

9. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, durch Einsatz verschiedener biologischer Tests und Endpunkte ein Set von Biotests zu etablieren, welches zur ökotoxikologischen Diagnostik des Belastungszustands kleiner Fließgewässer einsetzbar ist.

Zunächst wurde die akute Toxizität von freiem Wasser und wäßrigen Eluaten bzw. acetonischen Extrakten von Sedimenten aus zwei Modellfließgewässern in der Nähe von Stuttgart, dem Krähenbach und der Körsch, die sich in ihrer Belastung durch Schadstoffe deutlich unterscheiden, mit Hilfe der Dauerzelllinie RTG-2 aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) ermittelt. Diese Versuche dienten einer schnellen Abschätzung des cytotoxischen Potentials der Wasser- und Sedimentproben. Durch den Einsatz wäßriger Sedimenteluate sollen oxidierende Umweltverhältnisse, wie sie bei einem Hochwasser und der damit verbundenen Remobilisierung von Sedimenten zu erwarten sind, nachgeahmt werden, während die Verwendung acetonischer Sedimentextrakte eine langfristige Exposition von Organismen mit lipophilen Substanzen durch eine kurzfristige Exposition im akuten Konzentrationbereich simulieren soll.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle eingesetzt, um Aussagen zur subakuten cyto- und genotoxischen Wirkung von Wasser- und Sedimentproben zu erhalten. Es folgte schließlich ein Vergleich von biochemischem und cytopathologischem Reaktionsmuster von Primärhepatocyten auf Belastung mit Wasser- und Sedimentproben sowie Schadstoffgemischen, die entsprechend der durchschnittlichen Belastung des stärker kontaminierten Gewässers (Körsch) zusammengesetzt waren.

Im dritten Teil wurden Frühstadien des Zebrafischlings (*Danio rerio*) eingesetzt, um natives Wasser und Sediment der beiden Fließgewässer in einem *Early Life Stage*-Test auf ihre akute bzw. subakute Embryotoxizität zu untersuchen. Neben klassischen Parametern wie Mortalität und Schlüpftrate wurden auch cytopathologische Veränderungen in der Leber der Frühstadien berücksichtigt.

Die Befunde dieser Untersuchungen führten zu folgenden Schlußfolgerungen:

- Beim Abschätzen der akuten Cytotoxizität der verwendeten Umweltproben mit Hilfe der Dauerzelllinie RTG-2 ergab nur der acetonische Sedimentextrakt nach einer Aufkonzentrierung einen positiven Befund. Dabei lagen die LOEC-Werte für RTG-2-Zellen im Neutralrottest beim Krähenbach bei 133,5 mg und bei der Körsch bei 33,3 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz. Erst nach einer Aufkonzentrierung der Sedimentproben konnte also ein cytotoxischer Effekt in dem vergleichsweise unempfindlichen Testsystem RTG-2-Zellen induziert werden, so daß in einem empfindlicheren System auch in geringeren Konzentrationen cytologische Veränderungen zu erwarten waren.
- Die Wasser- und Sedimentproben aus der Körsch verursachten bei den isolierten Hepatocyten zu allen Probennahme-Zeitpunkten sowohl biochemisch als auch ultrastrukturell stärkere Abweichungen zu den jeweiligen Kontrollzellen als die Proben aus dem Krähenbach. Bereits nach einer Belastungsdauer von 1 d und einer 1:4-Verdünnung von nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigem Sedimenteluat (25 mg Sedimenttrockengewicht auf 1 mL Testansatz) und acetonischem Sedimentextrakt (13,3 mg Sedimenttrockengewicht auf 1 mL Testansatz) waren im Vergleich zur Kontrolle zahlreiche Effekte zu beobachten. Im Vergleich zu *In vivo*-Untersuchungen bietet das eingesetzte *In vitro*-Testsystem den Vorteil, daß bereits nach einer extrem kurzen

9. Zusammenfassung

Expositionszeit (1d) Reaktionen zu beobachten waren. Weiterhin wurden nur sehr wenige Spendertiere für die Primärhepatocyten benötigt, während bei *In vivo*-Tests eine hohe Zahl von Versuchstieren erforderlich wird.

- Der als weniger belastetes Referenzgewässer für die stärker kontaminierte Körsch ausgewählte Krähenbach induzierte bei allen Probennahmen cytologische Veränderungen in den Primärhepatocyten, so daß man auch beim Krähenbach von einer konstanten Kontamination von Wasser und Sediment über die Luft ausgehen kann. Somit konnte mittels der eingesetzten Methodik das biologisch verfügbare Schadstoffpotential selbst gering belasteter Gewässer nachgewiesen werden.
- Die biochemischen Befunde ergaben nicht immer ein einheitliches Reaktionsbild der belasteten Primärhepatocyten. Dagegen zeigten die isolierten Hepatocyten ultrastrukturell bei den verschiedenen Probennahmen und Kompartimenten als auch den beiden Schadstoffgemischen oft wiederkehrende Effekte.
- Die Befunde belegen für beide Fließgewässer das höchste cytotoxische Potential im acetonischen Extrakt der untersuchten Sedimente. Durch den Einsatz einer empfindlichen Methodik konnte auch im nativem Wasser ein biologisches Schadstoffpotential nachgewiesen werden.
- Beim Vergleich der verschiedenen Probennahmen ergibt sich eine unterschiedlich starke Reaktion der Primärhepatocyten zwischen den einzelnen Terminen.
- Neben zahlreichen gemeinsamen cytologischen Veränderungen konnten auch rein krähenbach- bzw. körschspezifische Effekte in den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle beobachtet werden.
- Bei acetonischen Sedimentextrakten beider Fließgewässer konnte im Comet-Assay ein eindeutiges gentoxisches Potential nachgewiesen werden. Ein Vergleich der beiden Bäche ergab jedoch wiederum für die Körsch eine signifikant höhere Gentoxizität.
- Beim Vergleich der Schadstoffgemische und des acetonischen Sedimentextrakts der Körsch konnten deutliche Parallelen im cytopathologischen Reaktionsmuster der belasteten Primärhepatocyten festgestellt werden.
- *In vivo*- und *In vitro*-Untersuchungen mit den in den künstlichen Gemischen bzw. Körsch enthaltenen Schadstoffen bzw. Schadstoffgruppen zeigen diverse Korrelationen im cytopathologischen Reaktionsprofil von Hepatocyten.
- Ergebnisse parallel durchgeführter *In vivo*-Untersuchungen bestätigen die vorliegenden Befunde, daß klare Unterschiede zwischen den beiden Bächen hinsichtlich ihres biologischen Schadstoffpotentials zu erkennen sind.
- Die Ergebnisse belegen eine klare dosis- und zeitabhängige Beeinflussung der berücksichtigten Parameter in der Embryogenese von Zebraäbrblingen nach Exposition mit Wasser- und Sedimentproben beider Fließgewässer.
- Die expositionsbedingten Veränderungen der Embryolarvalstadien durch Wasser- und Sedimentproben der Körsch traten im Vergleich zum weniger kontaminierten Krähenbach früher auf und waren stärker ausgeprägt.

9. Zusammenfassung

- Während bei der Körsch im *Early Life Stages*-Test mit Zebraabärblingen der LC_{50} -Wert für das wäßrige Eluat bei 65 mg und für den acetonischen Extrakt bei 5 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz lag, konnte beim Krähenbach kein LC_{50} -Wert für das Kompartiment Sediment ermittelt werden.
- Die Frühstadien des Zebraabärblings zeigten deutlich unterschiedliche Reaktionen nach Exposition gegenüber nativen Wasserproben und Sedimenteluaten und -extrakten.
- Durch die Verwendung verschiedener Verdünnungen des nativen Wassers, Porenwassers, wäßriger Sedimenteluaten und acetonischer Sedimentextrakte konnten in den verschiedenen Testsystemen eindeutige positive Dosis-Wirkungs-Beziehungen dargestellt werden.

Die Kombination von Zell- und Embryolarvaltests mit biochemischen, gentoxischen und ultrastrukturellen Untersuchungen erwies sich als geeignet, ein empfindliches Instrumentarium zur öko-toxikologischen Diagnose des Belastungszustands kleiner Fließgewässer bereitzustellen. Insbesondere im Kompartiment Sediment konnte so ein hohes cyto-, gen- und embryotoxisches Potential ermittelt werden.

9. Zusammenfassung
