

3. Akute Cytotoxizität von Wasser- und Sedimentproben aus Krähenbach und Körsch

Zusammenfassung: Die akute Toxizität von nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigem Sedimenteluat und acetonischem Sedimentextrakt der beiden Fließgewässer Krähenbach und Körsch wurde über einen Zeitraum von 20 h an der RTG-2-Zelllinie mit der Neutralrotretention als cytotoxischen Endpunkt bestimmt. Dabei konnte nur im acetonischen Sedimentextrakt beider Bäche eine Vitalitätsabnahme der RTG-2-Zellen beim Krähenbach um ca. 20 % und bei der Körsch um ca. 40 % festgestellt werden. Eine S9-Supplementierung bewirkte bei den untersuchten acetonischen Sedimentextrakten beider Fließgewässer eine Dosis-Wirkungs-bezogene Entgiftung der Proben. Aufgrund des unpolaren Extraktionsmittels kann die primär nachgewiesene Cytotoxizität der acetonischen Sedimentextrakte auf lipophile Schadstoffe zurückgeführt werden.

3.1 Einleitung

In unterschiedlichen Untersuchungen an Monosubstanzen und Schadstoffgemischen wie Deponiesickerwässern und Abwässern haben sich permanente Zelllinien als sensible Detektoren zum Toxizitätsnachweis erwiesen (Braunbeck, 1993b; 1994a; Braunbeck et al., 1995; Hollert & Braunbeck, 1997; Lange et al., 1995; Segner & Lenz, 1993; Zahn et al., 1993; 1995). Während in den USA häufig die Zelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle als Modell für permanente Zellkulturen aus Fischen eingesetzt wird (Kocan et al., 1982), wurden in der Bundesrepublik Deutschland längere Zeit vorwiegend R1-Zellen aus der Leber der Regenbogenforelle (Ahne, 1985) verwendet. Ursprünglich wurde die Zelllinie RTG-2 aus einer Kultur von Gonadenzellen aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gewonnen (Kocan et al., 1979). Neben den bereits aufgeführten RTG-2 und R1-Zellen werden in Cytotoxizitätstests u.a. auch BF-2-Zellen aus dem Schwanzstiel des Amerikanischen Sonnenbarsches (*Lepomis macrochirus*; Babich & Borenfreund, 1990), GFS-Zellen aus Schuppen des Goldfisches (*Carassius auratus*; Saito et al., 1990), FHM-Zellen aus der Dickkopfritze (*Pimephales promelas*; Dierickx et al., 1991) und STE-Zellen aus embryonalen Forellen (Kocan et al., 1979) eingesetzt. In Tabelle 3.1 ist eine Auswahl wichtiger toxikologischer Arbeiten mit Dauerzelllinien aus Fischen aufgeführt.

Als Endpunkte zur Erfassung der cytotoxischen Wirkung von Monosubstanzen sowie Schadstoffgemischen werden in zahlreichen Arbeiten die Anheftung der Zellen am Substrat (Kristallviolett-Färbung; Ahne, 1985; MTT-Färbung; Mosman, 1983) und die Integrität der lysosomalen Membranen (Neutralrotretention; Borenfreund & Puerner, 1984) untersucht. Der Endpunkt Neutralrot konnte sich innerhalb von einem Jahrzehnt als einer der wichtigsten Vitalitätstests für toxikologische und ökotoxikologische Fragestellungen etablieren (Babich & Borenfreund, 1992; Barile, 1994; Borenfreund & Shopsis, 1985; Braunbeck, 1993b, 1994a, 1995; Castaño et al., 1994; Segner & Lenz et al., 1994; Schüürman & Segner, 1994; Zahn et al., 1993; 1995). Die im Neutralrottest verwendeten RTG-2 Zellen verfügen nur über eine geringe Kapazität zur Biotransformation nach Phase I (Cytochrom P450 1A; CYP 1A) und zeigen somit Unterschiede zum intakten Fisch. Die unterschiedlichen Befunde aus *In vivo*-Tests und Cytotoxizitätstests mit Fischzelllinien können zumindest teilweise auf unterschiedliche Biotransformationskapazität zurückgeführt werden (Braunbeck, 1995; Hauck & Braunbeck, 1994; Zahn et al., 1996).

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

Tab. 3.1: Toxikologische Untersuchungen mit permanenten Fischzelllinien.

Zelllinie	Fisch	Endpunkt	Referenz
RTG-2	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Zelladhäsion Zellproliferation Anaphaseaberrationen Zelltod, Chromosomenaberrationen, Stimulation der Mitose Induktion von Hitzeschockproteinen Zellproliferation, Anaphaseaberrationen Thymidin- und Uridininkorporation, DNA- und Proteinsynthese Gestörte DNA-Reparatur	Bols et al., 1985 Kocan et al., 1979 Kocan et al., 1982 Kocan et al., 1985 Kothary & Candido, 1982; Kothary et al., 1984 Landolt & Kocan, 1984 Marion & Denizeau, 1983a,b Walton et al., 1983
R1	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Morphologie, Wachstum, Zelladhäsion, Enzymaktivitäten, Trypanblauausschluß, LDH- Freisetzung Ultrastruktur Ultrastruktur, Zelladhäsion, Neutralrotretention, LDH-Freisetzung	Ahne, 1985; Ahne & Halder, 1991; Halder & Ahne, 1990 Mayer et al., 1988 Zahn, 1995
BF-2	Sonnenbarsch (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Neutralrotretention, Zellprotein, Zellablösung Neutralrotretention Neutralrotretention, Zellprotein, Zellreplikation, Uridinaufnahme Neutralrotretention Neutralrotretention Zellzahl Zelltod, Chromosomenaberrationen, Stimulation der Mitose	Babich & Borenfreund, 1987a,b Babich & Borenfreund, 1987a,b Babich et al., 1986a Babich et al., 1986b Babich & Borenfreund, 1988 Kocan et al., 1979 Kocan et al., 1985
BG/F	Sonnenbarsch (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Neutralrotretention Neutralrotretention, Mikronucleusveränderungen	Babich & Borenfreund, 1990 Babich et al., 1990
FMH	Dickkopfritze (<i>Pimephales promelas</i>)	Neutralrotretention, Zellprotein, Zellablösung Gestörte DNA-Reparatur	Babich & Borenfreund, 1987a Walton et al., 1983

Der geringen Biotransformationskapazität der Dauerzelllinien wird in vielen Testsystemen mit einer biotransformationskompetenten Proteinfraction aus der Leber (S9-Fraktion) entgegengewirkt (Metcalf et al., 1995; Miltenburger, 1992; Müllerschön & Miltenburger, 1992). Durch eine S9-Supplementierung der Tests soll eine Bioaktivierung *in vitro* simuliert werden. Besondere Bedeutung kommt Zellkultur-Experimenten im Rahmen von Screening-Untersuchungen zu, bei denen größere

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

Probezahlen bearbeitet werden müssen. Derartige Screening-Untersuchungen werden z.B. notwendig, wenn der Versuch unternommen wird, die Toxizität auf bestimmte Kompartimente (Wasser, Sediment) im Gewässer einzugrenzen. Im Rahmen dieser Arbeit soll als erste Stufe des Testests die akute Cytotoxizität der Kompartimente Wasser und Sediment beider Modellfließgewässer im Neutralrottest an der permanenten Zelllinie RTG-2 mit und ohne S9-Supplementierung abgeschätzt werden.

3.2 Ergebnisse

- Ein Vergleich der *Lösungsmittel DMSO, Aceton und Tween 80* ergab nach 20 h Belastung nur bei Tween 80 eine akute Cytotoxizität auf RTG-2 Zellen (Tab. 3.2). Selbst bei einer 0,6 % Konzentration von Tween 80 konnte keine Vitalität der RTG-2 Zellen im Neutralrottest festgestellt werden. Aufgrund seiner starken Cytotoxizität wurde Tween 80 als Lösungsvermittler für nachfolgende Untersuchungen nicht mehr verwendet.
- Nach 20 h Belastung der RTG-2 Zellen mit *nativem Wasser, wäßrigem Eluat* sowie *wäßrigem Extrakt plus 0,1 % Tween 80* aus Sediment von Krähenbach und Körsch konnte im Neutralrottest *mit und ohne S9-Supplementierung* keine akute Cytotoxizität auf RTG-2 Zellen aus der Regenbogenforelle beobachtet werden (Tab. 3.2).
- Dagegen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle nach 20 h Belastung mit *acetonischem Extrakt* aus Sediment (Lösungsmitteltausch in DMSO; höchste Konzentration des DMSO: 2 %) eine Abnahme der Vitalität der RTG-2 Zellen beim Krähenbach um ca. 20 % und bei der Körsch um ca. 40 % (Tab. 3.2, Abb.3.1).
- Nach einer *S9-Supplementierung des acetonischen Sedimentextraktes* stieg die Vitalität der RTG-2 Zellen im Assay beim Krähenbach auf ca. 95 % und bei der Körsch auf ca. 87 % an (Tab. 3.2, Abb.3.1). Das acetonische Sedimentextrakt aus der Körsch übte eine etwa doppelt so starke cytotoxische Wirkung auf die RTG-2 Zellen im Neutralrottest, wie das Sedimentextrakt des Krähenbach aus.

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

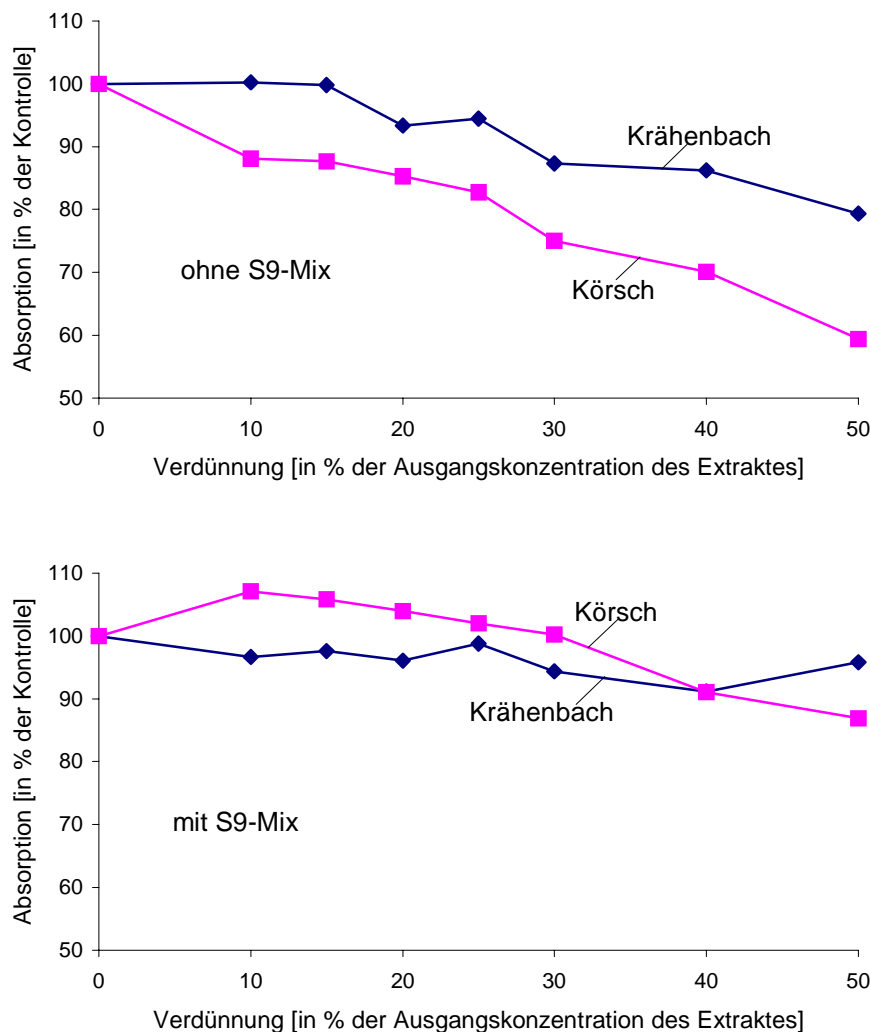


Abb.3.1: Cytotoxizität acetonischer Extrakte von Sedimenten aus Krähenbach und Körsch auf RTG-2 Zellen. 20 h Expositionsdauer, 8 Replika, Endpunkt Neutralrotretention, mit und ohne S9-Mix.

3.3 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen an RTG-2 Zellen mit dem Endpunkt Neutralrotretention wurden durchgeführt, um mit einem schnellen Screening-Test die akute Cytotoxizität der verschiedenen Fließgewässerkompartimente zu überprüfen bzw. einzugrenzen.

Die dargestellten Befunde belegen, daß eine Belastung von RTG-2 Zellen aus der Regenbogenforelle im Neutralrottest mit Proben der verschiedenen Kompartimente (natives Wasser, wäßriges Sedimenteluat mit und ohne Tween 80, acetonisches Sedimentextrakt) beider Modellfließgewässer keine akute Cytotoxizität nachweisbar ist. Erst nach einer Aufkonzentrierung des acetonischen Sedimentextraktes mit nachfolgendem Lösungsmitteltausch gegen DMSO konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die beiden Modellfließgewässer beobachtet werden. Dieses Anreicherungsverfahren von Schadstoffen ist gewöhnlich für Biotests mit Zellkulturen notwendig, um Umweltproben bei den üblicherweise kurzen Inkubationszeiten auf Schadstoffwirkungen untersuchen zu können (Helma et al., 1994a).

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

Tab. 3.2: Cytotoxizität von Wasser, verschiedenen Eluaten und Extrakten von Sedimenten aus dem Krähenbach und der Körsch auf RTG-2 Zellen.

Testsubstanz	Ausg.konz.	% Verd.	0	6,25	8,33	12,5	16,6	25	33,3	50
Aceton	10%	Vitalität (%)	100	104,6	106,2	104,8	111,5	106,8	105,9	106
		Stand.abw.	1,6	2,6	1,4	2,5	1,4	2,1	2	1,1
Tween 80	10%	Vitalität (%)	100	0	0	0	0	0	0	0
		Stand.abw.	1,6	0	0	0	0	0	0	0
Krähenbach Wasser	100%	Vitalität (%)	100	100,89	98,39	98,71	100,89	100,5	103,87	102,36
		Stand.abw.	1,03	1,92	0,59	0,92	1,79	2,54	1,93	1,93
Körsch Wasser	100%	Vitalität (%)	100	96,49	91,54	91,58	94,3	95,98	93,12	93,48
		Stand.abw.	2,17	2,79	2,48	1,19	3,34	3,5	1,48	1,54
Krähenbach KW-Eluat	100%	Vitalität (%)	100	97,93	96,38	99,72	97,01	99,23	99,12	99,02
		Stand.abw.	1,05	0,8	2,14	1,76	1,62	0,68	0,84	2,44
Körsch KW-Eluat	100%	Vitalität (%)	100	93,38	92,37	91,32	94,57	96,6	94,5	92,54
		Stand.abw.	1,88	1,63	2,75	2,87	2,33	3,55	4,37	3,5
Krähenbach KW/T80-Extrakt	100%	Vitalität (%)	100	98,7	99,1	98,3	99,5	99,1	99	98,4
		Stand.abw.	2,9	2,5	2,6	1,1	2,8	1,4	2,9	0,5
Körsch KW/T80-Extrakt	100%	Vitalität (%)	100	101	98,6	100,3	99,7	98,7	97,1	96,3
		Stand.abw.	1,7	1,6	2,8	4,3	1,3	1,3	1,2	1,5
Krähenbach Acet.Extrakt	2%	Vitalität (%)	100	100,23	99,82	93,36	94,49	87,27	86,23	79,41
		Stand.abw.	4,05	3,53	1,96	3,5	3,29	6,11	5,89	8,09
Körsch Acet.Extrakt	2%	Vitalität (%)	100	88,08	87,76	85,27	82,85	74,98	70,1	59,41
		Stand.abw.	2,23	3,43	3,33	4,74	2,02	6,02	6,17	7,9
Krähenbach Acet.Extrakt + S9	2%	Vitalität (%)	100	96,86	97,6	96,11	98,78	94,41	91,21	85,78
		Stand.abw.	1,19	2,33	3,03	2,56	3,2	4,25	3,7	3,05
Körsch Acet.Extrakt + S9	2%	Vitalität (%)	100	107,13	105,76	103,99	102	100,23	91,05	86,94
		Stand.abw.	1,1	2,73	4,41	4,92	6,84	6,54	8,53	7,62

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

Dabei nahm die Vitalität der belasteten RTG-2 Zellen beim Krähenbach um ca. 20 % und bei der Körsch um ca. 40 % ab (vgl. Strmac & Braunbeck, 1997b).

Im Gegensatz zu Untersuchungen verschiedener kommunaler und industrieller Direkt- und Indirekteinleiter in Neckar und Rhein, wo bei 65 % der untersuchten Proben eine Cytotoxizität für die nativen Wasserproben nachgewiesen werden konnte (Hollert et al., 1996) wie auch nach 48 h Belastung von RTG-2 Zellen im Neutralrottest mit acetonischen Abwasserextrakten aus kommunalen Kläranlagen, wobei zwei Proben eine akut cytotoxische Wirkung zeigten (Pawlowski, 1998), ergab eine 20 h Belastung mit nativem Wasser des Krähenbaches und der Körsch keine Abnahme der Vitalität bei RTG-2 Zellen im Neutralrottest.

Da viele Schadstoffe, insbesondere Schwermetalle und bestimmte organische Substanzen (PCB, PAH etc.) an Schwebstoffe adsorbieren und bei abnehmender Fließgeschwindigkeit im Sediment abgelagert werden (Brunström et al., 1992; Engwall et al., 1996; Glück-Macholdt & Lieser, 1988; Hellmann, 1996; Sengutta, 1993; Westrich, 1988) und es somit zu einer "Entgiftung" des freien Wasserkörpers kommt, waren die vorliegenden Befunde nicht überraschend. Im Vergleich zum acetonischen Extrakt konnte im wäßrigen Eluat beider Fließgewässer keine akute Cytotoxizität festgestellt werden, was darauf hindeuten könnte, daß der überwiegende Anteil der cytotoxischen Wirkung von lipophilen, wasserunlöslichen Substanzen ausgeht. Die acetonische Extraktion erfaßt neben dem mäßig hydrophilen Substanzen insbesondere schwerlösliche lipophile Schadstoffe (Campbell et al., 1992; Ho & Quinn, 1993; True & Heyward, 1990). Mehrere Studien belegen, daß die wäßrige Elution gegenüber der Extraktion mit Aceton das tatsächlich bioverfügbare Schadstoffpotential unterbewertet (Ahlf et al., 1991; Burton, 1991; Harkey et al., 1994). Während für die Wasserproben beider Fließgewässer keine akute Cytotoxizität ermittelt werden konnte, führte eine 20 h Inkubation mit einer Konzentration von 267 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz bei beiden Modellfließgewässern zu einer akuten Cytotoxizität auf RTG-2 Zellen. Die im Vergleich zum Krähenbach höhere Cytotoxizität des acetonischen Extraktes der Körsch weist auf eine potentiell höhere Schadstoffbelastung der Körsch hin. Diese Befunde korrelieren gut mit den Daten der chemischen Analytik (Honnen et al., 1999b). Das Körschsediment ist im Vergleich zum Krähenbach durchschnittlich stärker mit Schwermetallen, polychlorierten Biphenylen und Pestiziden belastet, während die PAH-Profile (polyaromatische Kohlenwasserstoffe) in Körsch und Krähenbach sehr ähnlich erscheinen. Die Mittelwerte im Jahresgang 1995 und 1996 liegen bei den PAH bei 12,1 µg/kg (Körsch) bzw. 3,6 µg/kg (Krähenbach) und bei den PCB bei 102 µg/kg (Körsch) bzw. 29 µg/kg (Krähenbach; Honnen et al., 1999b).

Ursprünglich war der Krähenbach als ein weitgehend unbelastetes Referenzgewässer für die stärker kontaminierte Körsch vorgesehen. Diese Annahme läßt sich in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse nicht halten. Die auf ca. 80 % zurückgegangene Vitalität der mit acetonischen Extrakt aus dem Krähenbach belasteten RTG-2 Zellen läßt sich auf die kontinuierliche Kontamination seines Sedimentes mit PAHs, PCBs aber auch in geringerem Maße mit Schwermetallen, wie Cadmium, Blei, Zink und Pestiziden zurückführen.

Da zahlreiche Schadstoffe mit ökotoxikologischer Relevanz wie PAHs und PCBs erst nach einer endogenen Aktivierung (Biotransformation) ihre cyto- und gentoxische Wirkung entfalten (Benford et al., 1988; Fry, 1982; Maron & Ames, 1983; Oesch, 1994), RTG-2 Zellen aber nur über eine geringe Kapazität zur Biotransformation nach Phase I (Cytochrom P450 1A; CYP 1A) verfügen und sich damit prinzipiell vom intakten Fisch unterscheiden (Braunbeck, 1995; Hauck & Braunbeck; 1994), wurde über eine Supplementierung mit einem biotransformationskompetenten S9-Mix aus der Leber

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

von β -Naphthoflavon und Phenobarbital induzierten Ratten die durchgeführten Cytotoxizitätstests exogen bioaktiviert. Zahlreiche Untersuchungen an Monosubstanzen und Abwasserproben ergaben, daß eine Supplementierung des klassischen Cytotoxizitätstests mit Fibrocyten durch eine S9-Fraktion aus β -Naphthoflavon/Phenobarbital-induzierten Ratten eine wichtige Erweiterung des akuten Cytotoxizitätstests darstellt (Hollert & Braunbeck, 1997). Dabei war der Effekt einer S9-Komplementierung vor allem bei Freilandproben (Abwasserproben) mit komplexer Zusammensetzung nicht vorhersagbar (Hollert & Braunbeck, 1997). Durch eine S9-Supplementierung konnte bei den untersuchten acetonischen Extrakten aus beiden Fließgewässern eine Dosis-Wirkungs-bezogene Entgiftung der Proben nachgewiesen werden. Dabei stieg die Vitalität der mit acetonischen Extrakt des Krähenbach belasteten RTG-2 Zellen auf 95 % und der mit acetonischen Extrakt der Körsch belasteten RTG-2 Zellen auf 87 % an (Strmac & Braunbeck, 1997b).

Eine ähnliche Detoxifizierung im Neutralrottest an RTG-2 Zellen durch Zugabe von S9-Mix konnte auch bei ausgewählten Abwässern von chemischer Industrie (u.a. Belastung mit Blei und Kupfer), Kunststoffindustrie und Abwässern aus einer Faßreinigung (u.a. Belastung mit Chrom und Kupfer) festgestellt werden (Hollert & Braunbeck, 1997). Von Schwermetallen ist bekannt, daß sie an die Proteine des S9-Mixes adsorbieren können, so daß die Konzentration der gelösten Schwermetalle im Medium des exogen bioaktivierten Ansatzes abnimmt (Müllerschön & Miltenburger, 1992; Oesch, 1994; Streit, 1994). Da die Sedimente beider Untersuchungsgewässer (insbesondere die Körsch) mit Schwermetallen wie Cadmium, Zink, Blei und Kupfer kontaminiert sind (Honnen et al., 1999b) und Adsorptionsprozesse bei einer Verringerung der Cytotoxizität beteiligt sein können, könnte der wahre Effekt völlig maskiert sein.

Untersuchungen an acetonischen Sedimentextrakten einer Flachwasserzone am Neckar bei Eberbach ergaben im Neutralrottest eine eindeutige Zunahme der Cytotoxizität bei RTG-2 und R1-Zellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Dabei bewirkte eine 24 h Belastung mit 250 mg extrahiertes Sedimenttrockengewicht eine 50 %- ige Vitalitätsminderung der Zellen im Neutralrottest (Braunbeck et al., 1995). Im Vergleich dazu ergab eine 20 h Belastung mit 267 mg extrahiertes Sedimenttrockengewicht der Körsch nur eine ca. 40 %- ige Vitalitätsminderung der RTG-2 Zellen im Neutralrottest.

Cytotoxizitätsuntersuchungen an acetonischen Extrakten und wäßrigen Eluaten aus Sedimenten unterschiedlicher Tiefe der Staustufe Lauffen wiesen auf ein beträchtliches Schädigungspotential für RTG-2- und D11-Zellen hin. Nach einer 72 h-Exposition von acetonischen Extrakt mit dem Endpunkt Neutralrotretention lag der NR_{50} für RTG-2 Zellen je nach Tiefe der Sedimentproben zwischen 155 - 85 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz (Hollert & Braunbeck, 1997). Eine organische Analyse des untersuchten Sediments der Staustufe Lauffen ergab je nach Tiefe der Probe eine erhebliche Belastung mit PAHs, PCBs und Schwermetallen (Müller, 1992), welche teilweise weit über den durchschnittlichen Konzentrationen der Körsch lagen.

Acetonische Extrakte aus Sedimenten vom Vorfluter aus ostdeutschen Bundesländern erwiesen sich als stark cytotoxisch auf RTG-2 Zellen im Neutralrottest. Die NR_{50} -Werte lagen je nach Sedimentprobe zwischen 0,7 und 6 mg extrahiertes Sediment pro mL Testansatz und waren somit deutlich höher cytotoxisch, als Sedimente aus dem Neckar, Krähenbach und Körsch. Die starke Cytotoxizität beruht auf der Tatsache, daß die Sedimente aus den ostdeutschen Bundesländern aus einem stark anthropogen überformten Vorfluter mit geringem Abfließvolumen stammen, der fast ausschließlich von industriellen Direkteinleitern gespeist wird.

3. Toxikologische Untersuchungen an RTG-2-Zellen

Die Befunde zeigen, daß mit akuten Cytotoxizitätstests mit RTG-2 Zellen erste Hinweise zur Belastung der Kompartimente Wasser und Sediment sowie Unterschiede zwischen den beiden Modellfließgewässer Krähenbach und Körsch geliefert werden konnten. Im Vergleich zum Krähenbach wies das acetonische Sedimentextrakt der Körsch eine höhere Cytotoxizität auf RTG-2 Zellen im Neutralrottest auf. Da nur mit dem unpolaren Lösungsmittel Aceton ein Schädigungspotential im Sediment beider Gewässer entdeckt werden konnte, läßt sich die cytotoxische Wirkung der acetonischen Extrakte im Neutralrottest auf eher unpolare Schadstoffgruppen bzw. Schadstoffe eingrenzen. Ein cytotoxischer Effekt auf RTG-2-Zellen konnte jedoch erst nach einer Aufkonzentrierung der acetonischen Extrakte erzielt werden. Bei den acetonischen Extrakten beider Fließgewässer konnte kein NR_{50} -Wert im Neutralrottest auf RTG-2 Zellen ermittelt werden. Die LOEC-Konzentration lag beim Krähenbach bei 133,5 mg und bei der Körsch bei 33,3 mg extrahiertes Sediment pro mL Testansatz. Im direkten Vergleich mit acetonischen Sedimentextrakten des Neckars (Eberbach, Staustufe Lauffen) zeigten die acetonischen Sedimentextrakte des Krähenbaches als auch der Körsch eine geringere Cytotoxizität auf RTG-2 Zellen mit Endpunkt Neutralrotretention. Diese Befunde lassen sich jedoch u.a. auf die unterschiedlichen Expositionszeiten zurückführen.

Da permanente Fischzelllinien (RTG-2-Zellen) in verschiedenen Untersuchungen im Vergleich zu isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle eine geringere Empfindlichkeit in Cytotoxizitätstests aufzeigten (Braunbeck, 1995) und eine cytotoxische Wirkung des nativen Wassers als auch wäßrigen Eluates beider Fließgewässer aufgrund chemisch analytischer Daten nicht vollkommen auszuschließen ist, wurden weiterführende Untersuchungen an isolierten Hepatocyten als sensitiveren Testsystem durchgeführt und zur Bewertung des Belastungszustandes herangezogen.