid-Rezeptor im Rahmen dieses Projektes nicht identifiziert werden (Tabelle 13). Deshalb wird hier zunächst kein Bioassay zur weiteren Betrachtung vorgeschlagen.

Tabelle 13 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „hormonartige Effekte“ und speziell „thyroide Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
113	TR- CALUX [®] -Assay	■	■	■	■	■	■
114	T-SCREEN-Assay	■	■	■	■	■	■
115	THR α 1-transFACTORIAL-Assay	■	■	■	■	■	■
116	HELN-TR-Assay	■	■	■	■	■	■
117	kolorimetrischer Bioassay	■	■	■	■	■	■
118	Chemilumineszenz Bioassay	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

mutagene/gentoxische Effekte

Mutagene und gentoxische Effekte von Chemikalien lassen sich nur schwer in Akuttests detektieren. Mit Bioassays detektierbar sind jedoch Anzeichen für eine Schädigung des Erbmaterials wie z. B. die Entstehung von Mikrozellkernen, DNA-Strangbrüchen oder die Induktion von DNA-Reparatur-Mechanismen. Die dafür geeigneten Bioassays sind in Tabelle 14 dargestellt. Drei Bioassays kommen hier, aufgrund ihrer Bewertung, für eine weitere Betrachtung in Frage: der Mikrokern-Test (Nr. 122), der UmuC-Test (Nr. 123) und der Ames-Test (Nr. 120). Aufgrund der positiveren Bewertung des

- Ames Tests, Nr. 120

in der Expertenbefragung (Kienle 2015; Tabelle 14, Spalte e) schlagen wir diesen für die weitere Betrachtung vor, weisen aber darauf hin, dass bei Bedarf auch die Betrachtung der anderen beiden erwähnten Bioassays sinnvoll sein kann.

Tabelle 14 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „mutagene/gentoxische Effekte“ , Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
119	Reverse mutation test	Green	Green	Red	Red	Grey	Grey
120	Ames-Test	Green	Green	Red	Red	Light Green	Red
121	Fluctuation Ames Test	Green	Green	Red	Red	Grey	Grey
122	Mikrokern-Test	Green	Green	Red	Light Green	Yellow	Red
123	UmuC-Test	Green	Green	Light Green	Red	Yellow	Red
124	Fpg-modifizierter Comet Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
125	Comet Assay	Red	Green	Red	Red	Yellow	Grey
126	SOS-Chromotest	Red	Red	Red	Light Green	Grey	Red
127	Mitotischer Index	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey
128	Schwesterchromatidaustausch- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
129	homologe Rekombination- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
130	Hefe Gentoxizitätsassay	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey
131	E. coli- Assay (pRecA-lux)	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey
132	DNA Schädigung E.coli	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

neurotoxische Effekte

Insbesondere die neurotoxische Wirkung von Organophosphaten (z. B. Chlorpyrifos) über die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) ist bekannt. Insgesamt sind in dieser Kategorie nur drei Bioassays aufgelistet (Tabelle 15), von welchen der allgemeine

- AChE-Inhibierungsassay, Nr. 133

die meisten positiven Bewertungen erhielt. Eine Verwendung des AChE-Enzymassays kann für die Analyse von Umweltproben jedoch nicht direkt empfohlen werden, da bereits gezeigt wurde, dass unspezifische Effekte aufgrund von gelöster organischer Substanz (*dissolved organic matter*) zu beobachten sind (Escher et al., 2014). Alternativen sind in der Literatur beschrieben, so bietet es sich beispielsweise an, Embryonen des Zebrafischlings zu exponieren und anschließend das Enzym zu isolieren und die Aktivität zu analysieren (Küster, 2005).

Neurotoxische Effekte von Chemikalien beeinflussen meist das Verhalten von Organismen. Dieser Endpunkt wurde bereits in der Effektdetektionskategorie „allgemeine Toxizität Organismen“ erfasst und ist – als Ergebnis dieser Studie – bisher nicht in Form eines Bioassays zur spezifischen und akuten Detektion von Neurotoxizität verfügbar.

Tabelle 15 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „neurotoxische Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
133	AChE-Inhibierungsassay	green	green	red	red	light green	yellow
134	AChE-Inhibierungsassay (Biomarker)	red	red	red	green	grey	grey
135	Daphnia magna chitobiase Aktivitätsassay	red	red	red	red	grey	grey

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

Immuntoxizität und oxidativer Stress

Immuntoxizität

Tabelle 16 zeigt die Bioassays, deren Effekte auf eine Störung des Immunsystems hindeuten könnten. Insbesondere in Hinblick auf Relevanz, Interpretierbarkeit und Grad der Validierung wurden die ersten beiden Bioassays in der Expertenbefragung negativ bewertet (Kienle 2015; Tabelle 16, Spalte e). Die Bioassays 141 bis 143 erfassen Effekte, die mit einer Aktivierung bzw. Inhibierung des Stress-Markers NF-kB zusammenhängen. NF-kB ist ein Proteinkomplex mit zahlreichen Funktionen in Zellen des Immunsystems, der, insbesondere durch verschiedene Arten von Stress, aktiviert wird und neben verschiedenen anderen Funktionen den Zellzyklus reguliert. Der Jurkat E6.1 IκB Assay wurde in der Expertenbefragung nicht berücksichtigt, war aber sensitiv in der hier berücksichtigten Studie (Escher et al. 2014; Tabelle 16, Spalte f). Da dieser Bioassay, sowie dessen Durchführung nicht eindeutig in der Literatur beschrieben ist und da zum Einfluss von Umweltchemikalien auf das Immunsystem von Organismen derzeit noch erheblicher Forschungsbedarf besteht, würden wir zunächst keinen dieser Bioassays für die weitere Betrachtung vorschlagen. Es muss in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden, inwieweit bekannte immuntoxische Umweltchemikalien existieren und ob deren Effekte mit einem der hier aufgelisteten Bioassays spezifisch detektierbar sind.

Tabelle 16 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „Immuntoxizität und oxidativer Stress“ und speziell „Immuntoxizität“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
136	THP1 Zytokinproduktionsassay	Red	Green	Red	Red	Red	Red
137	Interleukin 6-produktionsassay	Red	Green	Red	Red	Red	Grey
138	NO Ausschüttungsassay	Red	Green	Red	Red	Grey	Grey
139	Phagozytose-Aktivitätsassay	Red	Red	Red	Red	Yellow	Grey
140	Jurkat E6.1 IκB- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Light Green
141	NF-κB- Geneblazer- Assay	Red	Green	Red	Red	Grey	Red
142	NF-κB-cisFACTORIAL- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red
143	NF-κB-CALUX- Assay	Red	Red	Red	Red	Grey	Red

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

oxidativer Stress

Die verschiedenen Bioassays sind in Tabelle 17 aufgelistet. Insgesamt ist diese Kategorie noch wenig untersucht. Einer der Bioassays, der

- Nrf2/ARE-cisFACTORIAL Assay, Nr. 147

hat zwei positive (grüne) Bewertungen. In der beschriebenen wissenschaftlichen Studie (Escher et al. 2014) detektierten auch die Bioassays Nr. 144 und 148, die über ein ähnliches Prinzip funktionieren, Effekte im mittleren Sensitivitätsbereich. Wir schlagen deshalb vor, zunächst einen dieser Bioassays in die weitere Betrachtung aufzunehmen. Allerdings muss hier zukünftig geklärt werden, wie ein so detektierter Indikatoreffekt für oxidativen Stress im Rahmen des Gewässermonitorings interpretiert und genutzt werden kann.

Tabelle 17 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „Immuntoxizität und oxidativer Stress“ und speziell „oxidativer Stress“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
144	AREc32-Assay	■	■	■	■	■	■
145	ARE GeneBLAzer-Assay	■	■	■	■	■	■
146	Nrf2-MDA-MB-Assay	■	■	■	■	■	■
147	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay	■	■	■	■	■	■
148	Nrf2-CALUX-Assay	■	■	■	■	■	■
149	Nrf2-keep-Assay	■	■	■	■	■	■
150	Lipidperoxidationsassay	■	■	■	■	■	■
151	ROS Bildungsassay	■	■	■	■	■	■
152	E.coli-Assay (Proteinschädigung)	■	■	■	■	■	■
153	E.coli-Assay (plbpA-lux; grpE::luxCDABE)	■	■	■	■	■	■
154	E.coli-Assay (pFabA-lux)	■	■	■	■	■	■
155	E.coli-Assay (pKatG- lux)	■	■	■	■	■	■
156	E.coli-Assay (pSoxS-lux)	■	■	■	■	■	■
157	E.coli-Assay (pmicF-lux)	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

metabolische Enzyme und Rezeptoren

In der Effektdetektionskategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ wurden eine Vielzahl verschiedener Bioassays zusammengefasst, die einerseits spezifisch die Induktion der Biotransformation und andererseits die spezifische Bindung an bzw. die Aktivierung von verschiedenen Rezeptoren detektieren können. Die Auswahl der Bioassays wird im Folgenden innerhalb der verschiedenen Unterkategorien beschrieben.

Aktivierung der Biotransformation

Die Induktion metabolischer Prozesse stellt nicht *per se* einen Indikator für Toxizität dar, doch gibt diese einen Hinweis auf das Vorhandensein bioaktiver Chemikalien. Durch die Präsenz von Chemikalien werden bestimmte Biotransformations-Prozesse in Organismen aktiviert. Diese Prozesse können sowohl eine Entgiftung, als auch eine Bioaktivierung der Chemikalie zur Folge haben (Escher et al. 2014). Folgende Rezeptoren spielen dabei eine besondere Rolle: PXR (*pregnane X receptor*), PPAR α , β , und γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*) und CAR (*Constitutive androstane receptor*) (Omiecinski et al., 2011). Verschiedene Bioassays dieser Kategorie (aufgelistet in Tabelle 18) wurden zweimal positiv bewertet (je zwei grüne Kästchen). Dabei wurde der

- EROD Aktivitätsmessung, Nr. 163

als einziger dieser Bioassays in der Expertenbefragung berücksichtigt. Grundlage des EROD-Assays ist die Bindung eines Substrats an die Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), ein Enzym, welches durch Dioxin-ähnliche Chemikalien, PAK und PCB induziert werden kann. Durch diese klare Zuordnung der detektierbaren chemischen Stoffklasse bietet sich dieser Bioassay am ehesten für eine weitere Betrachtung im Rahmen des Umweltmonitorings an. Zusätzlich könnten zukünftig der PXR-cis/transFACTORIAL- Assay (Nr. 159) sowie der CAR-Yeast-Assay (Nr. 162) als Indikatorsysteme für chemische Belastung in Betracht gezogen werden. Ein direkter Bezug zu bestimmten Stoffgruppen oder bekannten resultierenden schädlichen Effekten (wie für Dioxin) ist für diese Bioassays allerdings noch nicht bekannt.

Tabelle 18 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „Aktivierung der Biotransformation“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
158	Genexpression cyp1a	■	■	■	■	■	■
159	PXR-cis/transFACTORIAL-Assay	■	■	■	■	■	■
160	HG5LN PXR-Assay	■	■	■	■	■	■
161	CAR-transFACTORIAL-Assay	■	■	■	■	■	■
162	CAR-yeast-Assay	■	■	■	■	■	■
163	EROD Aktivitätsmessung	■	■	■	■	■	■
164	P450 Enzymassay (ECOD)	■	■	■	■	■	■
165	P450 Enzymassay (MCOD)	■	■	■	■	■	■
166	P450 Enzymassay (PROD)	■	■	■	■	■	■
167	P450 Enzymassay (BROD)	■	■	■	■	■	■
168	Phase II Enzymassay (DTD)	■	■	■	■	■	■
169	Phase II Enzymassay (COMT)	■	■	■	■	■	■
170	Phase II Enzymassay (UDPGT)	■	■	■	■	■	■
171	Phase II Enzymassay (ARS)	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

PPAR Signalweg

Der PPAR (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) - Signalweg reguliert in Organismen unter anderem den Glucose- und Lipidmetabolismus, sowie Entzündungsreaktionen. Bioassays, die Effekte in dieser Kategorie detektieren können, sind in Tabelle 19 aufgelistet. Dabei handelt es sich hauptsächlich um zellbasierte Transaktivierungsassays, die eine Aktivierung des PPAR γ Rezeptors detektieren. Für die weitere Betrachtung wird zunächst der

- PPAR γ -transFACTORIAL-Assay, Nr. 174

vorgeschlagen. Da allerdings auch hier ein konkreter Bezug zu bekannten Umweltchemikalien bzw. zu bekannten Langzeiteffekten fehlt, ist der Einsatz im Monitoring fraglich.

Tabelle 19 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „PPAR Signalweg“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
172	PPAR α -transFACTORIAL-Assay						
173	CALUX-PPAR α -Assay						
174	PPAR γ -transFACTORIAL-Assay						
175	PPAR γ -GeneBLAzer-Assay						
176	Anti PPAR γ -GeneBLAzer-Assay						
177	HELN-PPAR γ -Assay						
178	CALUX-PPAR γ 2-Assay						
179	MCF7-PPAR-Assay						

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

Bindung an den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)

Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) kann durch Chemikalienbindung aktiviert werden. Diese Aktivierung ist ein Indikator für das Vorhandensein von Chemikalien bestimmter Stoffgruppen – ähnlich dem EROD Assay - z. B. PAK, PCB und Dioxin-ähnliche Stoffe. Es ist auch gezeigt, dass Wechselwirkungen des AhR mit dem Östrogenrezeptor in Organismen stattfinden und regulatorische Bedeutung haben. Aus dem Vergleich der AhR-Bioassays (Tabelle 20) wird der

- DR- CALUX[®]-Assay, Nr. 183

für die weitere Betrachtung vorgeschlagen.

Tabelle 20 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“ und speziell „Bindung an den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
180	AhR assay- Assay	■	■	■	■	■	■
181	AhR Transaktierungsassay	■	■	■	■	■	■
182	AhR CAFLUX- Assay X	■	■	■	■	■	■
183	DR-CALUX [®] - Assay	■	■	■	■	■	■
184	AhR-cisFACTORIAL- Assay	■	■	■	■	■	■
185	MCF7DRE- Assay	■	■	■	■	■	■
186	H4IIEluc- Assay	■	■	■	■	■	■

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

Weitere Bioassays der Effektdetektionskategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“

Es wurden in dieser Studie weitere Bioassays erfasst, die spezifisch oder unspezifisch die Aktivität oder Expression bestimmter Proteine detektieren. Diese Bioassays sind in Tabelle 21 aufgelistet. Auch für diese Bioassays gilt, dass ein eindeutiger Bezug zu bekannten schädlichen Auswirkungen oder bestimmten chemischen Stoffgruppen derzeit noch erforscht wird. Deshalb wird von diesen Bioassays zunächst keiner weiterführend betrachtet.

Tabelle 21 Bewertung weiterer Bioassays in der Kategorie „metabolische Enzyme und Rezeptoren“; Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
187	Genexpression hspb11						
188	Proteinexpression HSP 70						
189	Genexpression hsc 70						
190	HSE-cisFACTORIAL-Assay						
191	Katalaseaktivität						
192	Glutathion-S-transferase- Aktivität						
193	Glutathionperoxidase-Aktivität						
194	Superoxiddismutas-Aktivität						
195	Haem peroxidase-Aktivität						
196	Genexpression CYP 4G						
197	Assay zur Bestimmung Glutathion-Gehalt						
198	Assay zur Bestimmung Glycogen-Gehalt						
199	Assay zur Bestimmung Protein-Gehalt						
200	MCF7-RARE-Assay						
201	P19/A15-Assay						
202	ROR β -transFACTORIAL-Assay						
203	hRAR-Yeast Assay-Assay						

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

sonstige spezifische Effekte

In einer weiteren Effektdetektionskategorie wurden Bioassays erfasst, die im weitesten Sinne spezifisch auf bestimmte Arten von Stress reagieren. Die Bioassays Nummer 204 und 205 detektieren eine Antwort auf Hypoxie (Sauerstoffarmut). Eine Induktion von p53 (Bioassays Nr. 206-209) in Organismen deutet auf eine Modifikation der Zellzyklusregulation hin und kann als spezifische Stressantwort angesehen werden. Fraglich ist derzeit inwieweit diese, im organismischen Kontext funktionierenden, regulativen Prozesse in Zellassays nachgebildet werden können, da es sich hier um sekundäre Effekte handelt, die nicht direkt mit Chemikalienbindung korrelieren. Auch für diese Bioassays besteht derzeit vor allem Forschungsbedarf, so dass hier kein Bioassay zur weiteren Betrachtung vorgeschlagen wird.

Tabelle 22 Bewertung der Bioassays in der Kategorie „sonstige spezifische Effekte“, Farbcode und Bewertung anhand der folgenden Kriterien: a) Vorhandensein eines standardisierten Protokolls, b) Referenzsubstanz bekannt, c) Verwendung in der Regulatorik, d) Anwendung in der Praxis, e) Bewertung durch Experten, f) Sensitivität in Ringstudie

Assay-Code*	Bioassay-Name	a)	b)	c)	d)	e)	f)
204	hypoxia-switchgear-Assay	red	green	red	red	grey	red
205	HIF-1a-cisFACTORIAL-Assay	red	red	red	red	grey	red
206	p53- Geneblazer-Assay	red	green	red	red	grey	red
207	p53-cisFACTORIAL-Assay	red	red	red	red	grey	red
208	p53-CALUX-Assay	red	red	red	red	grey	red
209	p53-CALUX +S9-Assay	red	red	red	red	grey	red

* Assay-Code: Nummerierung der Bioassays durchgehend wie in Anhang 4 gelistet

Anhang 7 - Gegenüberstellung der Chemikalien mit den Bioassays

Um einen Überblick zu erhalten, inwieweit die Chemikalien der Baden-Württemberg-Liste und ihre Wirkweisen mit den 13 priorisierten vorausgewählten Bioassays potentiell detektierbar sind, wurde eine Übersicht erstellt, die folgende Informationen enthält:

Zu den Chemikalien:

- Substanzname
- allgemeine Wirkweise
- spezifische Wirkweise
- molekulares Target
- Spezies.

Zu den ausgewählten Bioassays:

- Bioassayname
- Effektdetektionskategorie
- Subeffektkategorie
- Rezeptor
- Beobachtung
- System (Organismus/ Zelltyp).

Beim Auflisten der ausgewählten Bioassays wurde deutlich, dass diese hier sinnvollerweise nochmals in drei Gruppen einsortiert werden können. Das sind:

- die Gruppe der organismischen Bioassays, die apikale Endpunkte analysieren,
- die Gruppe der zellulären Bioassays, die spezifische Rezeptorbindung analysieren- als Indikatoren für spezifische Chemikalien-Rezeptor-Interaktionen,
- *in vitro*-Bioassays, die eher allgemeine Stressantworten detektieren.

Es wurde schnell deutlich, dass es nicht ohne weiteres möglich ist, Übereinstimmungen zwischen den Chemikalien-Wirkweisen und den einzelnen Effektdetektionskategorien der Bioassays zu finden. So lässt sich beispielsweise der Endpunkt Mortalität des Fischembryotestes nicht direkt mit einer bestimmten Chemikalien-Wirkweise verknüpfen. Andersherum können Herbizide, deren Wirkweise beispielsweise die Hemmung der Photosynthese ist, auch unspezifische, schädliche Effekte in nicht pflanzlichen Organismen hervorrufen, was bei der Auswahl der Bioassays bedacht werden sollte. Da eine 1:1 Zuordnung einer bestimmten Chemikalie zu einem bestimmten, potentiell responsiven Bioassay hier nicht einfach möglich ist, wurde in der Tabelle (vgl. Anhang 8) jede Chemikalie einzeln betrachtet. Bioassays, die die Wirkung einer Chemikalie potentiell detektieren sollten,

wurden dann mit einem Kreuz markiert. Bei Unsicherheiten während dieser Zuordnung wurde das Kreuz in Klammern gesetzt. Das Vorgehen ist im Folgenden beispielhaft, anhand der Aspekte die berücksichtigt wurden, erläutert.

Gibt es eine klare Übereinstimmung des Rezeptors?

Beispielsweise ist für Bisphenol A eine östrogene Wirkung bekannt. Es ist also davon auszugehen, dass Bioassays, die speziell östrogene Effekte detektieren (z. B. hER α -HeLa-9903-Assay) hier sensitiver reagieren als beispielsweise der Fischembryotoxizitätstest. Das heißt, spezifische Bioassays wurden immer dann angekreuzt, wenn eine entsprechende Wirkweise eines Stoffes beschrieben ist.

Gibt es eine Übereinstimmung bezüglich der Stoffstruktur?

Für Fluoranthen, ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff (PAK), wurde beispielsweise eine Übereinstimmung mit den Bioassays „DR-CALUX“ und „EROD Aktivitätsmessung“ markiert, da diese Bioassays zur Detektion von PAK eingesetzt werden können.

Sind molekulare Zielstrukturen/ Signalwege potentiell vorhanden?

Die Wirkweisen bestimmter Pharmaka sind nur für Säuger bekannt. Es wurde ein Kreuz in Klammern beispielsweise beim Fischembryotoxizitätstest und beim Daphnientest gesetzt, wenn die molekularen Zielstrukturen oder Signalwege in diesen Organismen potentiell vorhanden sind, über die Sensitivität oder die Beteiligung dieser Signalwege an der Ausbildung eines organismischen Schadens allerdings nichts bekannt ist.

Sind multiple Effekte zu erwarten?

Wie bereits erläutert, wirken Chemikalien oft nicht nur über eine Wirkweise. Besonders deutlich wird dies für die Gruppe der perfluorierten Chemikalien (PFCs). Für diese werden in der Literatur multiple Effekte beschrieben und es gibt Evidenzen für die Bindung dieser Stoffe an verschiedene Rezeptoren. Für einige dieser Stoffe wurde spezifisch eine Störung des PPAR-Rezeptor Signalweges beschrieben. Dies könnte möglicherweise mit dem PPAR γ -transFACTORIAL-Assay detektiert werden. Hier wäre zunächst eine systematische Untersuchung angeraten, inwieweit dieser Bioassay Stoffgruppen-spezifisch PFCs detektieren kann. Es ist denkbar, dass PFCs auch Effekte im Ames-Test oder Nrf2-Assay bzw. in den organismischen Bioassays hervorrufen, da weitere unspezifische Wirkweisen wie z. B. Nukleinsäureschädigung oder oxidativer Stress für diese Stoffgruppe beschrieben sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass prinzipiell eine kombinierte Anwendung organismischer Bioassays einen Großteil der Effekte der gelisteten Chemikalien erfassen sollte. Möglicherweise nicht erfasst würden Stoffe und Wirkweisen, die spezifisch zu einem chronischen schädlichen Effekt führen und akut nur mit entsprechend sensitiven, spezifischen Effektdetektoren erfasst werden können, wie z. B. potentiell kanzerogene Stoffe, endokrin wirksame Stoffe, neurotoxische Stoffe oder Chemikalien, die spezifisch auf Bakterien oder Pilze wirken.

Substanz	allg. Wirkweise	spezifische Wirkweise	Molekulares Target	Spezies	apikale Endpunkte			spezifische Rezeptorbindung							Stressantworten			
					akuter Immobilisierungstest	Fischebryotoxizitätstest	Algenwachstums-inhibitionstest	Imaging-PAM Assay	hER α -HeLa-9903-Assay	Anti- AR-CALUX @-Assay	GR-CALUX @-Assay	AChE-Inhibition-Assay	PPAR γ -transFACTORIAL-Assay	DR-CALUX @-Assay	EROD Aktivitätsmessung	Ames-Test	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay	
Bisphenol A (BPA)	Endokrin	Östrogen		Wirbeltiere	x	x			x									
4-iso-Nonylphenol	Endokrin	Östrogen	Östrogen-Rezeptor	Wirbeltiere	x	x			x									
Estradiol	Endokrin	Östrogen	Östrogen-Rezeptor	Wirbeltiere	x	x			x									
Estron	Endokrin	Östrogen	Östrogen-Rezeptor	Wirbeltiere	x	x			x									
tert-Oktylphenol	Endokrin	Östrogen		Wirbeltiere	x	x			x									
Carbamazepin	Ionenkanal-Modulation	Natriumkanal-Inhibition	Natriumkanal-Protein Typ 5 alpha	Säugetiere	(x)	(x)												
Lamotrigin	Ionenkanal-Modulation	Natriumkanal-Inhibition	Natriumkanal	Säugetiere	(x)	(x)												
Gabapentin	Ionenkanal-Modulation	Calciumkanal-Inhibition	Calciumkanal	Säugetiere	(x)	(x)												
Hydrochlorothiazid	Ionenkanal-Modulation		SLC12A3	Säugetiere	(x)	(x)												
Bezafibrat	Störung des Lipidmetabolismus	PPAR Rezeptor Signalweg	PPAR Rezeptor	Säugetiere	x	x							x					
Triclosan	Störung des Lipidmetabolismus	Bakterielle ENR Inhibition	"Enoyl-acyl carrier protein"-Reduktase-Enzym	Bakterien + Pilze + Pflanzen			x											
Carbendazim	Störung der Mitose/ Zellzyklus	Inhibition der Beta-tubulin Assemblierung	Tubulin	Pilze	x	x	x											
Fluoranthen	Störung der Mitose/ Zellzyklus	Immunmodulation		Wirbeltiere	x	x	x							x	x			

Substanz	allg. Wirkweise	spezifische Wirkweise	Molekulares Target	Spezies	apikale Endpunkte			spezifische Rezeptorbindung							Stressantworten			
					akuter Immobilisierungstest	Fischeembryotoxizitätstest	Algenwachstums-inhibitionstest	Imaging-PAM Assay	hER α -HeLa-9903-Assay	Anti- AR-CALUX @-Assay	GR-CALUX @-Assay	AChE-Inhibition-Assay	PPAR γ -transFACTORIAL-Assay	DR-CALUX @-Assay	EROD Aktivitätsmessung	Ames-Test	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay	
Oxazepam	Neuroaktiv	GABA Rezeptor Agonist oder Antagonist	GABA Rezeptor	Wirbeltiere	x	x												
Tris(2-chloroethyl)phosphat	Neuroaktiv	GABA Rezeptor Agonist oder Antagonist	GABA Rezeptor	Wirbeltiere	x	x												
Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphat (TDCPP)	Neuroaktiv	AChE Inhibierung	AChE	Wirbeltiere	x	x						x						
Triphenyl phosphat	Neuroaktiv	AChE Inhibierung	AChE	Wirbeltiere	x	x						x						
Diuron	Photosynthese-Inhibierung	PS II-Inhibierung	PS II	Pflanzen			x	x										
Isoproturon	Photosynthese-Inhibierung	PS II-Inhibierung	PS II	Pflanzen			x	x										
Terbutryn	Photosynthese-Inhibierung	PS II-Inhibierung	PS II	Pflanzen			x	x										
Bentazon	Photosynthese-Inhibierung	PS II-Inhibierung	PS II	Pflanzen			x	x										
Metformin	Störung der Signaltransduktion	AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	AMPK	Säugetiere	(x)	(x)												
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Synthetisches Auxin			Pflanzen			(x)											
Mecoprop	Synthetisches Auxin			Pflanzen			(x)											
2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (MCPA)	Synthetisches Auxin			Pflanzen			(x)											
Dichlorprop	Synthetisches Auxin			Pflanzen			(x)											
Perfluorooctansulfonsäureamid (PFOSA)	Atmungsketten-Inhibierung	Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung			(x)	(x)	(x)											
Perfluorohexansulfonat (PFHxS) (Anion)	Zellmembran-Störung				(x)	(x)	(x)											

Substanz	allg. Wirkweise	spezifische Wirkweise	Molekulares Target	Spezies	apikale Endpunkte			spezifische Rezeptorbindung							Stressantworten			
					akuter Immobilisierungstest	Fischembryotoxizitätstest	Algenwachstumsinhibierungstest	Imaging-PAM Assay	hER α -HeLa-9903-Assay	Anti-AR-CALUX @-Assay	GR-CALUX @-Assay	AChE-Inhibierungs-Assay	PPAR γ -transFACTORIAL-Assay	DR-CALUX @-Assay	EROD Aktivitätsmessung	Ames-Test	Nrf2/ARE-cisFACTORIAL-Assay	
Perfluorododecansäure (PFDoDA)	Zellmembran-Störung; Nukleinsäure-Schädigung				(x)	(x)	(x)										(x)	
Perfluorohexansäure (PFHxA)	Entwicklungstoxizität			Wirbeltiere	(x)	(x)	(x)											
Perfluoroheptansäure (PFHpA)	Entwicklungstoxizität	ERK/JNK Signalweg	ERK; JNK	Wirbeltiere	(x)	(x)	(x)											
Perfluorodecansäure (PFDA)	Störung des Lipidmetabolismus; Endokrin	PPAR Rezeptor Signalweg	PPAR Rezeptor	Nagetiere	(x)	(x)	(x)						x					
Perfluorooctansäure (PFOA)	Störung des Lipidmetabolismus; Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Endokrin	PPAR Rezeptor Signalweg	PPAR Rezeptor	Wirbeltiere	(x)	(x)	(x)						x					(x)
Perfluorononansäure (PFNA)	Störung des Lipidmetabolismus; Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Endokrin	PPAR Rezeptor Signalweg	PPAR Rezeptor	Wirbeltiere	(x)	(x)	(x)						x					(x)
Perfluorooctanesulfon-säure (PFOS)	Störung des Lipidmetabolismus; Zellmembran-Störung	PPAR Rezeptor Signalweg	PPAR Rezeptor	Wirbeltiere	(x)	(x)	(x)						x					
Perfluorobutanesulfonsäure (PFBS)	Oxidativer Stress				(x)	(x)	(x)											(x)
Perfluoroundecansäure (PFUnDA)	Oxidativer Stress; Zellmembran-Störung; Nukleinsäure-Schädigung, Endokrin				(x)	(x)	(x)										(x)	(x)

