
Das EU-Projekt „SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die Europäische Farbenindustrie“

Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie

Christoph Hafner, Ismene Jäger, Christoph Hercher, Rob Onderwater,
Magali Foret, Sophie Vanhulle, Christian-Marie Bols, Dietmar Schlosser,
Charles Junghans



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



“Integrated Project“ im 6. EU Forschungsrahmenprogramm

Dauer: 2004 – 2008, Budget: 9,655 M€

3 Forschungszentren

Instituto de Biologia Experimental e Tecnologia (P)
BLC Leather Technology Center Ltd (GB)
UFZ- Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH (D)

16 KMUs

BIOTransfer (Fr)
Conceria Antiba S.p.a. (I)
The Queen's University Environmental Science and
Technology Research Centre (QUESTOR) (GB)
Celabor SCRL (BE)
Eubelius (BE)
Tintoria gori manifattura lucchese lane e fibre (I)
Labor Grieder (CH)
Hydrotox Labor für Ökotoxikologie und Gewässerschutz
GmbH (D)
Instituto de Biologia Experimental e Tecnologia (P)
Lapière et Libert (BE)
Marwik Informatik (CH)
Ovelacq nvba (BE)
Rayon textile industries and foreign trade co Ltd (TR)
Setas Kimya San AS (TR)
STAB Tratamento de aguas e biotecnologia, LDA (P)
Wetlands Engineering (BE)

7 Universitäten

Maria Curie Skłodowska University (PL)
University of Naples Federico II (I)
Istanbul Technical University (TR)
Centre National de la Recherche Scientifique Laboratoire
de Bioinorganique Structurale Délégation Provence (F)
Università degli Studi di Siena (I)
Catholic University of Louvain (BE)
University of Westminster (GB)

Wissenschaftliche Koordination: Sophie Vanhulle, Catholic University of Louvain, Belgium
Administrative Koordination: Christian-Marie Bols, Wetlands Engineering, Belgium



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt “SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie“
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



„Integrated Project“ im 6. EU Forschungsrahmenprogramm

Ziele des Projektes:

- ➔ **Biotechnologische Entgiftung und Entfärbung von Färbereiabwässern**
- ➔ **Umweltfreundliche Biotechnologische Herstellung von klassischen Farbstoffen**
- ➔ **Biotechnologische Entwicklung und Herstellung neuer Farbstoffe**



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



„Integrated Project“ im 6. EU Forschungsrahmenprogramm

Warum??

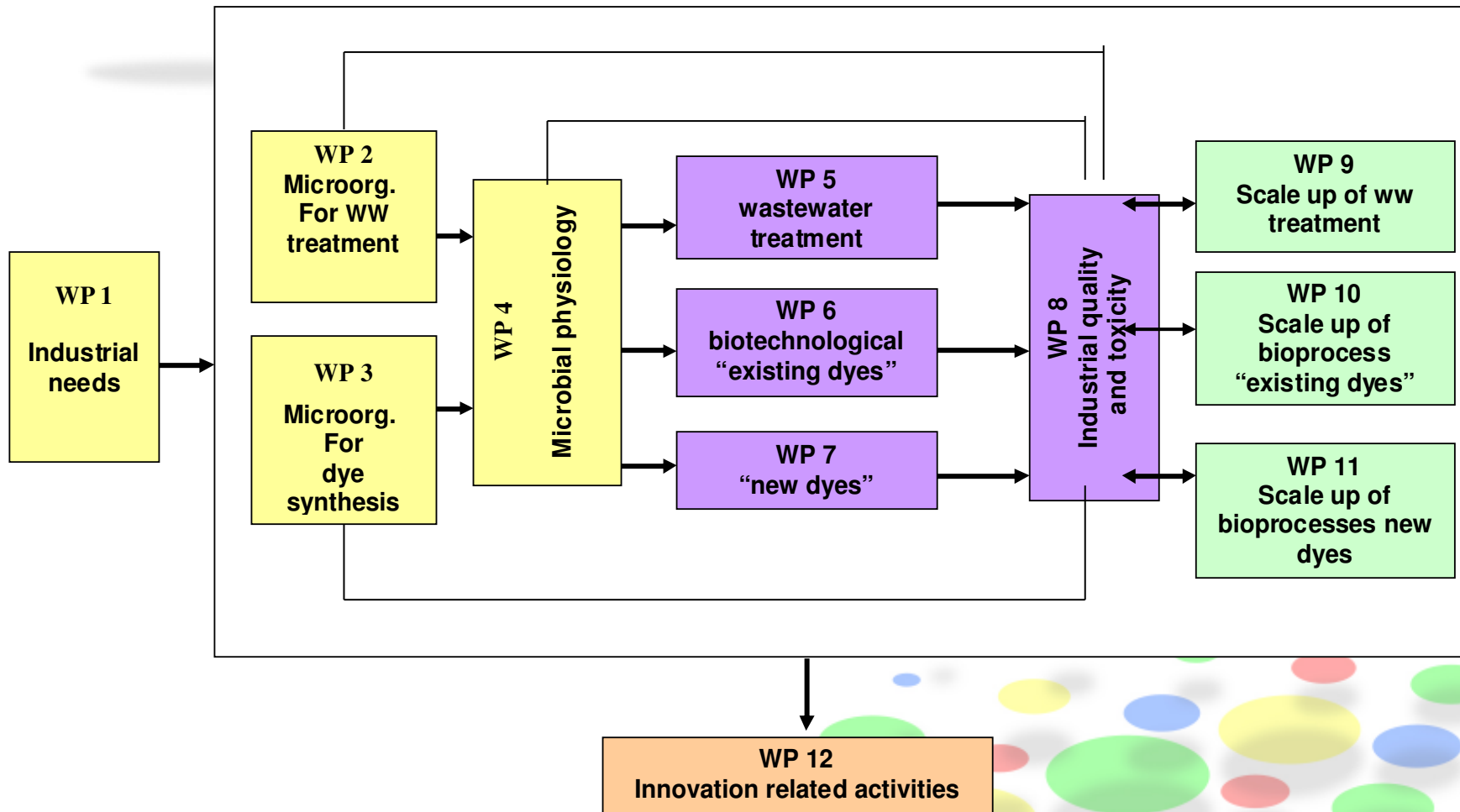
- ➔ **Europäische Farbstoffindustrie im Wettbewerb mit neuen Märkten in Asien**
- ➔ **Marktvorteile durch ökologisch nachhaltige Produktion, Umweltschutzauflagen innerhalb der EU**
- ➔ **Bekannte Toxizität von Farbstoffen**
(**Azofarbstoffe**, Directive 2002/61/EU schränkt Verwendung von Azofarben ein)
- ➔ **REACH**



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt „SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie“
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackages

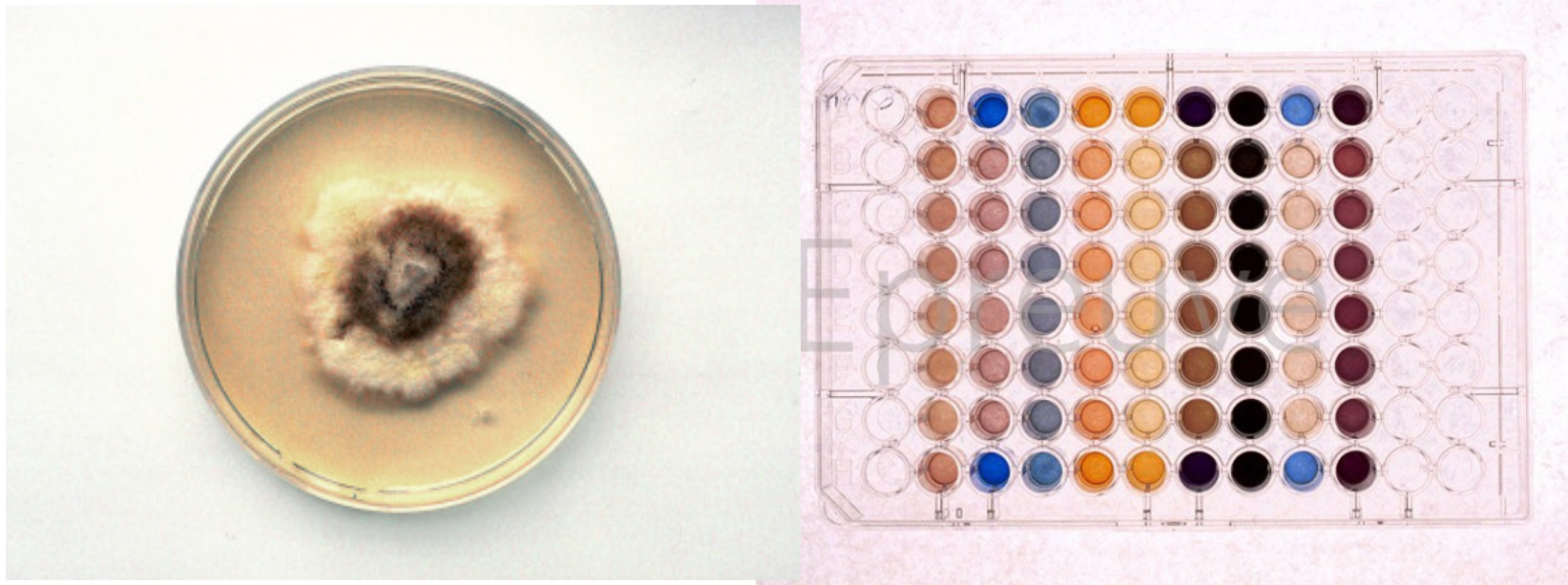


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 2

Ziel: Selektion von MO-Stämmen mit der Eigenschaft gefärbte Abwässer effizient zu Entfärben und zu Detoxifizieren

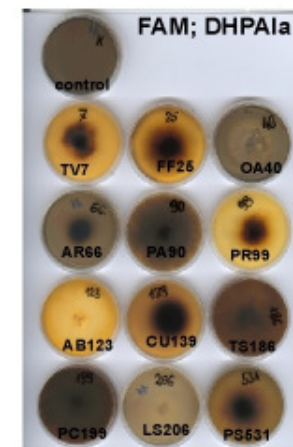
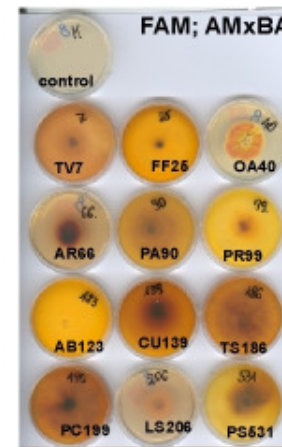
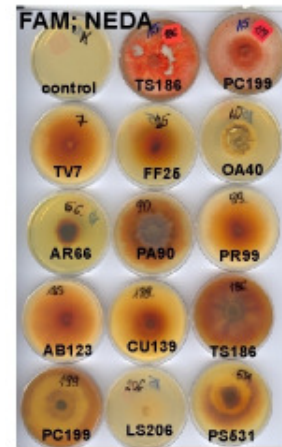
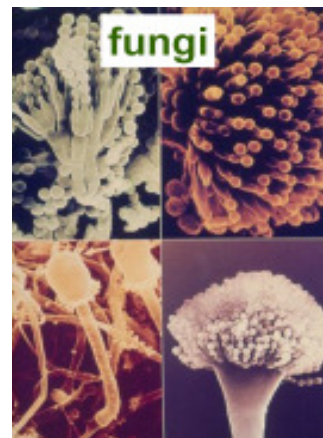
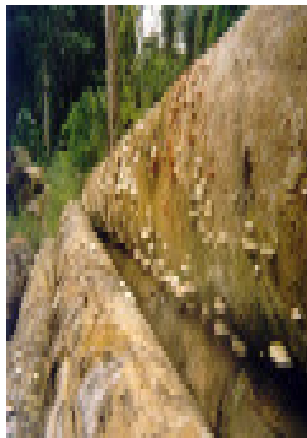


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 3

Ziel: Selektion von MO-Stämmen mit der Eigenschaft umweltfreundliche Pigmente zu produzieren

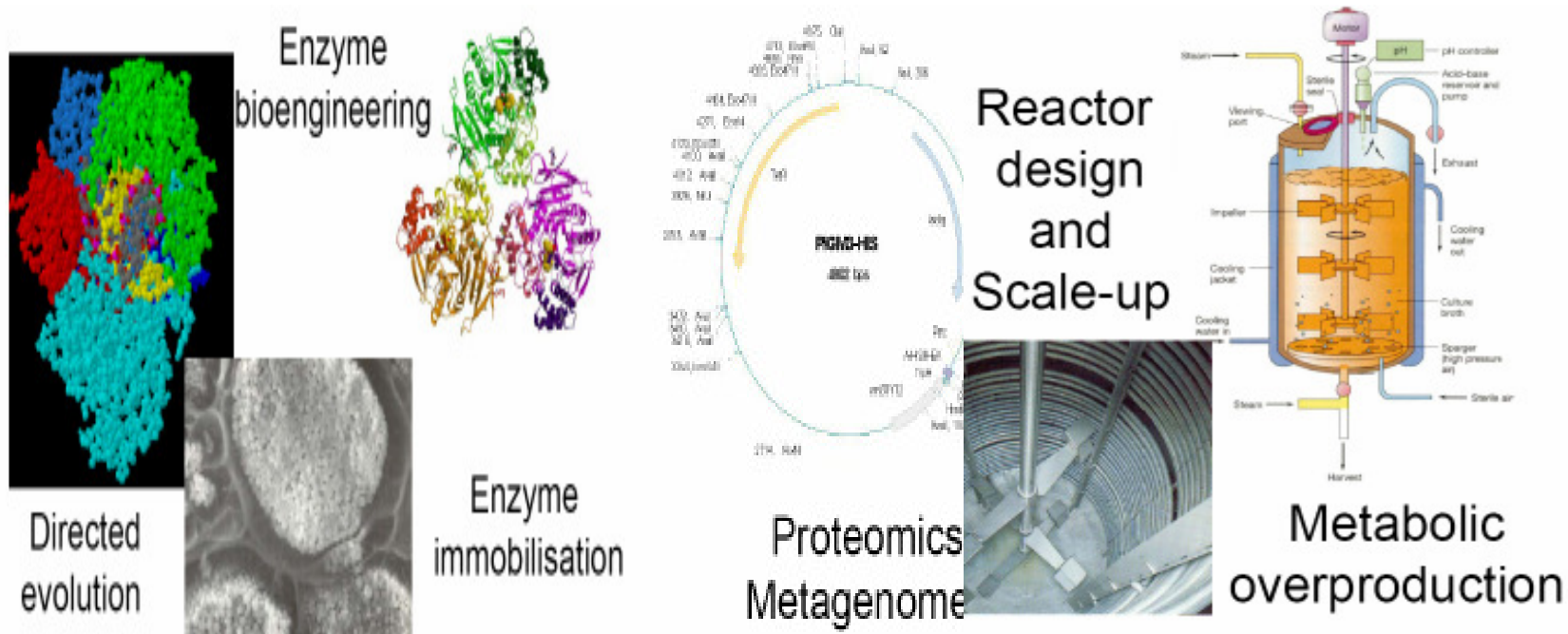


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 4

Ziel: Optimierung der Produktion ausgewählter Mikroorganismen und Enzyme



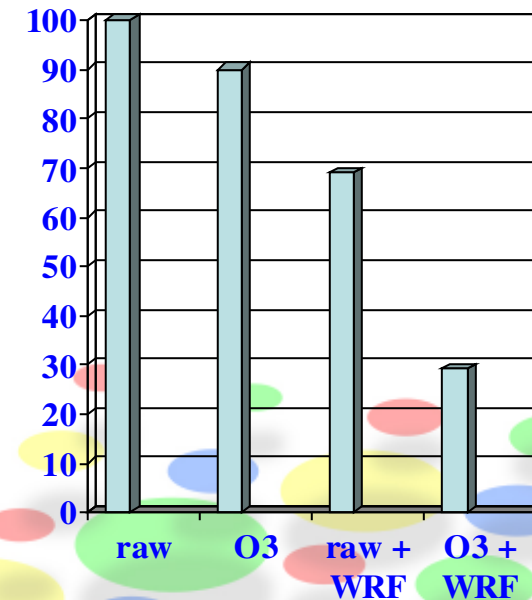
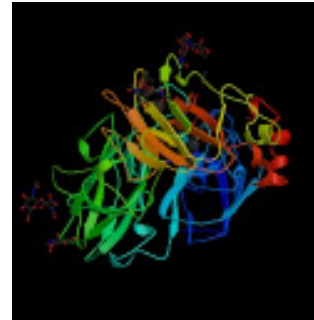
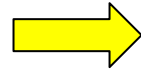
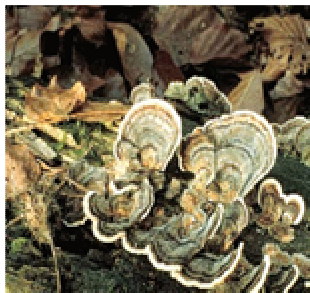
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 5

Ziel:

Entwicklung neuartiger biotechnologischer Methoden um Färbereiabwässer zu entfärben und zu detoxifizieren



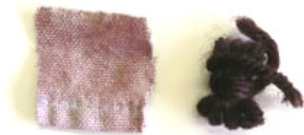
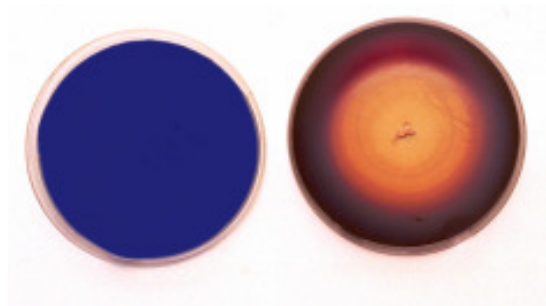
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 6

Ziel:

Entwicklung neuartiger biotechnologischer Synthesewege um vorhandene Farbstoffe herzustellen (billiger und umweltfreundlicher)



Acid dye bath for wool

Product recovery



Integration of DSP with biocatalysis



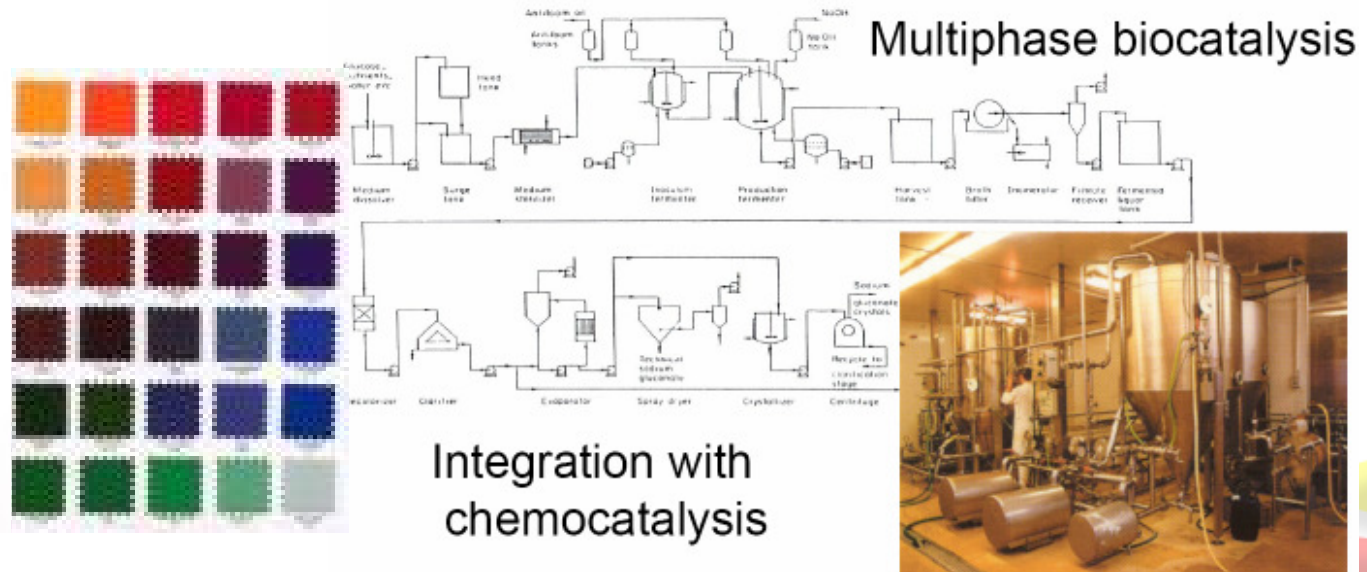
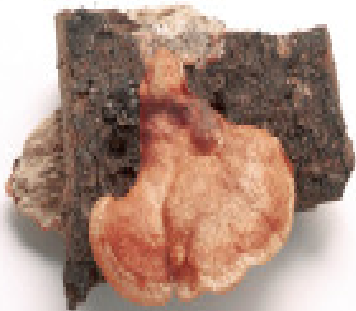
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 7

Ziel:

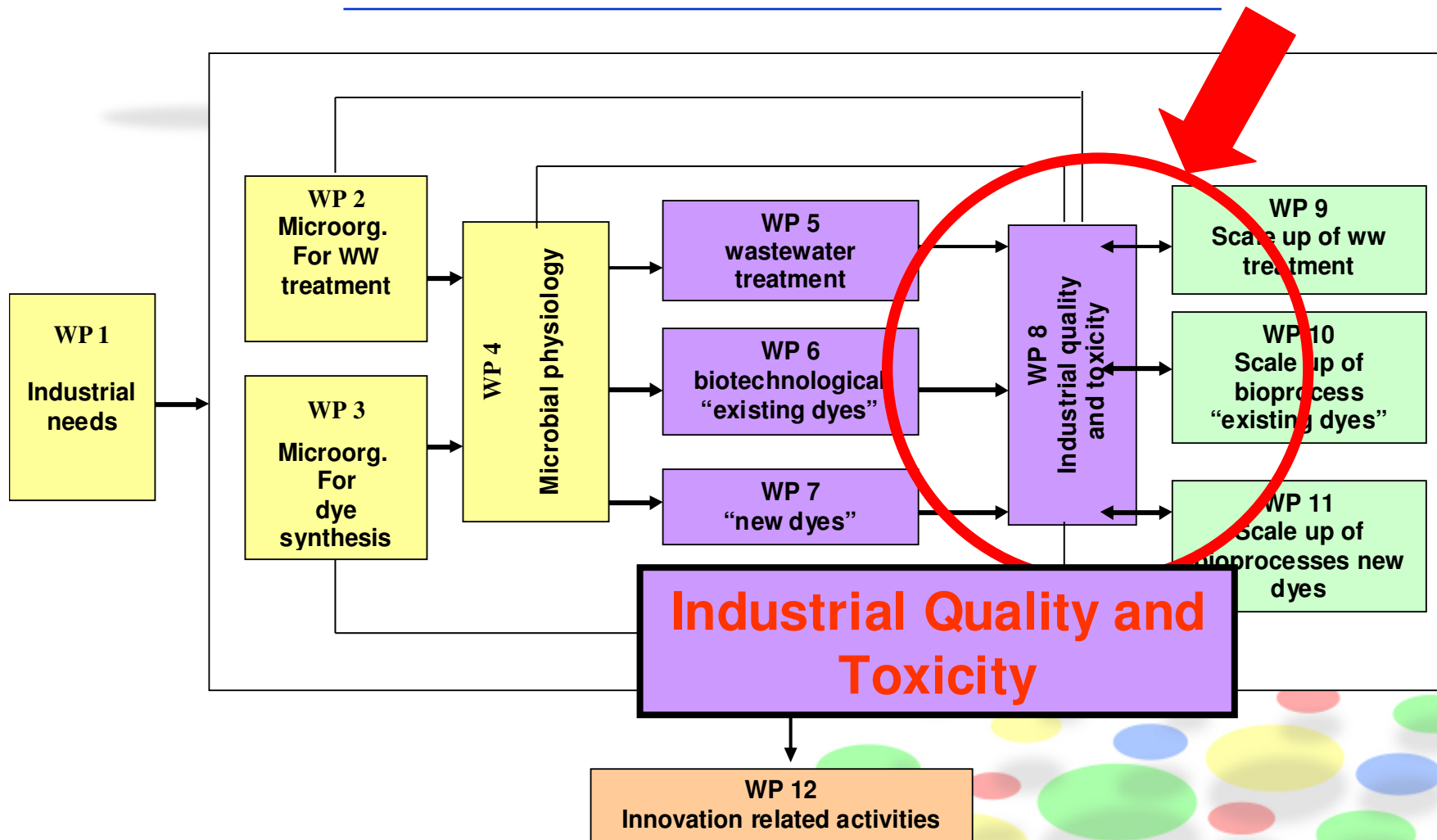
Entwicklung neuartiger Biosynthesewege / chemische Methoden, um neuartige Farbstoffmoleküle mit verminderter Toxizität und verbesserten techn. Eigenschaften herzustellen



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackages



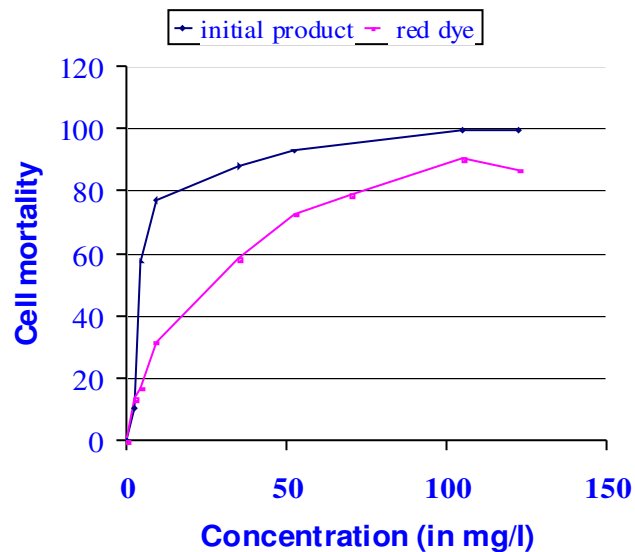
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 8

Aufgabe:

Bewertung der neu entwickelten Abwasserreinigungstechnologien bzgl. Detoxifizierung und Entfärbung und der Farbstoffe bzgl. toxischer Eigenschaften und industr. Qualität



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007

EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"

Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie

Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Workpackage 8 “Toxicology and Industrial Quality“

Anforderungen an die Testbatterie:

- ➔ **geeignet, öko-/toxikologische Wirkungen nachzuweisen
(Herausforderung: stark gefärbte Proben)**
- ➔ **Validität der Methode (Richtlinien vorhanden?)**
- ➔ **zeitliche Dauer des Tests / Kosten**
- ➔ **benötigtes Probevolumen**
- ➔ **technische Möglichkeiten in den Labors der beteiligten Partner**

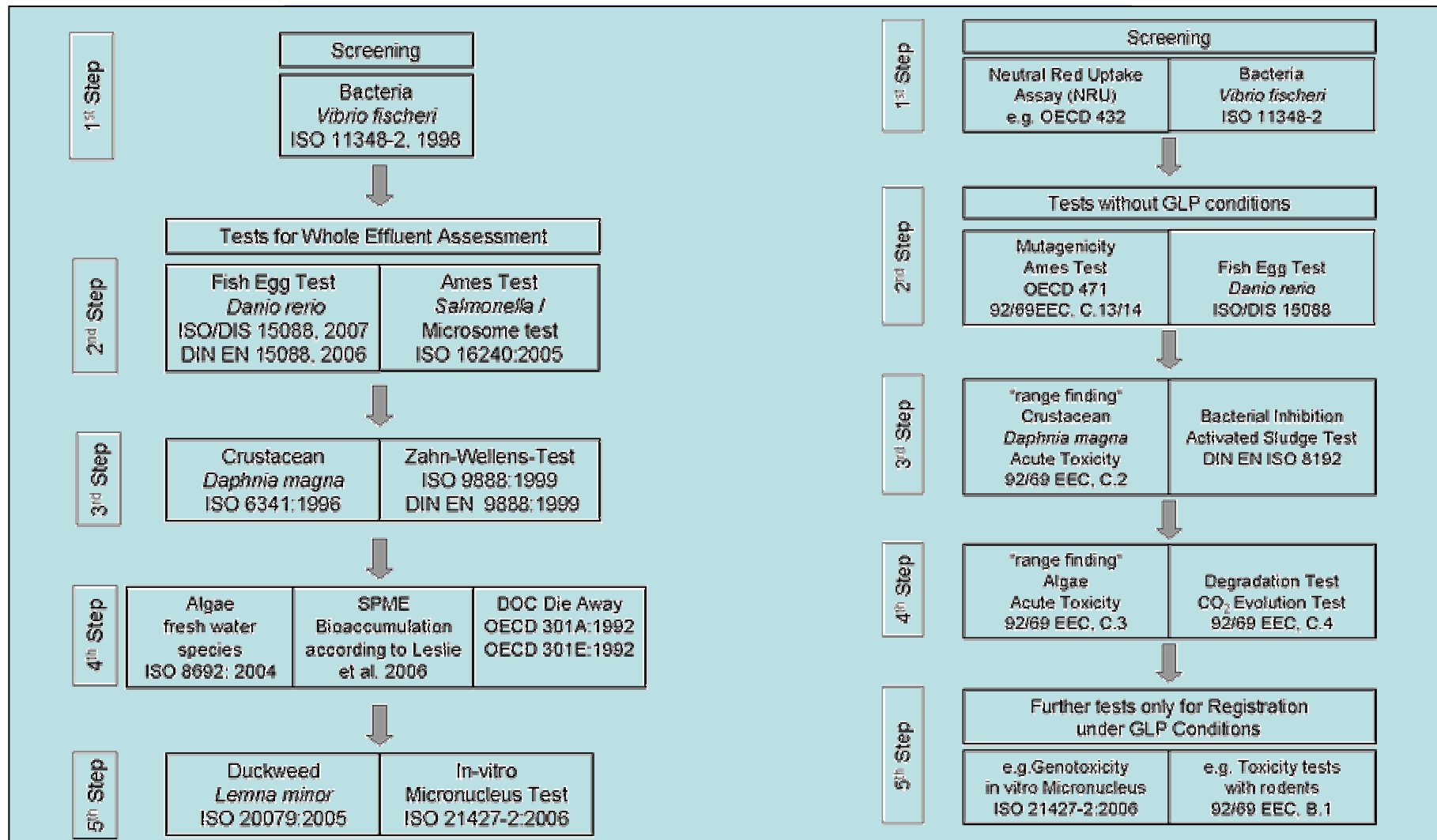


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt “SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie“
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Testbatterie "Abwasser"

Testbatterie "Neue Farbstoffe"

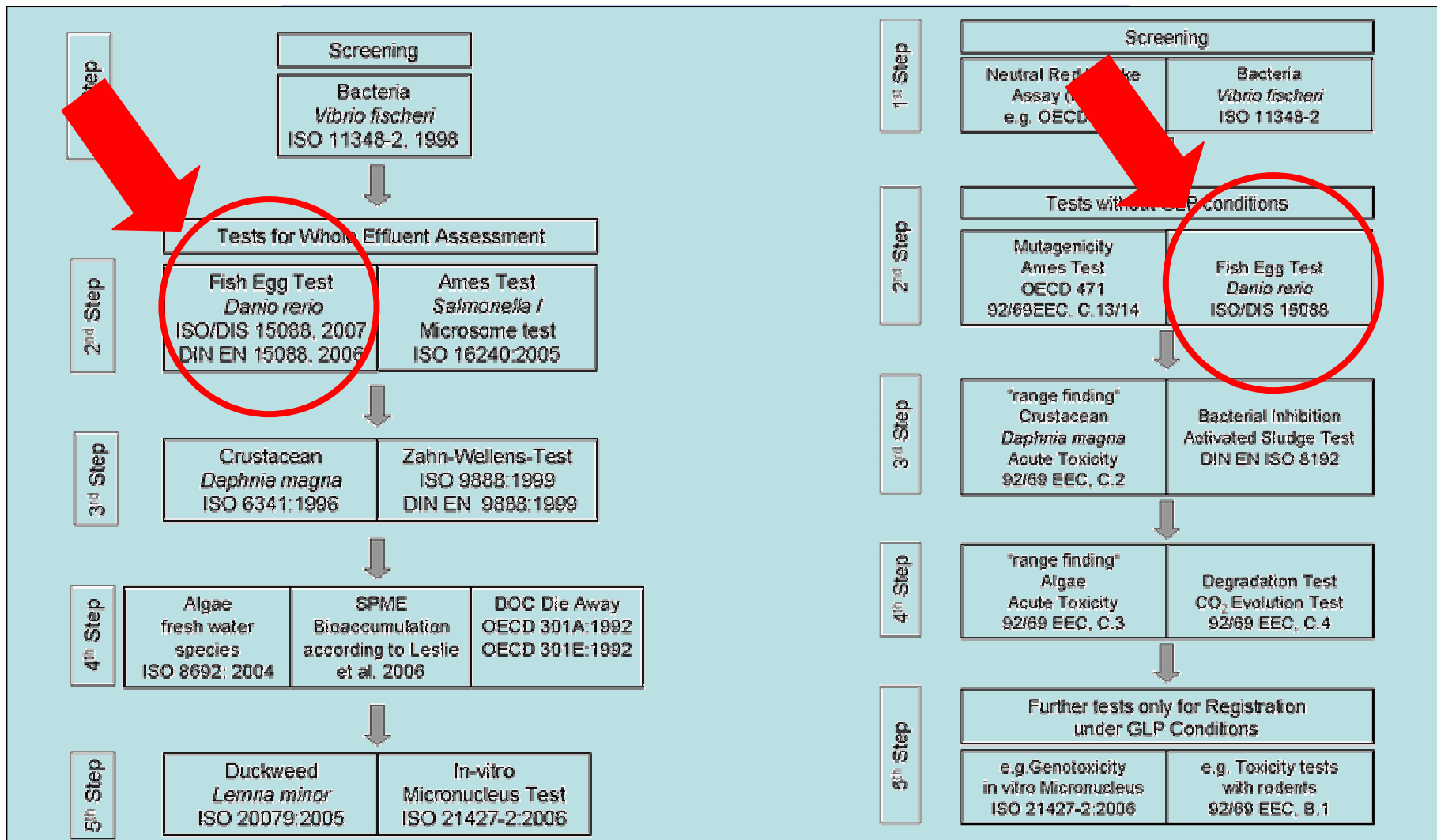


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
 EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
 Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
 Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Testbatterie "Abwasser"

Testbatterie "Neue Farbstoffe"



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
 EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
 Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
 Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Fischei-Test

DIN 38 415 – 6 (2003) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Suborganismische Testverfahren, Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen.

ISO/FDIS 15088 (24.07.2007): Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*).

OECD Draft Guideline (Mai 2006): OECD Guideline for the Testing of Chemicals; Draft Proposal for a New Guideline: Fish Embryo Toxicity (FET) Test.

OSPAR (2007): List of test protocols for whole effluent assessment

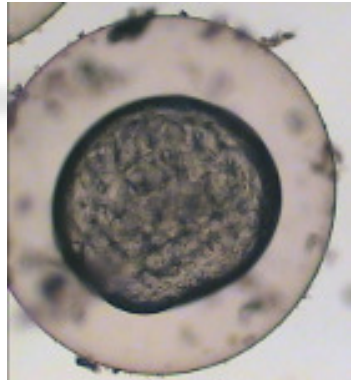
seit 2003 für die Routineüberwachung angeboten [Nr. 401 Abwasserverordnung 2004]
(Sachverständigenstelle in der Wasserwirtschaft, Fachmodul Bioteste)



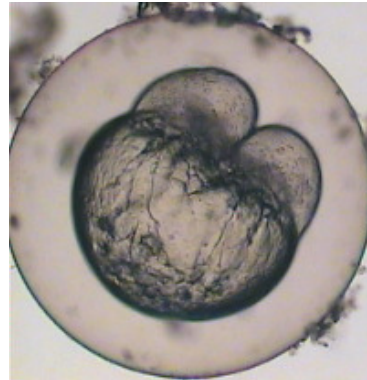
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



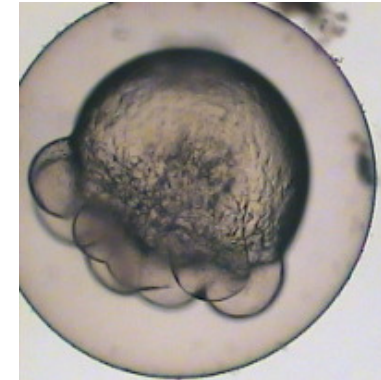
Fischei-Test



befruchtetes Ei



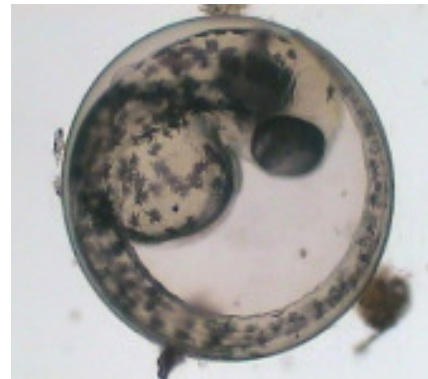
2-Zell Stadium



8-Zell Stadium



Embryo 24 h



Embryo 48 h



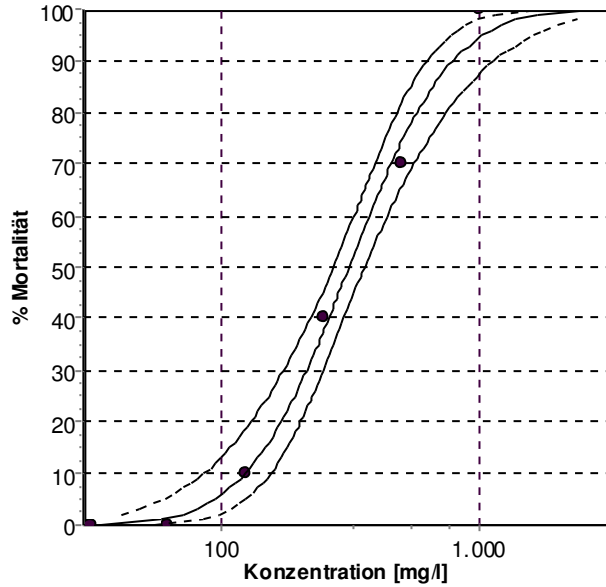
koaguliertes Ei (letal)



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.

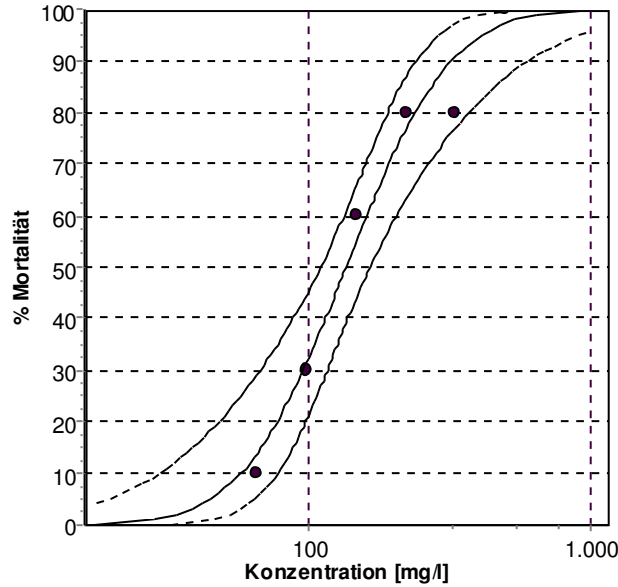


Fischei-Test



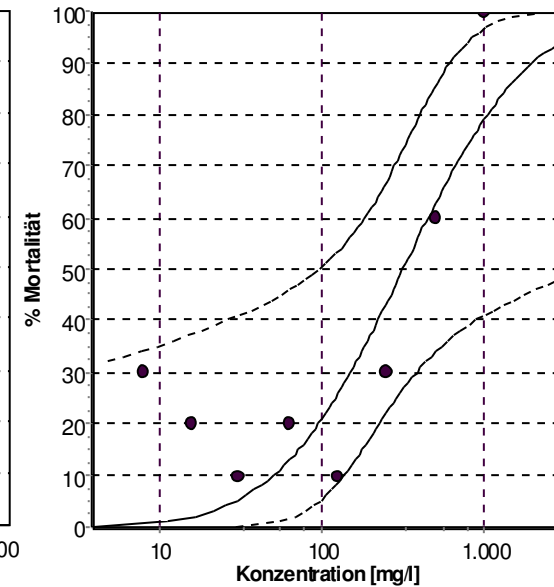
Acid Red 299

CAS 57741-47-6
EC₅₀(0-48h): 313 mg/l
 (95%-CI: 272-360 mg/l)
 EC₂₀(0-48h): 170 mg/l
 (95%-CI: 130-203 mg/l)
 EC₁₀(0-48h): 124 mg/l
 (95%-CI: 86-156 mg/l)



Direct Blue 1

CAS 2610-05-1
EC₅₀(0-48h): 136 mg/l
 (95%-CI: 110-165 mg/l)
 EC₂₀(0-48h): 77 mg/l
 (95%-CI: 49-98 mg/l)
 EC₁₀(0-48h): 57 mg/l
 (95%-CI: 30-78 mg/l)



Disperse Red 1

CAS 2872-52-8
EC₅₀(0-48h): 316 mg/l
 (95%-CI: 97-4242 mg/l)
 EC₂₀(0-48h): 96 mg/l
 (95%-CI: 0,1-226 mg/l)
 EC₁₀(0-48h): 57 mg/l
 (95%-CI: n.d.-138 mg/l)



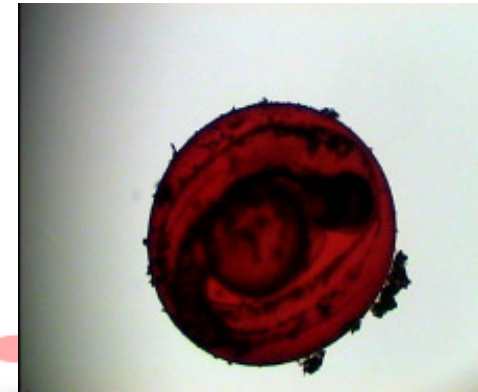
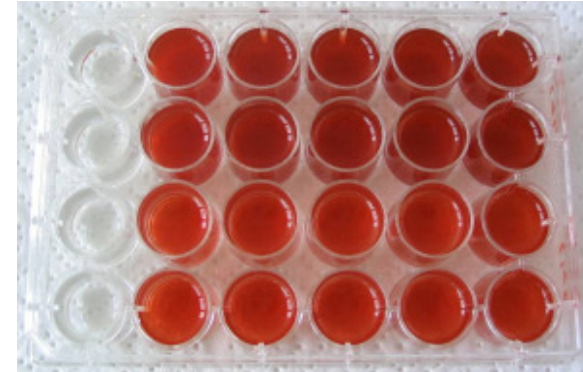
SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
 EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
 Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
 Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Fischei-Test

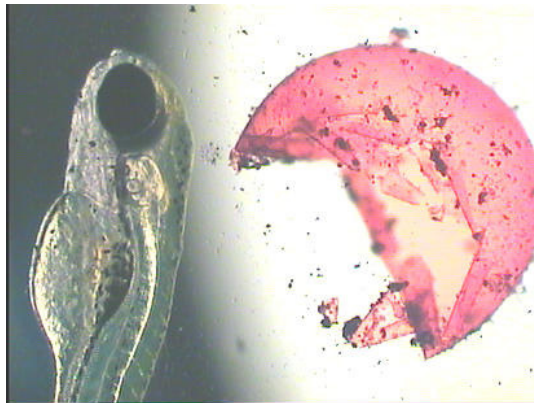
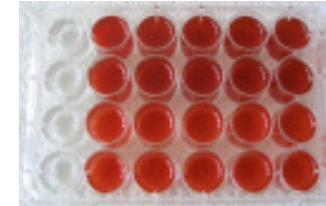
Herausforderung: Stark gefärbte Proben

- ➔ Auswertung erschwert
- ➔ Umsetzen der Eier nach 48 Stunden
Waschen der Eier
- ➔ Dechorionieren der Eier
(Aufwändig und teuer)
- ➔ Frage der Chorionpermeabilität ??????

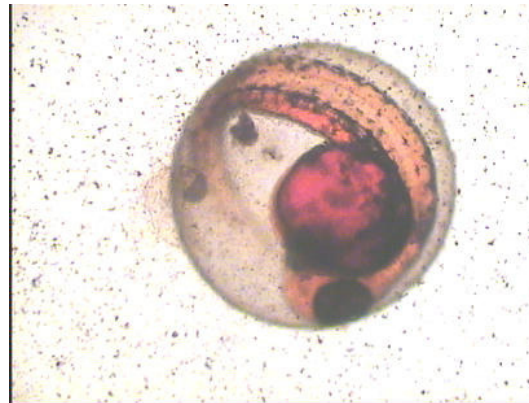


Fischei-Test

Herausforderung: Stark gefärbte Proben



Gefärbtes Chorion
kann die Farbe eindringen??
**Nicht toxisch oder nicht
verfügbar??**



Gefärbter Embryo
Chorionpermeabilität gegeben
– **nicht toxisch**

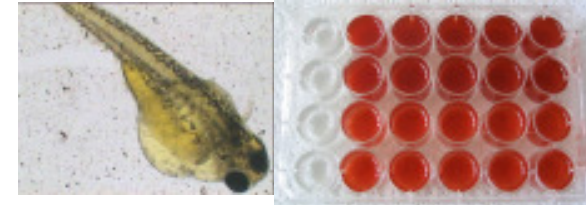


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Fischei-Test

**Herausforderung:
Stark gefärbte Proben**



Für nicht-chorionpermeable Farbstoffe:

- Zugabe von Lösungsmittler
(DMSO, Ethanol, Aceton)

➔ **Kein Effekt auf Chorionpermeabilität**

- Vorinkubation der Eier mit Pronase (Kim et al. 2006)
(4, 40 und 100 units/ml und 5 bis 60 min.)

➔ **Erste Hinweise auf verstärkte Färbung der Embryos**

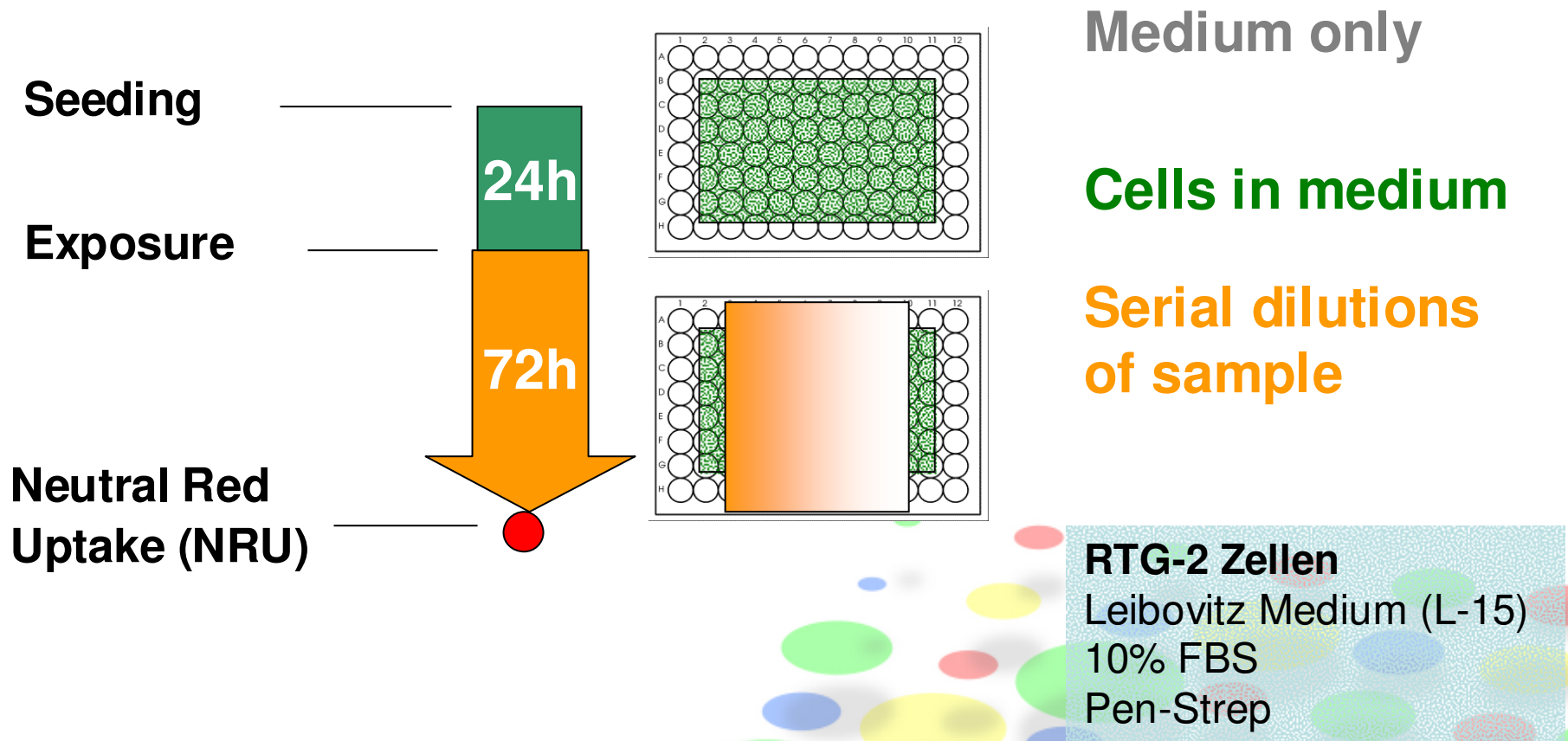


SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

NRU (Neutral Red Uptake) Test



Zytotoxizitäts-Tests

Neutral-Red-Uptake assay

Abnehmende Rotfärbung = zunehmende Toxizität

8

14

Negativ-Kontrolle

Positiv-Kontrolle

Negativ-Kontrolle

Probe A

Probe B

Probe C

Probe D

Probe E

Probe F

Abnehmende Konzentration



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-72h) NRU Assay RTG-2 |
|----------------------|------------|---|
| Disperse Dyes | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | > 126 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 175 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | 500 mg/l |
| Reactive Dyes | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 1100 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 1900 mg/l |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | 1600 mg/l |
| Direct Dyes | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | 123 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | >1330 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 61 mg/l |
| Acid Dyes | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 140 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | > 100 mg/l |

*** Wetlands Engineering, Magali Foret and Rob Onderwater (2007)



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
 EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
 Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
 Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-72h) NRU Assay <u>RTG-2</u> | EC ₅₀ (0-72h) NRU Assay <u>CaCo-2</u> |
|----------------------|------------|--|---|
| Disperse Dyes | | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | > 126 mg/l | > 1000 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 175 mg/l | 225 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | 500 mg/l | 60 mg/l |
| Reactive Dyes | | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 1100 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 1900 mg/l | 740 mg/l |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | 1600 mg/l | > 1000 mg/l |
| Direct Dyes | | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | 123 mg/l | 280 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | >1330 mg/l | 900 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 61 mg/l | > 1000 mg/l |
| Acid Dyes | | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 140 mg/l | 280 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | > 100 mg/l | > 1000 mg/l |

*** Wetlands Engineering, Magali Foret and Rob Onderwater (2007)



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
 EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
 Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
 Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-48h) | EC ₅₀ (0-72h) | EC ₅₀ (0-72h) |
|----------------------|------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Fish egg <i>Danio rerio</i> * | NRU Assay RTG-2 ** | NRU Assay CaCo-2 ** |
| Disperse Dyes | | | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | 316- 860 mg/l | > 126 mg/l | > 1000 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 1000 mg/l | > 175 mg/l | 225 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | > 1000 mg/l | 500 mg/l | 60 mg/l |
| Reactive Dyes | | | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 580 - 796 mg/l | 1100 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 917*** - > 1000 mg/l | 1900 mg/l | 740 mg/l |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | > 1000 mg/l | 1600 mg/l | > 1000 mg/l |
| Direct Dyes | | | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | > 1000 mg/l | 123 mg/l | 280 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | 136 - 250 mg/l | >1330 mg/l | 900 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 350 - 526 mg/l | 61 mg/l | > 1000 mg/l |
| Acid Dyes | | | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 38 mg/l | 140 mg/l | 280 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | 313 - 650 mg/l | > 100 mg/l | > 1000 mg/l |

* JenaBios GmbH, Thomas Günther, Christoph Hagen (2005)
Hydrotox GmbH (2006/2007)

** Wetlands Engineering, Magalie Foret and Rob Onderwater (2007)

*** Extrapolation between 0 and 60% effect



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-48h) | EC ₅₀ (0-72h) | EC ₅₀ (0-72h) |
|----------------------|------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Fish egg <i>Danio rerio</i> * | NRU Assay RTG-2 ** | NRU Assay CaCo-2 ** |
| Disperse Dyes | | | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | 316- 860 mg/l | > 126 mg/l | > 1000 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 1000 mg/l | > 175 mg/l | 225 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | > 1000 mg/l | 500 mg/l | 60 mg/l |
| Reactive Dyes | | | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 580 - 796 mg/l | 1100 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 917*** - > 1000 mg/l | 1900 mg/l | 740 mg/l |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | > 1000 mg/l | 1600 mg/l | > 1000 mg/l |
| Direct Dyes | | | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | > 1000 mg/l | 123 mg/l | 280 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | 136 - 250 mg/l | >1330 mg/l | 900 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 350 - 526 mg/l | 61 mg/l | > 1000 mg/l |
| Acid Dyes | | | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 38 mg/l | 140 mg/l | 280 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | 313 - 650 mg/l | > 100 mg/l | > 1000 mg/l |

LC₅₀ Regenbogenforelle >100 mg/l

* JenaBios GmbH, Thomas Günther, Christoph Hafner (2006)
Hydrotox GmbH (2006/2007)

** Wetlands Engineering, Magalie Foret and Rob Onderwater (2007)

*** Extrapolation between 0 and 60% effect

LC₅₀ Daten aus Sicherheitsdatenblatt des Herstellers



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-48h) | EC ₅₀ (0-72h) | EC ₅₀ (0-72h) |
|----------------------|------------|---|--------------------------|--------------------------|
| | | Fish egg <i>Danio rerio</i> * | NRU Assay RTG-2 ** | NRU Assay CaCo-2 ** |
| Disperse Dyes | | | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | 316- 860 mg/l | > 126 mg/l | > 1000 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 1000 mg/l | > 175 mg/l | 225 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | > 1000 mg/l | 500 mg/l | 60 mg/l |
| Reactive Dyes | | | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 580 - 796 mg/l | 1100 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 917*** - > 1000 mg/l | 1900 mg/l | 740 mg/l |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | > 1000 mg/l | 1600 mg/l | > 1000 mg/l |
| Direct Dyes | | | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | > 1000 mg/l | 123 mg/l | 280 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | 136 - 250 mg/l | >1330 mg/l | 900 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 350 - 526 mg/l | 61 mg/l | > 1000 mg/l |
| Acid Dyes | | | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 38 mg/l | 140 mg/l | 280 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | LC₅₀ Regenbogenforelle >500 mg/l | | |

* JenaBios GmbH, Thomas Günther, Christoph Hagen (2005)
Hydrotox GmbH (2006/2007)

** Wetlands Engineering, Magalie Foret and Rob Onderwater (2007)

*** Extrapolation between 0 and 60% effect

LC₅₀ Daten aus Sicherheitsdatenblatt des Herstellers



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

| name | CAS-No. | EC ₅₀ (0-48h) | EC ₅₀ (0-72h) | EC ₅₀ (0-72h) |
|----------------------|------------|-------------------------------|--|--------------------------|
| | | Fish egg <i>Danio rerio</i> * | NRU Assay RTG-2 ** | NRU Assay CaCo-2 ** |
| Disperse Dyes | | | | |
| Disperse Red 1 | 2872-52-8 | 316- 860 mg/l | > 126 mg/l | > 1000 mg/l |
| Disperse Blue 1 | 2475-45-8 | > 1000 mg/l | > 175 mg/l | 225 mg/l |
| Disperse Yellow 3 | 2832-40-8 | > 1000 mg/l | 500 mg/l | 60 mg/l |
| Reactive Dyes | | | | |
| Reactive Blue 19 | 2580-78-1 | 580 - 796 mg/l | 1100 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Black 5 | 17095-24-8 | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l | > 1000 mg/l |
| Reactive Red 4 | 17681-50-4 | 91 | LC₅₀ Goldorfe > 10 - 100 mg/l | |
| Reactive Yellow 81 | 59112-78-6 | | | |
| Direct Dyes | | | | |
| Direct Red 28 | 573-58-0 | > 1000 mg/l | 123 mg/l | 280 mg/l |
| Direct Blue 1 | 2610-05-1 | 136 - 250 mg/l | >1330 mg/l | 900 mg/l |
| Direct Black 38 | 1937-37-7 | 350 - 526 mg/l | 61 mg/l | > 1000 mg/l |
| Acid Dyes | | | | |
| Acid Blue 62 | 4368-56-3 | 38 mg/l | 140 mg/l | 280 mg/l |
| Acid Red 299 | 57741-47-6 | 313 - 650 mg/l | > 100 mg/l | > 1000 mg/l |

* JenaBios GmbH, Thomas Günther, Christoph Hagen (2005)
Hydrotox GmbH (2006/2007)

** Wetlands Engineering, Magalie Foret and Rob Onderwater (2007)

*** Extrapolation between 0 and 60% effect

LC₅₀ Daten aus Sicherheitsdatenblatt des Herstellers



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.

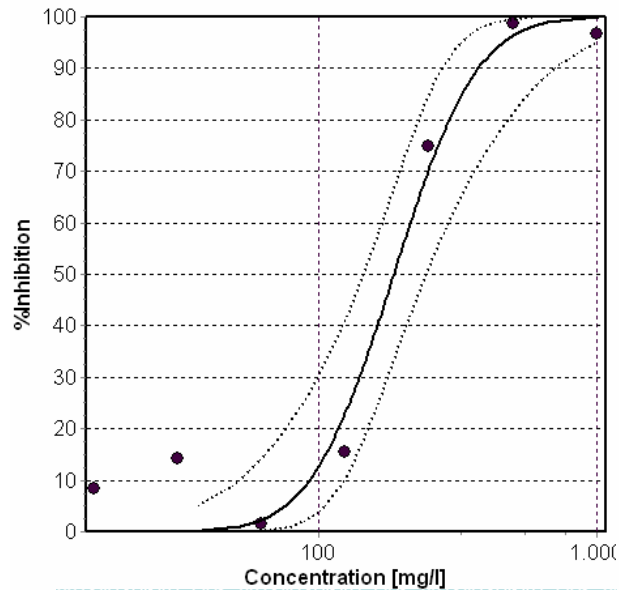


Zytotoxizitäts-Tests

Cytotox-Tests (RTgill W1) für Modellfarbstoff Acid Blue 62

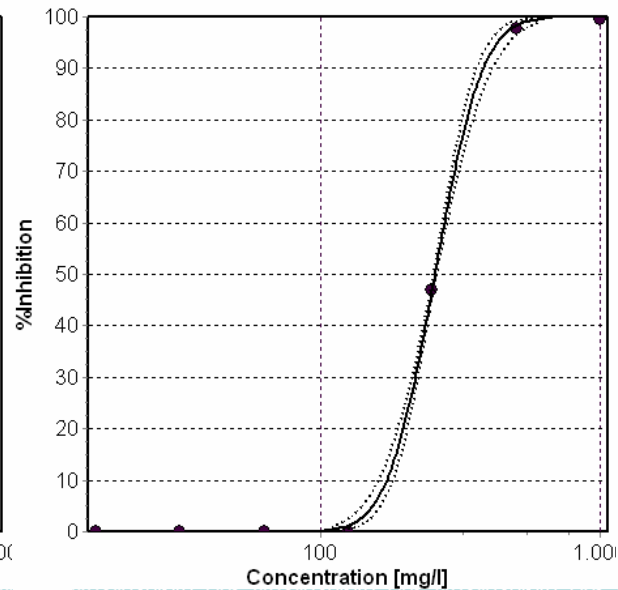
MG: 422.43
Alamar Blue

Neutral Red Uptake

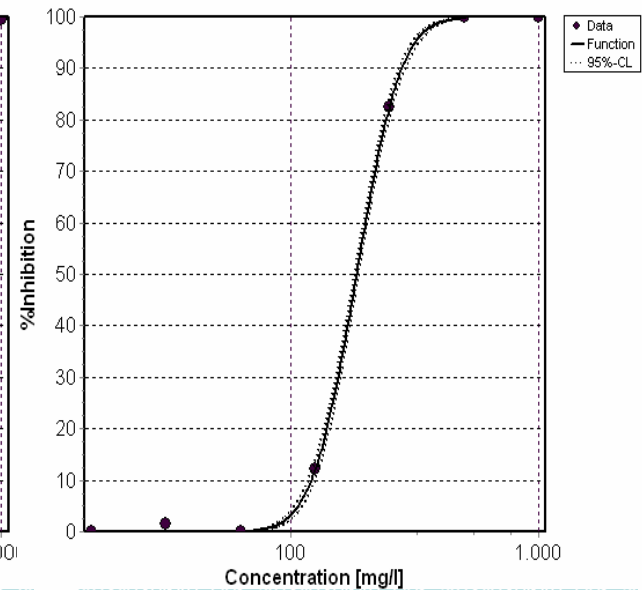


EC₅₀: 187 µM [79 mg/l]
(95%-CI 146-244 µm)

CFDA-AM



EC₅₀: 256 µM [108 mg/l]
(95%-CI 253-260 µm)



EC₅₀: 184 µM [78 mg/l]
(95%-CI 180-187 µm)

LC₅₀ Forelle: > 500 mg/l, Fischei-Test: 38,5 mg/l, NRU RTG2: 140 mg/l, NRU CaCo2: 280 mg/l

UFZ-Helmholz Zentrum f. Umweltforschung: Kristin Schirmer, Faes Al-Manssour (2007)



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007

EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"

Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie

Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

Detoxifizierung und Entfärbung von Acid Blue 62

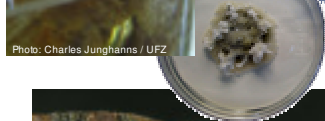
Pilzbiomasse + 500 μ M Acid Blue 62 in Wasser

1 Woche
Vorinkubation

2 Wochen
Inkubation

Fotometrische
Bestimmung der
Entfärbung (350 - 800 nm)

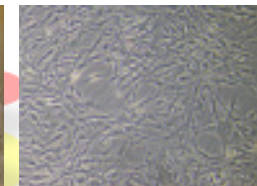
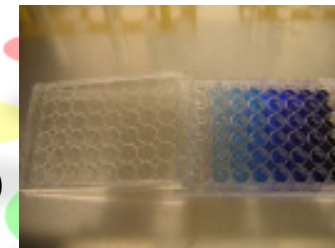
Zytoxizitätstests
- Neutralrot
- CFDA-AM
- Alamar Blue
höchste Testkonzentration
50 μ M [21 mg/l]



A: Aquatischer Pilz
(*Phoma* sp. UHH 5-1-03)



B: Weißfäulepilz
(*Trametes versicolor* DSM 11269)



RTgill W1

UFZ-Helmholz Zentrum f. Umweltforschung: Charles Junghanns, Diemar Schlosser, Kristin Schimer, Faes Al-Manssour (2007)

SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007

EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"

Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie

Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Zytotoxizitäts-Tests

Detoxifizierung und Entfärbung von Acid Blue 62

| | A UHH 5-1-03 | B DSM 11269 |
|-------------|-----------------|----------------|
| Parallele 1 | 70,8 | 81,0 |
| Parallele 2 | 66,4 | 83,3 |
| Parallele 3 | 56,7 | |
| MW | 64,6 | 82,2 |

Entfärbung [%]
500 µM Lsg

| | A UHH 5-1-03 | B DSM 11269 |
|-------------|-----------------|------------------|
| Neutralrot | Parallele 1 | Förderung |
| | Parallele 2 | Förderung |
| | Parallele 3 | Förderung |
| CFDA-AM | Parallele 1 | kein Effekt |
| | Parallele 2 | Förderung |
| | Parallele 3 | Förderung |
| Alamar Blue | Parallele 1 | kein Effekt |
| | Parallele 2 | 5% (kein Effekt) |
| | Parallele 3 | kein Effekt |

Detoxifizierung
50 µM Lsg
(testbedingt)

Aus EC₅₀ Bestimmung
62,5 µM Testlösung
Neutralrot: kein Effekt
CFDA-AM: Förderung
Alamar Blue: Förderung

UFZ-Helmholtz Zentrum f. Umweltforschung: Charles Junghanns, Diemar Schlosser, Kristin Schimer, Faes Al-Manssour (2007)



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt "SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie"
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



„Integrated Project“ im 6. EU Forschungsrahmenprogramm

Dank an

alle Co-Autoren im SOPHIED Projekt

und an

Kristin Schirmer und Faes Al-Manssour
UFZ - Helmholtzzentrum für Umweltforschung, Leipzig
Department Zelltoxikologie

Thomas Günther und Christoph Hagen
JenaBios GmbH, Jena

Europäische Kommission
Förderkennzeichen FP6-NMP2-CT-2004-505899



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt „SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie“
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.



Many Thank For Your Attention



SETAC-GLB Leipzig 12. – 14. September 2007
EU-Projekt SOPHIED – Nachhaltige Biotechnologie für die europäische Farbenindustrie“
Die ökotoxikologische in-vitro Testbatterie
Christoph Hafner et al. – Hydrotox GmbH – 79111 Freiburg i.Br.

