

### 7. Embryotoxizität von Wasser und Sediment

**Zusammenfassung:** Um die Wirkung von Wasser und Sediment der beiden Modellfließgewässer Krähenbach und Körsch auf die Embryogenese von Fischen zu untersuchen wurden in einem Early Life Stages-Test Frühstadien des Zebraäbrblings für 96 h mit nativem Wasser, wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt beider Fließgewässer exponiert. Eine 96 h Belastung der embryolarvalen Zebraäbrlinge mit wäßrigen Eluaten und acetonischen Extrakten induzierte vor allem bei der Körsch deutliche makroskopische Veränderungen der Tiere. Während eine 96 h Exposition der Frühstadien mit nativem Wasser keine exogenen Effekte bewirkte, zeigten ultrastrukturelle Untersuchungen in der Leber der belasteten Larven zeit- und dosisabhängige cytopathologische Veränderungen bei beiden Fließgewässern. Dabei traten die Effekte in der Leber Körschwasser exponierter Larven früher und stärker auf oder waren körschspezifisch. Die vorliegende Untersuchung belegt die Eignung von ELS-Tests mit Zebraäbrblingen zum Nachweis des embryotoxikologischen Potentials von komplex belasteten Umweltproben. Die Befunde können einen erklärenden Beitrag leisten zur Frage, weshalb es in der Körsch in den letzten Jahren zu keiner Reproduktion der Bachforelle (*Salmo trutta*) kam.

#### 7.1 Einleitung

Untersuchungen an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle hatte ergeben, daß nach Belastung mit Wasser- und Sedimentproben von Krähenbach und Körsch ein umfangreiches Spektrum an biochemischen und ultrastrukturellen Reaktionen während des gesamten Probezeitraums zu beobachten war (vgl. Kapitel 4). Diese Effekte waren oft unspezifischer Natur und spiegelten eine diffuse Belastung in den untersuchten Gewässern wider. Dabei traten cytologische Effekte bei Umweltproben aus der Körsch (stärker kontaminiertes Fließgewässer) früher und deutlich stärker auf. Veränderungen konnten auf molekularer- und zellulärer Ebene in den vorangehenden Kapiteln direkt auf eine Belastung mit Wasser- und Sedimentproben der beiden Modellfließgewässer zurückgeführt werden. Nun stellte sich die Frage nach möglichen Auswirkungen der kontaminierten Kompartimente auf der Ebene von Individuen und Populationen, da Freilanduntersuchungen eine fehlende Reproduktion von Bachforellen (*Salmo trutta*) in der Körsch aufzeigten (Triebskorn pers. Mitteilungen).

Frühembryonale Lebensstadien von Fischen werden schon seit längerem als empfindliches *In vivo*-Testsystem herangezogen, um die Wirkung umweltrelevanter Schadstoffe zu testen (*Early Life-Stages* Tests ELS; McKim, 1977; 1975; Birge et al., 1979; Bresch, 1991; Dave & Xiu, 1991; Fent & Meier, 1992; 1994; Görge & Nagel, 1990; Nagel, 1988; Nagel et al., 1991; Oulmi & Braunbeck, 1996; Strmac & Braunbeck, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß zahlreiche Substanzen ihre toxische oder teratogene Wirkung nur in einer sensiblen Phase während der Organdifferenzierung des Fischembryo neu entfalten (Fent & Meier, 1992; Görge & Nagel, 1990; Sander & Baumann, 1983). Da bei Vertebraten Differenzierungsprozesse bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung stattfinden, können die Schadstoffbelastung sowie die nachfolgende Beobachtungsperiode auf sehr frühe Entwicklungsphasen der Embryonen beschränkt werden. Weiterhin ergaben verschiedene *In vivo*-Tests an Fischembryonen und -larven, daß diese über eine vergleichbare oder größere Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen verfügen als adulte Tiere (Bresch, 1991; Dave & Xiu, 1991; Fent & Meier, 1992, 1994; Görge & Nagel, 1990; McKim, 1977, 1975; Nagel et al., 1991; Woltering, 1984).

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

*Early Life Stage*-Tests bieten aus ökonomischer, wissenschaftlicher und toxikologischer Sicht sowie unter dem Aspekt des Tier- und Naturschutzes gegenüber konventionellen Tierversuchen folgende Vorteile:

- (1) *Verkürzung der Expositionsdauer* und somit eine kürzere Belastung für die Versuchstiere als auch ein geringeres Risiko technischer Probleme während des Versuches.
- (2) *Probleme der Ver- und Entsorgung* von kontaminierten Umweltproben bzw. Schadstofflösungen sind aufgrund der kleinen Volumina beim ELS-Test im Vergleich zum konventionellen Fischtest minimal. Insbesondere flüchtige, krebserregende und teratogene Substanzen sind in Durchflusssystemen, wie sie bei konventionellen Fischtests üblich sind, ausgesprochen schwierig und nur mit erheblichem technischen und finanziellem Aufwand zu untersuchen. Außerdem ist das Risiko einer Kontamination des Labors bzw. Belastung des Personals beim ELS-Test beträchtlich reduziert.
- (3) *Statistische Überlegungen*: Kleine tropische Fische wie der Zebraäbrbling (*Danio rerio*) liefern ganzjährig große Mengen an Eiern. Infolgedessen ist eine gute statistische Auswertung der Befunde möglich.
- (4) *Tierschutzgedanke*: Die Durchführung von ELS-Tests bieten den Vorteil einer Toxizitätsprüfung an einem nicht oder nur eingeschränkt schmerzfähigen Testsystem. Weiterhin ist die unmittelbare Schadstoffexposition der Tiere zeitlich stark begrenzt. Schließlich ist das Auftreten toxischer Effekte innerhalb eines kurzen Zeitraums gegeben, und selbst geringste Schadstoffkonzentrationen lassen sich aufgrund der Ausnutzung der empfindlichen Entwicklungsphasen nachweisen.
- (5) *Naturschutzgedanke*: Die für den ELS-Test verwendeten Fischarten wie Zebraäbrbling und Japanischer Reiskärppling (Medaka, *Oryzias latipes*) lassen sich im Labor problemlos nachzüchten. Eine Entnahme der Tiere aus der Natur ist also nicht erforderlich.
- (6) *Ökonomische Überlegungen*: Im Vergleich zu konventionellen Tierversuchen sind Embryonalvaltests mit Fischen zeit-, raum-, personal- und damit kostengünstiger als Biotests mit ausgewachsenen Fischen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der für ELS-Tests spricht, ist die Tatsache, daß bei Untersuchungen mit Sedimenten nur begrenzte Mengen an Eluat und Extrakten erhältlich sind, so daß sich eine ökotoxikologische Prüfung auf Testsysteme beschränkt, die nur wenig Volumen benötigen.

Aufgrund der zahlreichen Vorteile des Zebraäbrblings wurde er für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt und in einem *Early Life Stage*-Test mit Wasser- und Sedimentproben der beiden Modellfließgewässer Krähenbach und Körsch für 96 Stunden belastet. Dabei werden neben externen Parametern (Mortalität, Schlüpftrate, Emryonalentwicklung) auch interne cytologische Biomarker (ultrastrukturelle Veränderungen der Leber) berücksichtigt.

Ziel dieser Untersuchung war die Entwicklung einer verfeinerten Form des ELS-Tests zum Monitoring von komplexen Schadstoffgemischen (natives Wasser und Sediment). Daneben sollte eine ökotoxikologische Bewertung der Belastung der beiden kleinen Fließgewässern vorgenommen werden, insbesondere im Hinblick auf die unterschiedliche Belastung der beiden Gewässer (Honnen et al., 1999b) und es in Folge zu keiner Reproduktion der Bachforellen (*Salmo trutta*) in der Körsch kommt. Schließlich werden die ermittelten Befunde mit den *In vitro*-Ergebnissen verglichen und eine Bewertung der Empfindlichkeit sowie die Eignung von embryonalen Zebraäbrblingen als Testsystem zur integrierten Bewertung der Belastung von Fließgewässern allgemein durchgeführt.

### 7.2 Ergebnisse

#### Makroskopische Befunde:

##### 7.2.1 Kontrolle (Kunstwasser, DMSO)

Zwischen der Kunstwasser-Kontrolle und DMSO-Kontrolle konnte makroskopisch kein Unterschied festgestellt werden.

Die Überlebensraten der beiden Kontrollen zeigten nur minimale Unterschiede. Nach 96 h hatten 89,1 % der Tiere aus der Kunstwasser-Kontrolle (Abb. 7.1, 7.4) und 95,9 % der DMSO-Kontrolle überlebt (Abb. 7.2, 7.5). Die Kontrolltiere waren bereits am dritten Expositionstag des Versuches, d.h. im Alter von 96 Stunden zu 100 % geschlüpft (Abb. 7.1, 7.2).

Im Alter von 96 Stunden war der langgestreckte Körper der Jungfische in Kopf-Kiemen-Brust-Bauch- und Schwanzregion gegliedert (Abb. 7.1, 7.2). Der deutlich vom restlichen Körper abgesetzte Kopf trug lateral zwei große, dunkel pigmentierte Augen. Der endständig am Kopf gelegene Mund war klar zu erkennen. Eng hinter dem Kopf befand sich, gefolgt von den seitlich orientierten Brustflossen, die Kiemenregion mit den Kiemenbögen bzw. Kiemenspalten (Abb. 7.1, 7.2). Die Bauchregion war nur noch in geringem Maß aufgewölbt, und der Dottersack war teilweise resorbiert. In Aufsicht war die silbrige Schwimmblase gut zu erkennen. Etwa zwei Drittel des langgestreckten Körpers nahm der schlanke Schwanz ein. Dieser war dorsal und ventral von einem Flossensaum umgeben. Neben den dunkel pigmentierten Augen traten deutlich zwei pigmentierte Längsbinden auf der Körperober- und unterseite hervor. Die Tiere bewegten sich bei Störung meist schnell und zielgerichtet von der Reizquelle weg.

##### 7.2.2 Belastung mit wäßrigen Sedimenteluat aus dem Krähenbach und der Körsch

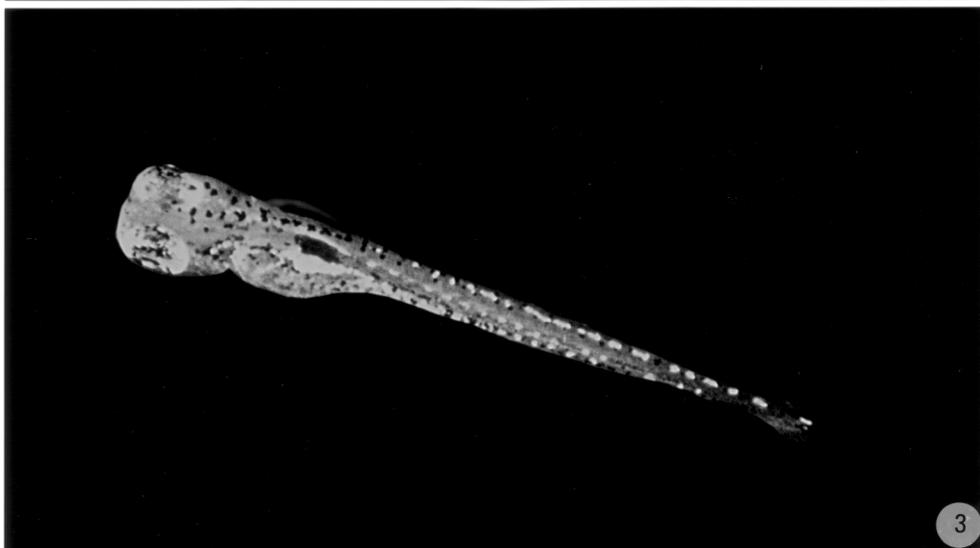
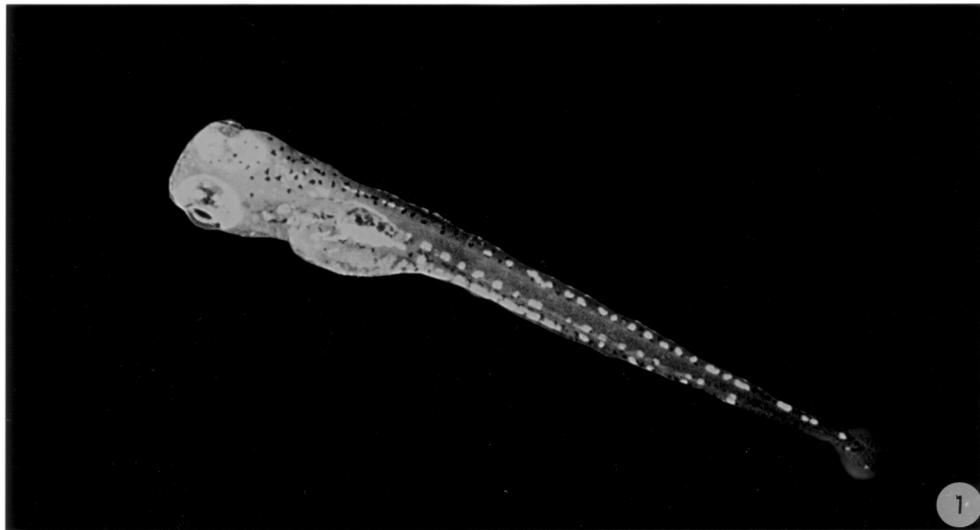
Die mit wäßrigen Sedimenteluat aus dem Krähenbach belasteten Tiere zeigten im Vergleich zur Kunstwasser-Kontrolle keine äußerlichen Unterschiede (Abb. 7.3). Jedoch konnte man in allen untersuchten Krähenbach Eluat Konzentrationen (1:1, 1:2, 1:4 Verdünnung) im Vergleich zur Kontrolle einen leichten Rückgang der Überlebensrate bei den exponierten Tieren beobachten (Abb. 7.4). Die Überlebensrate betrug nach 96 h Exposition bei dem unverdünnten Krähenbach Sedimenteluat 81,6 %, bei der 1:2 Verdünnung 70,8 % und bei der 1:4 Verdünnung 80,9 % (Abb. 7.4).

---

Folgende Seite

Abb. 7.1 – 7.3. Kontrolle Kunstwasser und DMSO, wäßriges Eluat aus Krähenbach Sediment. Die 4 d alten *Danio*-Larven haben einen langgestreckten Körper mit einem deutlich abgesetzten Kopf. Dem Kopf folgt die Kiemen- und Brust-Bauchregion. Die Schwimmblase ist bei Aufsicht in der Brust-Bauchregion deutlich zu erkennen (Abb. 7.1 – 2). Die mit wäßrigem Eluat aus Krähenbach Sediment belasteten Larven zeigten nach 4 d keine makroskopischen Unterschiede zu den Kontrolltieren (Abb. 7.3).

Abb. 7.1: Kontrolle Kunstwasser, 4 d x 630; Abb. 7.2: Kontrolle DMSO, 4 d x 700; Abb. 7.3: Verdünnung 1:1 Krähenbach Eluat, 4 d x 630.



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

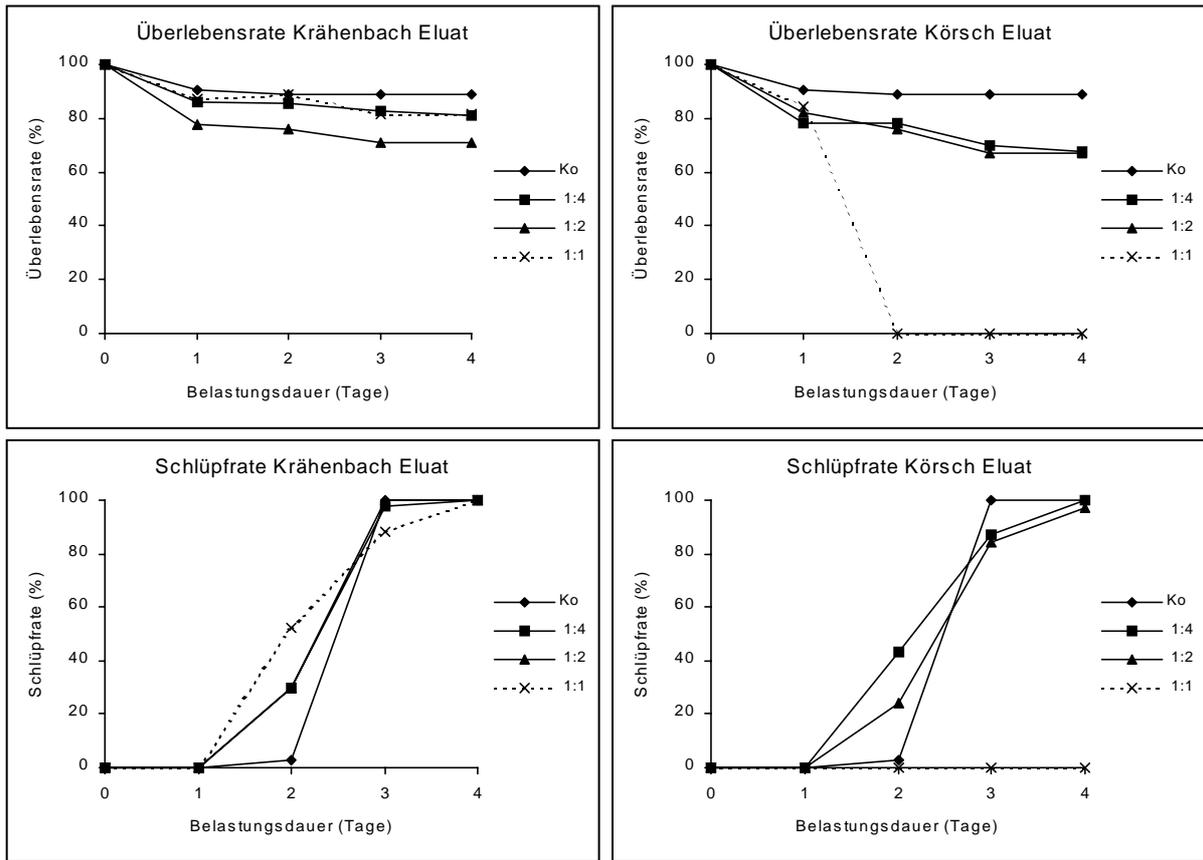
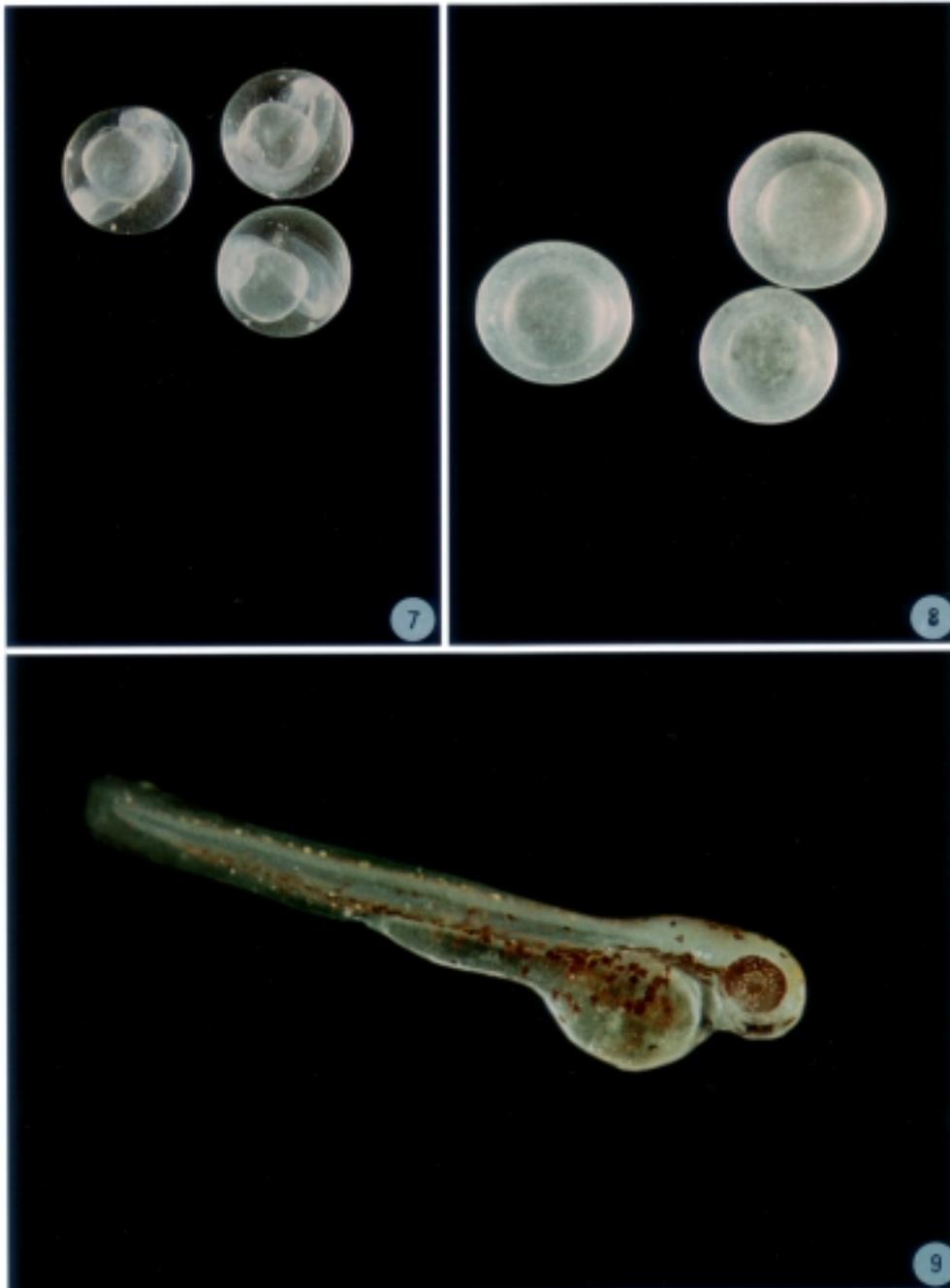


Abb. 7.4: Überlebens- und Schlüpfrate von *Danio rerio*-Larven nach Belastung mit wässrigem Sedimenteluat des Krähenbach und der Körsch (Belastungsdauer 96 h). Eluat-Konzentrationen: 1:1, 1:2- und 1:4-Verdünnung; n = 20 Eier.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

Dagegen zeigten die mit Korsch Sediment Eluat belasteten Tiere bereits nach 24 h Exposition in allen untersuchten Konzentrationen eine klar verzögerte Entwicklung (Abb. 7.8). Bereits nach 48 h Exposition mit purem Korsch Sediment Eluat starben alle belasteten Embryonen (Abb. 7.4). Während nach 96 h Exposition bei der 1:2 und 1:4 Korsch Sediment Eluat Verdünnung die Überlebensrate der Larven 67,5 bzw. 67,2 % betrug (Abb. 7.4).

Die Embryonen jeder exponierten Gruppe, mit Ausnahme der mit purem Korsch Sediment Eluat belasteten Tiere, schlüpften ab dem 2. Expositionstag (Abb. 7.4). Im Vergleich zur Kontrolle, fingen die meisten Tiere dieser Gruppen (1:1 Krähenbach Eluat, 1:2 und 1:4 Verdünnung; Korsch 1:2 und 1:4 Eluat Verdünnung) bereits nach dem 1. Expositionstag mit dem Schlüpfen an (Abb. 7.4). Jedoch stagnierte das Schlüpfen bei dem unverdünnten Krähenbach Eluat, Korsch Eluat 1:4 und 1:2 Verdünnung belasteten Tieren zwischen dem 2. und 3. Expositionstag (Abb. 7.4). Nach 48 h Exposition mit Krähenbach Sediment Eluat der 1:4 und 1:2 Verdünnung waren 30 bzw. 29,7 % der Embryonen geschlüpft (Abb. 7.4).

Im Vergleich zum Krähenbach, betrug die Schlüpftrate bei den mit Korsch Sediment Eluat belasteten Tieren in der 1:2 und 1:4 Verdünnung, 24 bzw. 43,1 % (Abb. 7.4).

Die Herzschlagfrequenz der Larven aller belasteten Gruppen zeigten keine Abweichungen zur Kunstwasser-Kontrolle.

### 7.2.3 Belastung mit acetonischen Sedimentextrakten aus dem Krähenbach und der Korsch

Die mit acetonischen Extrakt aus Krähenbach Sediment belasteten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine geringe zeit- und dosisabhängige Mortalitätszunahme mit einer Überlebensrate von 77,1 % in der 0,1 % Verdünnung auf (Abb. 7.5, 7.12).

Eine dosis- und zeitabhängige Beeinflussung der Überlebensrate der mit Korsch Sedimentextrakt belasteten Tiere trat bei allen untersuchten Verdünnungen auf (Abb. 7.5). Die Mortalität betrug nach 96 h bei den mit 0,1 % Korsch Sedimentextrakt belasteten Tieren 100 % (Abb. 7.5). Sogar nach einer 96 h Belastung mit 0,00625 % Korsch Sedimentextrakt starben 15,6 % der embryolarvalen Zebrafische (Abb. 7.5). Sowohl bei der DMSO-Kontrolle als auch bei den Krähenbach Sedimentextrakt belasteten Tieren betrug die Schlüpftrate nach 96 h 100 % (Abb. 7.5).

Im Vergleich dazu zeigten die mit 0,05 und 0,025 % Korsch Sedimentextrakt exponierten Frühstadien nach 96 h ein verzögertes Schlüpfverhalten von nur 10,4 bzw. 81,2 % geschlüpfter Tiere (Abb. 7.5, 7.13). Die Herzschlagfrequenz der Larven mit Ausnahme der 0,1, 0,05 und 0,025 % Korsch Sedimentextrakt Verdünnungen zeigte in den restlichen Gruppen keine Abweichungen zur DMSO-Kontrolle. Eine Exposition mit 0,1, 0,05 und 0,025 % Korsch Sedimentextrakt induzierte bei den Tieren eine auffällige Verzögerung der Herzschlagfrequenz (Abb. 7.6).

---

Vorherige Seite

Abb. 7.7 – 7.9. *Kontrolle Kunstwasser und wäßriges Eluat aus Korsch Sediment.* Bei den 1 d alten Kontrolltieren war bereits das Herz ausgebildet und der Körper hat in der Länge zugenommen (Abb. 7.7). Dagegen zeigten die mit wäßrigem Eluat aus Korsch Sediment belasteten Tiere nach 1 und 4 d Exposition eine klar verzögerte Entwicklung (Abb. 7.8).

Abb. 7.7: Kontrolle Kunstwasser, 1 d x 188; Abb. 7.8: Verdünnung 1:1 Korsch Eluat, 1 d x 208; Abb. 7.9: Verdünnung 1:2 Korsch Eluat, 4 d x 630.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

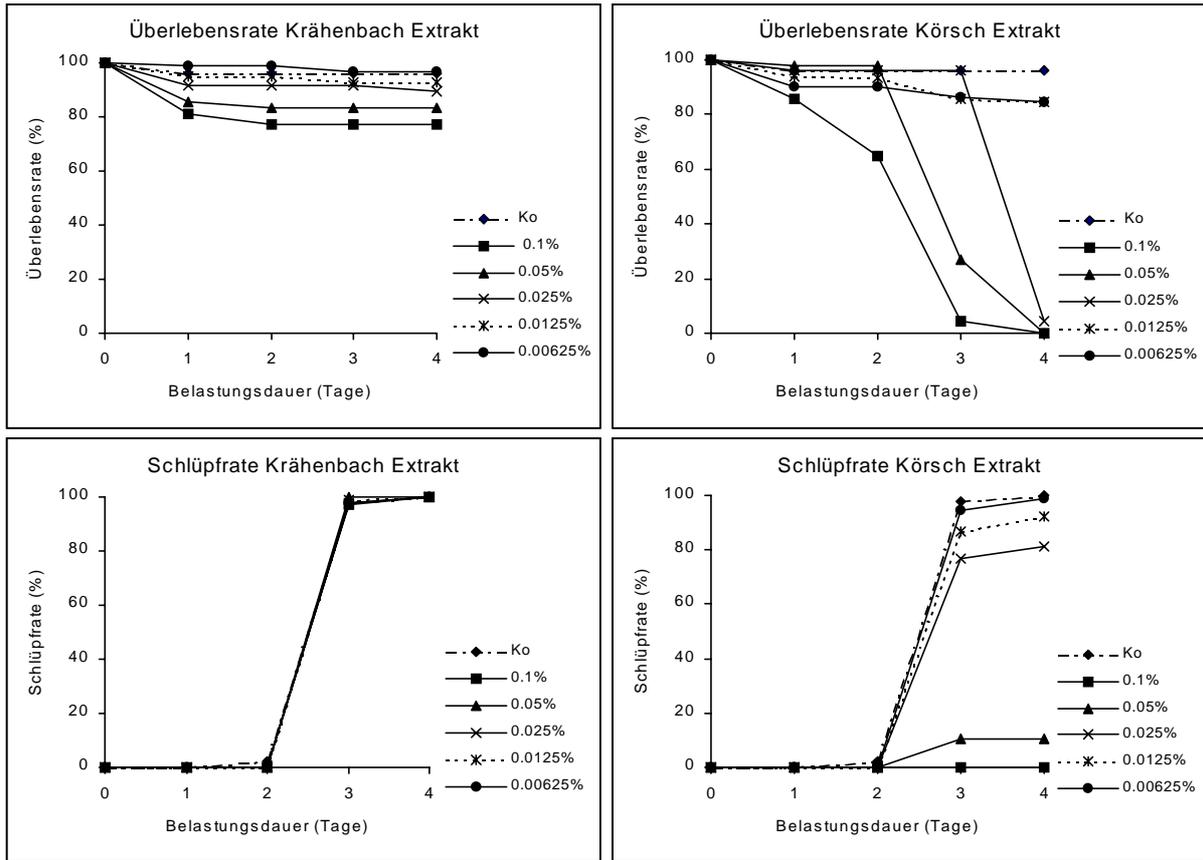


Abb. 7.5: Überlebens- und Schlüpftrate von *Danio rerio*-Larven nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt des Krähenbach und der Korsch (Belastungsdauer 96 h). Extrakt-Konzentrationen: 0,1 - 0,00625 %; n = 20 Eier.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

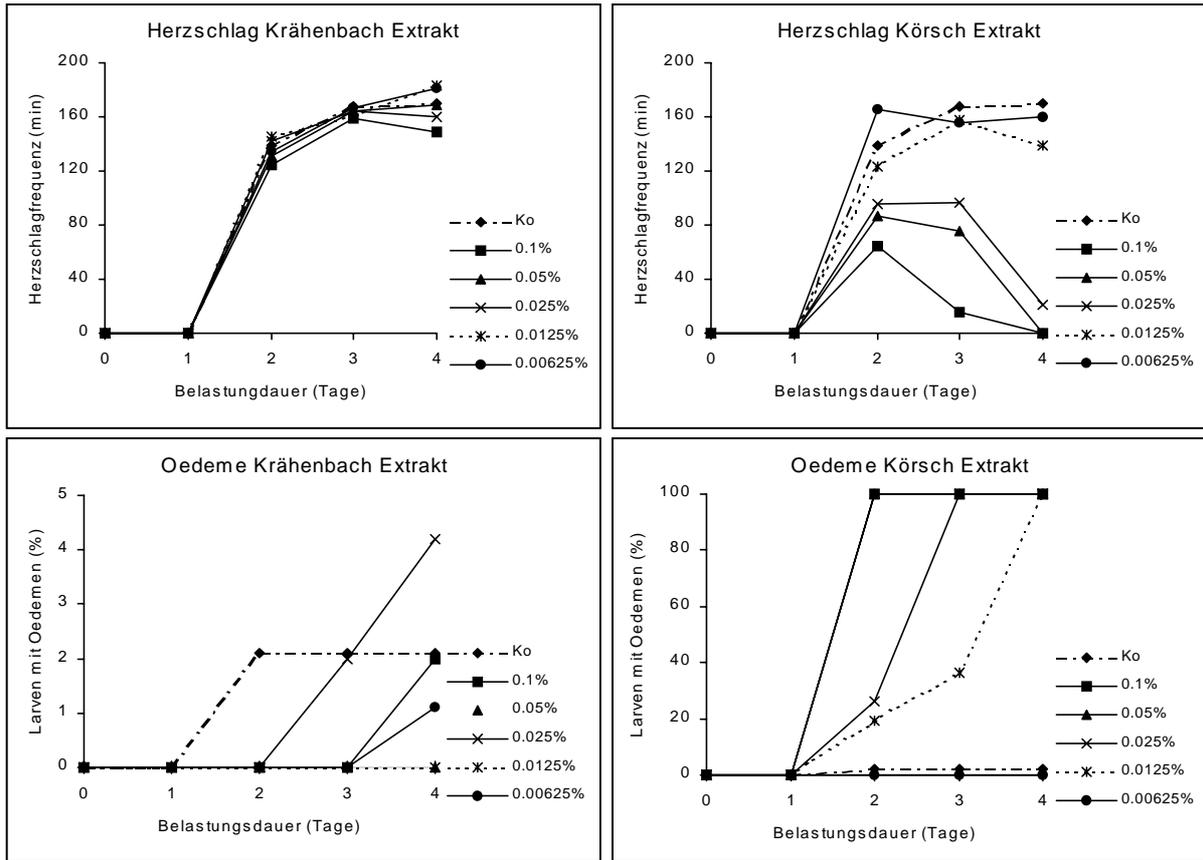


Abb. 7.6: Herzschlagfrequenz und Ausbildung von Oedemen von *Danio rerio*-Larven nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt des Krähenbach und der Körsch (Belastungsdauer 96 h). Extrakt-Konzentrationen: 0,1 - 0,00625 %; n = 20 Eier.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und Krähenbach, zeigten die mit Körsch Sedimentextrakt belasteten embryolarvalen Frühstadien mit Ausnahme der 0,00625 % Verdünnung eine dosisabhängige Reduktion der Spontanbewegungen mit zunehmend lethargischen Verhalten. Bei vielen Tieren wies der Schwanz eine axiale Verkrümmung nach dorsal bzw. lateral auf (Abb. 7.13).

Häufig konnte bei den deformierten Individuen eine verzögerte Resorption des Dottersackes und auch eine zunehmende Oedembildung der Herz- und Bauchregion beobachtet werden (Abb. 7.6, 7.13). Nach einer 48 h Belastung mit 0,1 und 0,05 % Körsch Sedimentextrakt bildeten alle belasteten Tiere umfangreiche Oedeme in der Herz- und Bauchregion aus (Abb. 7.6, 7.13).

### Elektronenmikroskopische Befunde:

#### 7.2.4 Ultrastruktur der Leber (Kontrolle Kunstwasser)

Die Hepatocyten von 4 d alten Kontrolltieren waren von hexagonaler Gestalt und besaßen einen zentral gelegenen Zellkern. Die im Cytoplasma verteilten Mitochondrien waren oft ringförmig angeschnitten und teilweise sehr eng mit Glykogenarealen und Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) assoziiert. Einige Mitochondrien zeigten teilweise aufgelöste Cristae und besaßen eine flockige Matrix sowie kleine myelinartige Einschlüsse bzw. Ansammlungen an Mitochondrienmembranen. Das RER bestand aus langgestreckten, schlanken Zisternen, die um den Zellkern und um die Mitochondrien angeordnet waren sowie einzelnen Zisternenstapeln an der Zellperipherie. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) war nur in geringen Mengen vorhanden. Golgi-Felder befanden sich in unmittelbarer Umgebung zu den Gallencanaliculi. Einzelne Dictyosomen bestanden aus 4-5 teilweise leicht dilatierten parallel angeordneten Zisternen, die eine große Menge Vesikel unterschiedlicher Größe abschnürten. Im Cytoplasma konnten einzelne Peroxisomen, Lysosomen und kleine Myelinkörper beobachtet werden. In der Zellperipherie lagen kleine Glykogenfelder, gelegentlich zusammen mit Lipidtropfen.

In Hepatocyten der 6 d alten Tiere (Abb. 7.14) waren die Mitochondrien meist von rundlicher, zuweilen ovaler Gestalt mit zunehmend aufgelösten Cristae, einer flockigen Matrix sowie kleinen myelinartigen Ansammlungen. Die RER-Menge war verringert und bestand aus einzelnen kleinen Zisternen, die um den Zellkern und die Mitochondrien angeordnet waren. Neben einer leichten Zunahme an Myelinkörpern und Lipidtropfen traten im Cytoplasma vereinzelt Glykogenrosetten auf.

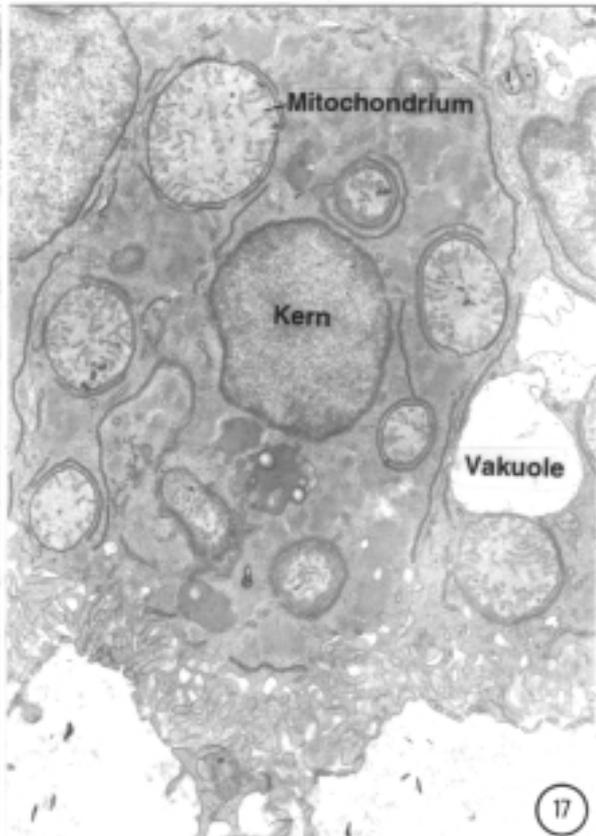
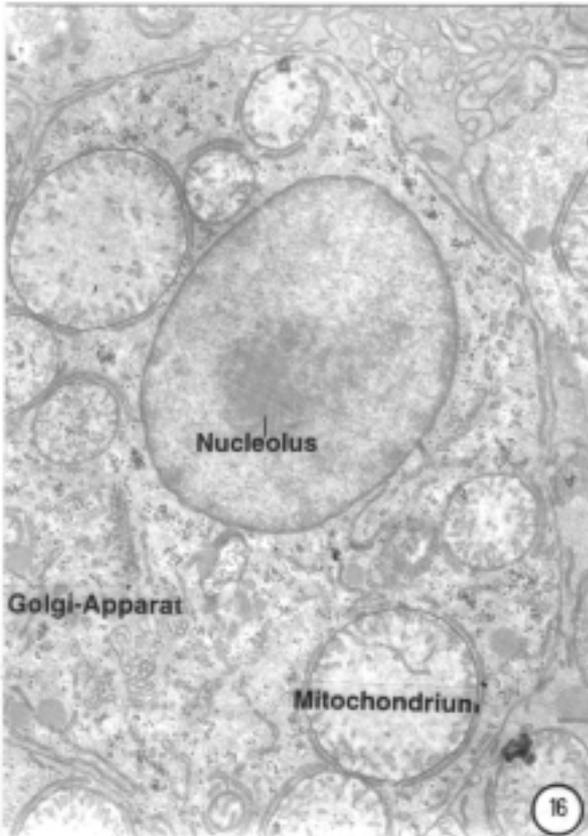
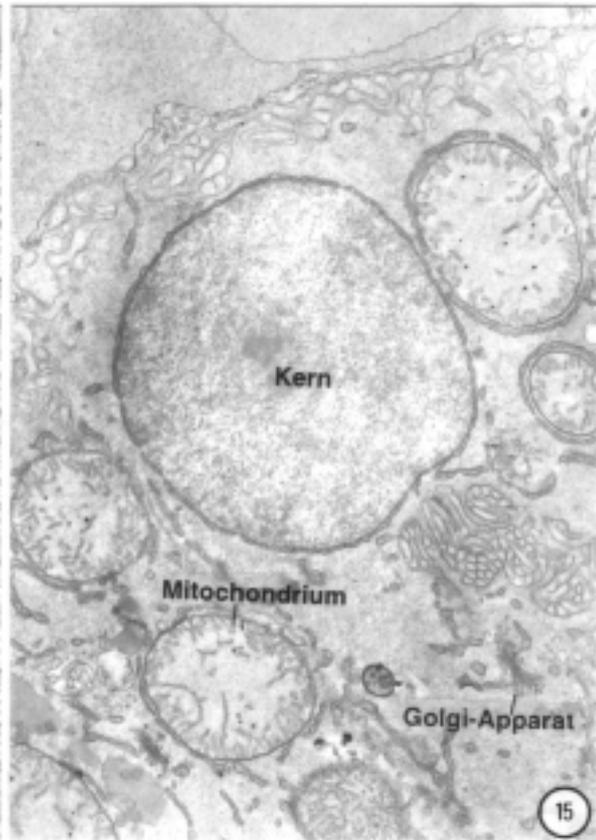
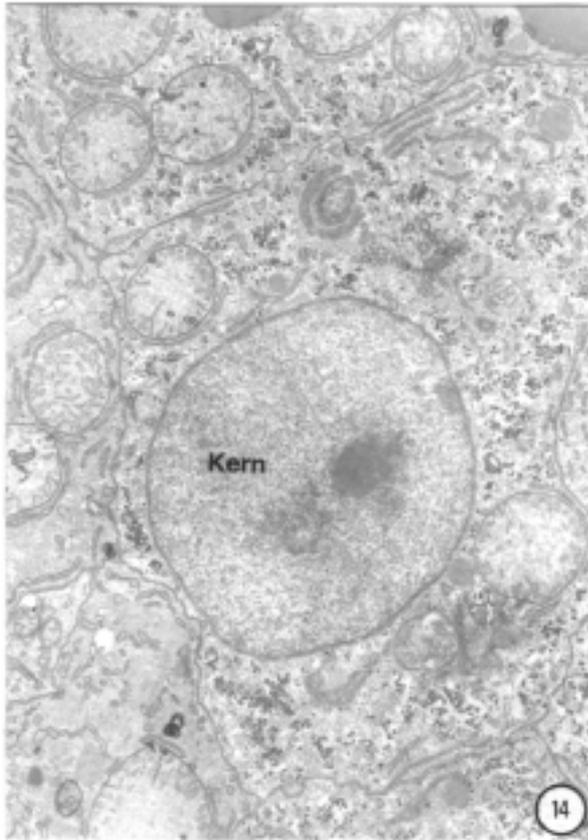
---

Vorherige Seite

Abb. 7.10 – 7.13. *Sedimentextrakt aus dem Krähenbach und der Körsch*. Die mit acetonischen Extrakt aus Krähenbach Sediment belasteten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine geringe Mortalitätszunahme in der 0,1 % Verdünnung auf (Abb. 7.10). Im Vergleich dazu zeigten die mit 0,05 % Körsch Sedimentextrakt exponierten Frühstadien ein verzögertes Schlüpfverhalten (Abb. 7.11). Im Gegensatz zum Krähenbach (Abb. 7.12) konnten beim Körsch Sedimentextrakt deformierte Individuen mit einer verzögerten Resorption des Dottersackes und einer zunehmenden Oedembildung der Herz- und Bauchregion beobachtet werden (Abb. 7.13).

Abb. 7.10: 0,1 % Konzentration Krähenbach Extrakt, 2 d x 385; Abb. 7.11: 0,05 % Konzentration Körsch Extrakt, 3 d x 770; Abb. 7.12: 0,1 % Konzentration Krähenbach Extrakt, 3 d x 700; Abb. 7.13: 0,025 % Konzentration, 3 d x 700.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

Selten konnten eingewanderte Makrophagen sowie Hepatocyten mit erweiterten Gallencanaliculi, die nur wenige Microvilli besaßen, beobachtet werden.

Bei den 8 d alten Larven (Abb. 7.15) traten im Cytoplasma wenige, relativ große Mitochondrien mit teilweise aufgelösten Cristae auf. Der Golgi-Apparat war öfter desorganisiert, die Dictyosomen schnürten wenige Vesikel unterschiedlicher Größe ab, der Gehalt an Lysosomen nahm leicht zu.

### 7.2.5 *Cytopathologische Veränderungen in der Leber embryonaler und larvaler Zebrabärblinge nach Belastung mit Krähenbach-Wasser (Tab. 7.1)*

Die Hepatocyten der mit Krähenbach Wasser belasteten Larven zeigten in den verschiedenen Altersstufen nur wenige Unterschiede zur Kontrolle. Die Zellen 4 d alter Tiere besaßen teilweise einen leicht deformierten Zellkern mit diffus verteiltem Heterochromatin und einen deutlich ausgeprägten Nucleolus. Die Mitochondrien waren in Größe und Form heterogen, und im Vergleich zur Kontrolle waren nur wenige ringförmig angeschnitten und selten eng mit Glykogen assoziiert. Vereinzelt konnten mitochondriale Cristae sowie myelinartige Ansammlungen an den Mitochondrien beobachtet werden. Vereinzelt traten Glykogenkörper auf.

In der Leber 6 d alter belasteter Larven (Abb. 7.16) konnten kaum erweiterte Gallencanaliculi beobachtet werden. Bei den 8 d alten Tieren (Abb. 7.18) war der RER-Gehalt reduziert, die Mitochondrien waren kleiner als in der Kontrolle, die Cristae waren teilweise aufgelöst und besaßen häufiger myelinartige Einschlüsse. Die Golgi-Felder sezernierten häufiger Vesikel als bei Körschwasser exponierten Larven. Die Gallencanaliculi waren teilweise erweitert, die Anzahl der Microvilli war reduziert, Myelinkörper waren öfter im Cytoplasma zu sehen.

### 7.2.6 *Cytopathologische Veränderungen in der Leber embryonaler und larvaler Zebrabärblinge nach Belastung mit Körsch-Wasser (Tab. 7.1)*

Die Hepatocyten der mit Körschwasser belasteten Larven zeigten im Alter von 4 d eine leichte Heterochromatinzunahme im Karyoplasma. Die Mitochondrien waren stark heterogen in Größe und Form (Abb. 7.19) und zeigten häufig ringförmigem Anschnitt, teilweise mit stark aufgelösten Cristae, einer flockigen Matrix sowie myelinartigen Membranansammlungen. Das meist an der Zellperipherie gelegene RER bestand aus kurzen, schlanken Zisternen und war häufig eng mit Mitochondrien assoziiert. Der Golgi-Apparat war desorganisiert; die Zisternen der Dictyosomen waren leicht dilatiert

---

Vorherige Seite

Abb. 7.14 - 17. *Kontrolle Kunstwasser, Wasser aus dem Krähenbach und der Körsch.* Die Hepatocyten von 6 d alten Kontrolltieren waren von hexagonaler Gestalt mit Mitochondrien von rundlicher bisweilen ovaler Gestalt (Abb. 7.14). Bei den 8 d alten Kontrolltieren waren im Cytoplasma wenige sehr große Mitochondrien zu beobachten mit leicht aufgelösten Cristae (Abb. 7.15). Die Hepatocyten von 6 d alten mit Krähenbachwasser belasteten Larven zeigten eine zunehmende Auflösung der mitochondrialen Cristae (Abb. 7.16). In der Leber 8 d alter Körschwasser belasteter Tiere nahm das Heterochromatin in den Zellkernen deutlich zu und im Cytoplasma konnten teilweise sehr große Vakuolen beobachtet werden (Abb. 7.17).

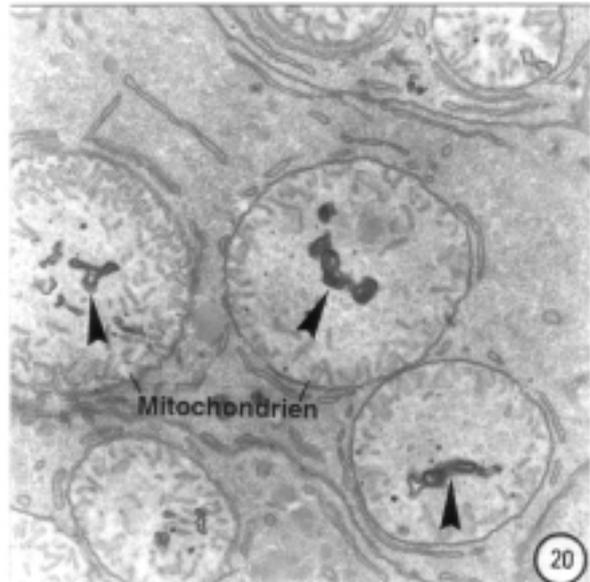
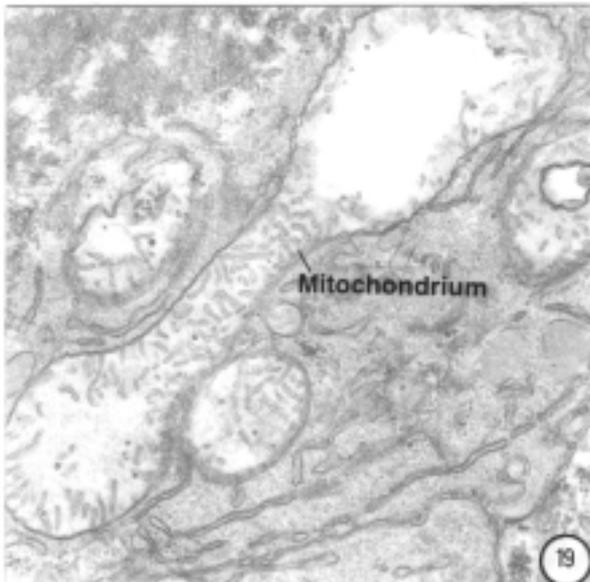
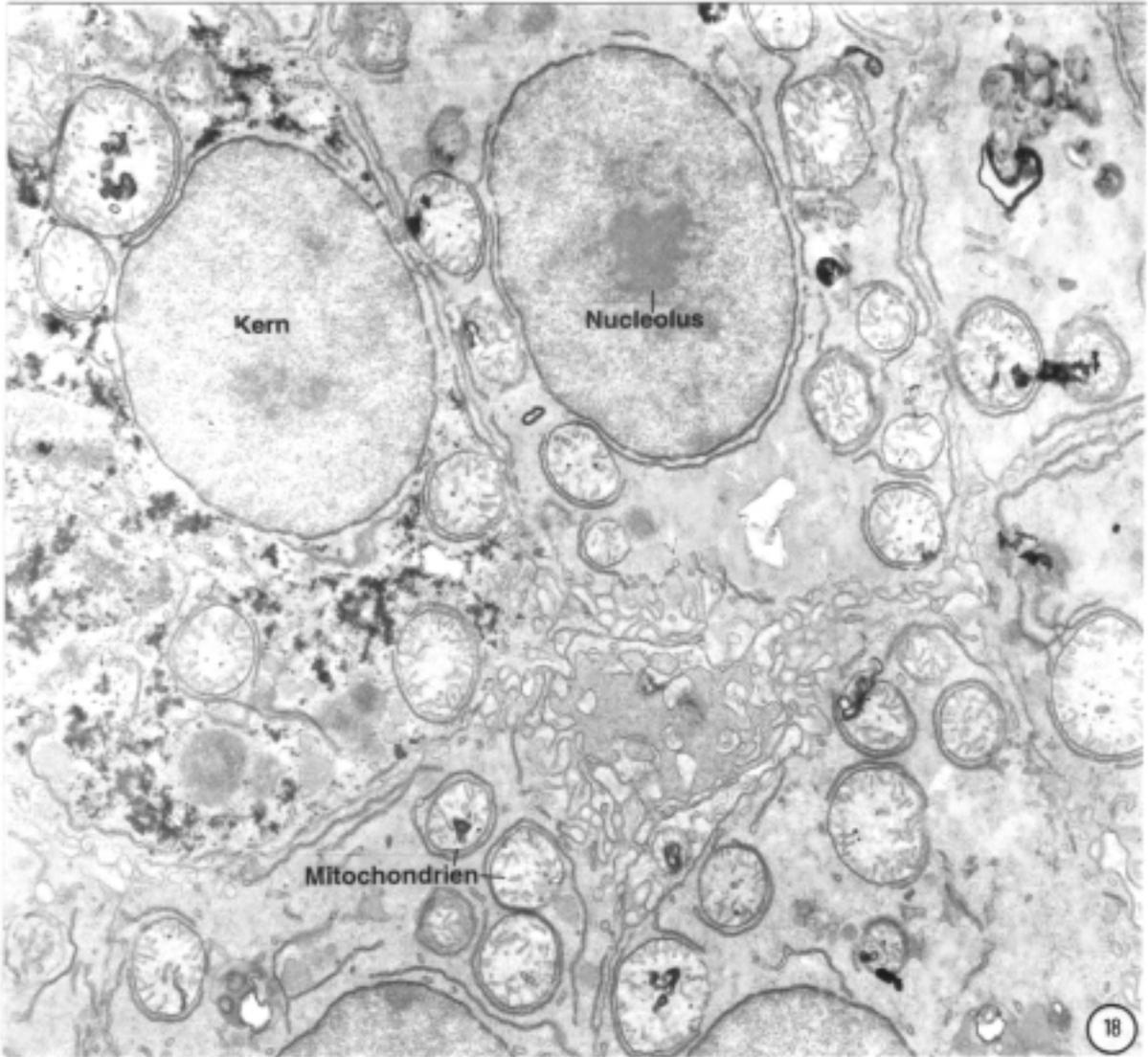
Abb. 7.14: Kontrolle Kunstwasser, 6 d x 8400; Abb. 7.15: Kontrolle Kunstwasser, 8 d x 10700; Abb. 7.16: Krähenbach Wasser, 6 d x 8400; Abb. 7.17: Körsch Wasser, 8 d x 8400.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

Tab. 7.1: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber embryonaler und larvaler Zebraquärlinge (*Danio rerio*) nach Belastung mit nativem Wasser aus Krähenbach und Körsch (Probennahmen im November 1996).

	Kontrolle	4d Krähen- bach	Körsch	Kontrolle	6d Krähen- bach	Körsch	Kontrolle	8d Krähen- bach	Körsch
<b>Kompartimentierung</b>	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+
<b>Kern</b>									
Veränderte Kernform	±	+	+	±	+	+	±	+	+
Heterochromatin	±	+	++	±	+	++	±	+	+++
Lageveränderung	±	±	±	±	±	+	±	±	+
<b>Mitochondrien</b>									
Erhöhte Heterogenität	+	++	+++	+	++	++	+	++	++
Auflösung der Cristae	+	++	++	++	++	+++	++	++	+++
Myelinakkumulation	+	+	++	+	+	+++	+	++	+++
<b>RER</b>									
Menge	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	+
Stapelbildung	+++	+++	++	+	+	+	++	++	+
Fragmentierung	±	+	+	+	++	++	+	++	++
<b>SER</b>									
Menge	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Golgi-Felder</b>									
Dilatation	±	±	+	±	±	++	±	±	++
Fenestrierung	±	±	+	±	±	++	±	±	++
Aktivität	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
<b>Lysosomen</b>									
Lysosomen	+	+	++	+	+	++	++	++	++
Myelinkörper	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
Multivesikuläre Körper	±	±	±	±	±	±	±	±	+
Vakuolen	±	±	++	±	±	++	±	±	++
<b>Peroxisomen</b>									
Menge	+	+	++	+	+	++	+	+	++
Akkumulationen	±	±	++	±	±	++	±	±	++
<b>Lipid</b>									
Menge	+	+	++	+	+	++	+	+	+++
<b>Glykogen</b>									
Menge	++	++	++	+	+	+	+	+	±
Glykogenkörper	±	+	±	±	±	±	±	±	±
<b>Makrophagen</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	++
<b>Erweiterte Gallencanaliculi</b>	±	±	±	+	+	+	+	++	+++
<b>Erweiterte Sinusoide</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	++

Zeichenerklärung: ± = fehlend; + = schwach; ++ = vorhanden; +++ = stark. Ausgewertet wurden 4 Tiere pro Tag und Konzentration.



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

und fenestriert und schnürten viele Vesikel unterschiedlicher Größe ab. Neben einer leichten Zunahme an Lysosomen und Myelinkörpern konnten öfter Peroxisomencluster beobachtet werden. Einige Peroxisomen bildeten enge Assoziationen zu Mitochondrien. Auffällig waren die teilweise sehr großen cytoplasmatischen Vakuolen sowie die Zunahme von Lipidtropfen (Abb. 7.19, Tab. 7.1).

Im Alter von 6 d konnte in den Hepatocyten der Larven eine leichte Verlagerung der Zellkerne in die Peripherie beobachtet werden. In den runden bis ovalen Mitochondrien waren die Cristae meist aufgelöst und besaßen oft myelinartige Einschlüsse bzw. Ansammlungen (Abb. 7.20). Die Zisternen des Golgi-Apparates waren häufig dilatiert und fenestriert und schnürten viele kleine Vesikel ab. Neben einer Verringerung des Glykogengehaltes traten häufig Myelinkörper im Cytoplasma auf. Einige Hepatocyten wiesen erweiterte Gallencanaliculi mit reduzierter Microvilli-Anzahl auf.

Bei den 8 d alten Tieren nahm das Heterochromatin der Hepatocytenzellkerne deutlich zu (Abb. 7.21). Die wenigen, sehr großen Mitochondrien besaßen häufig myelinartige Einschlüsse und auffällig defekte Membranen. Der RER-Gehalt war sehr gering, der Golgi-Apparat war weitgehend desorganisiert (Abb. 7.22) und zunehmend inaktiv, Myelinkörper und Lipidtropfen waren häufig. Gallencanaliculi und Sinusoide waren deutlich dilatiert (Abb. 7.21). In den Sinusoiden fanden sich Erythrocyten, außerdem waren zahlreiche eingewanderte Makrophagen zu beobachten. Vereinzelt traten Multivesikuläre Körper auf (Abb. 7.23).

### 7.3 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Wirkung von Wasser- und Sedimentproben der Modellgewässer Krähenbach und Körsch auf die Embryogenese von Fischen im *Early Life Stages*-Test aufzuzeigen. Da gerade die frühen Entwicklungsstadien von Fischen besonders empfindlich auf Schadstoffe und Gewässerbelastungen reagieren (McKim, 1977; Birge et al., 1985; Görge & Nagel, 1990; Neilson et al., 1990) und die Überlebensrate dieser Stadien maßgeblich für die Populationsentwicklung einer Art sein kann, wurden befruchtete Eier des Zebraärbblings (*Danio rerio*) unterschiedlichen Verdünnungen von nativem Wasser, wäßrigen Eluat und acetonischen Extrakten aus Sediment beider Fließgewässer für 96 h exponiert. Dabei wurden sowohl makroskopische Parameter (Mortalitäts- und Schlüpftrate sowie makroskopisch erkennbare Veränderungen und Entwicklungsstörungen) als auch ultrastrukturelle Parameter der Leber berücksichtigt.

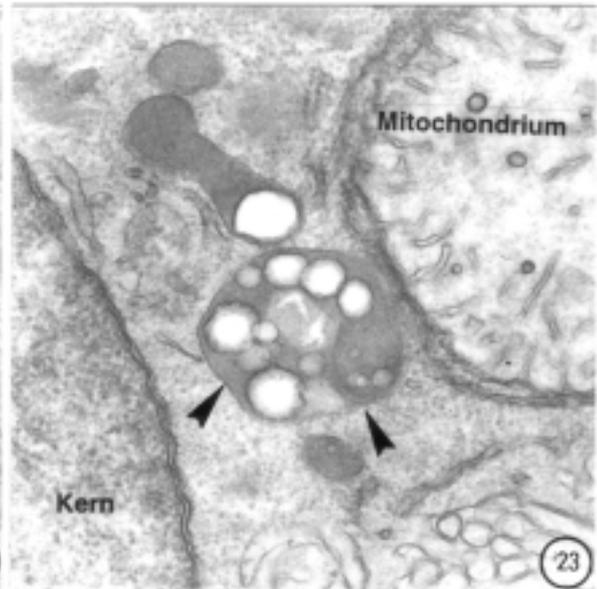
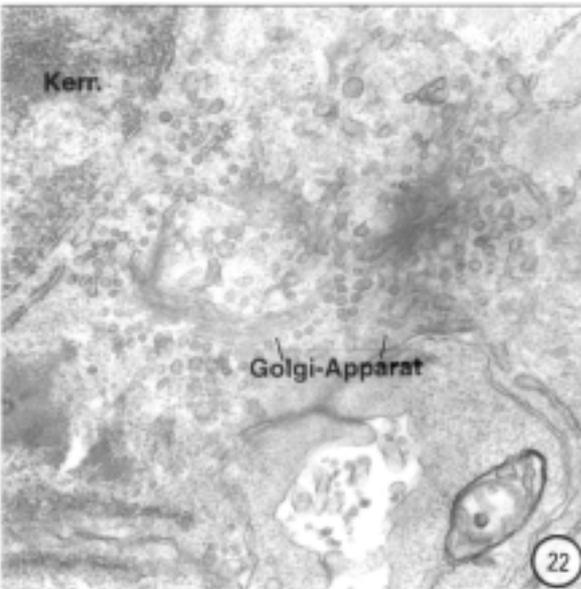
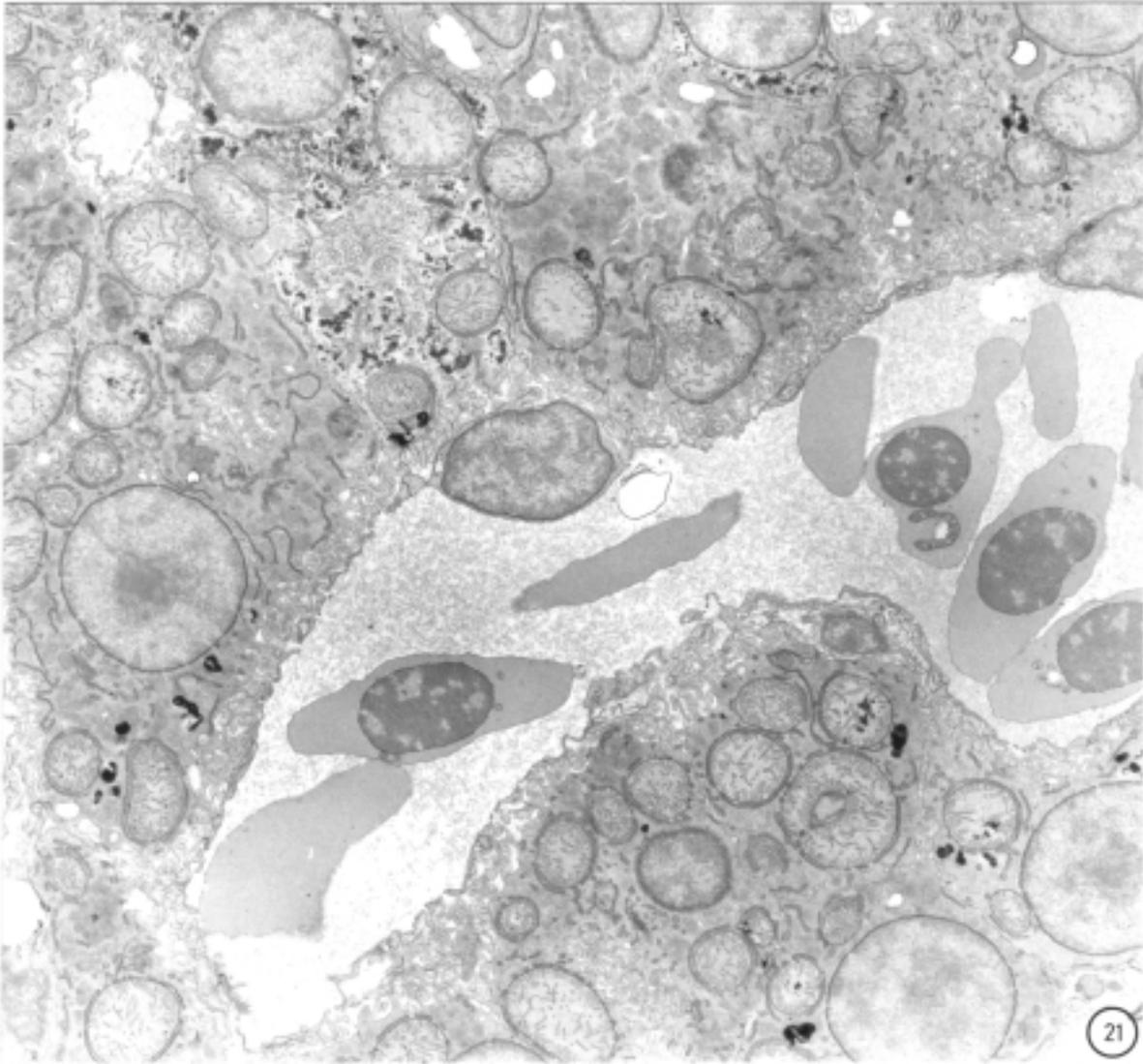
---

Vorherige Seite

Abb. 7.18 - 20. *Wasser aus dem Krähenbach und der Körsch*. Bei den 8 d alten Tiere, die mit Krähenbachwasser belastet wurden, waren in den Hepatocyten die mitochondrialen Cristae zunehmend aufgelöst und sie besaßen häufig myelinartige Einschlüsse. (Abb. 7.18). Weiterhin war der RER-Gehalt stark reduziert (Abb. 7.18). Die Hepatocyten der Körschwasser belasteten Larven besaßen Mitochondrien mit stark heterogenen Größen und Formen (Abb. 7.19). Die mitochondriale Matrix war oft flockig mit vielen myelinartigen Membranansammlungen (Abb. 7.20, Pfeilköpfe).

Abb. 7.18: Krähenbach Wasser, 8 d x 10625; Abb. 7.19: Körsch Wasser, 4 d x 17700; Abb. 7.20: Körsch Wasser 6 d x 13700.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment



## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

### Makroskopische Befunde

Die Versuchsergebnisse zeigten keine makroskopisch sichtbaren Effekte in den embryolarvalen Stadien des Zebrafischlings nach 96 h Exposition mit *nativem Wasser* des Krähenbach und der Körsch.

Eine 96 h Belastung der embryonalen Zebrafischlinge mit *wäßrigen Eluaten* und *acetonischen Extrakten* aus Sedimenten beider Modellfließgewässer ergab eine deutlich unterschiedliche Reaktion der Embryonen/Larven zwischen den beiden Gewässern sowie den verschiedenen Phasen (vgl. Tab. 7.2). Die dosis- und zeitabhängigen makroskopischen Veränderungen der Embryonen induziert durch Körsch Sedimentproben traten im Vergleich zum weniger kontaminierten Krähenbach früher und stärker auf.

### Mortalität:

Bereits nach einer 48 h Belastung mit purem wäßrigem Sedimenteluat und einer 96 h Belastung mit 0,1 % acetonischem Sedimentextrakt der Körsch konnte eine 100 % Mortalität der Jungstadien festgestellt werden. Diese im Vergleich zum Krähenbach höhere Sterblichkeit der mit Körsch Sedimentproben belasteten Frühstadien läßt sich auf die stärkere und komplexere Schadstoffbelastung der Körsch zurückführen. Nach 96 h Belastung mit wäßrigen Eluat aus Sediment beider Fließgewässer konnte sogar bei einer 1:4-Verdünnung des Eluates eine erhöhte Mortalität der Larven beobachtet werden. Im Vergleich dazu war nach 96 h Exposition gegenüber acetonischem Extrakt aus Krähenbach-Sediment bei einer 0,025 % Konzentration und aus Körsch-Sediment bei einer Konzentration von 0,00625 % ein Mortalitätsanstieg der Larven festzustellen. Also liegt der ermittelte LOEC-Wert des Endpunktes Mortalität für den acetonischen Extrakt beim Krähenbach um den Faktor 4 höher im Vergleich zur Körsch.

Die erst nach 48 h Belastung verstärkte Mortalität der Frühstadien könnte im Zusammenhang mit einer schützenden Rolle des Chorions stehen. In *Early Life Stage*-Studien mit der Elritze (*Phoxinus phoxinus*), bei denen die toxischen Eigenschaften zinnorganischer Verbindungen untersucht wurden, zeigten die Tiere in der larvalen Stufe ihrer Entwicklung im Vergleich zu der embryonalen Stufe ebenfalls eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Schadstoffen (Fent, 1992; Fent & Meier, 1992, 1994). Die Autoren erklären die verhältnismäßig geringe Empfindlichkeit der Embryonen dadurch, daß der Schadstoff möglicherweise am Chorion adsorbiert wurde, wodurch dieser nicht oder nur in sehr geringen Mengen den Embryo im Ei erreicht.

---

Vorherige Seite

Abb. 7.21 - 23. *Wasser aus der Körsch*. Die Leber der 8 d alten, mit Körschwasser belasteten Larven zeigte die stärksten Veränderungen, wie deutlich dilatierte Gallencanaliculi und Sinusoide, sowie eine Zunahme von Vakuolen und Myelinkörpern als auch myelinartigen Ansammlungen in Mitochondrien (Abb. 7.21). Der Golgi-Apparat war meist desorganisiert (Abb. 7.22) und vereinzelt waren Multivesikuläre Körper zu beobachten (Abb. 7.23).

Abb. 7.21: Körsch Wasser, 8 d x 4900; Abb. 7.22: Körsch Wasser, 8 d x 26300; Abb. 7.23: Körsch Wasser, 8 d x 35200.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

Tab. 7.2: Vergleich makroskopischer Effekte bei Frühstadien des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach Exposition mit wäßrigem Eluat und acetonischem Extrakt aus Sediment des Krähenbach und der Körsch.

	Krähenbach	Körsch
<b>Wäßriges Sedimenteluat</b>	erhöhte Mortalität kein LC <sub>50</sub> -Wert zu bestimmen  Stimulation des Schlüpfens	erhöhte Mortalität LC <sub>50</sub> -Wert von 65 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz (96 h) Stimulation des Schlüpfens Verzögerung des Schlüpfens (pures Eluat)
<b>Acetonischer Sedimentextrakt</b>	erhöhte Mortalität kein LC <sub>50</sub> -Wert zu bestimmen	erhöhte Mortalität LC <sub>50</sub> -Wert von 5 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz (96 h) Verzögerung des Schlüpfens Verzögerung der Herzschlagfrequenz lethargisches Verhalten Axiale Verkrümmung des Schwanzes Oedembildungen der Herz- und Bauchregion

Die Aufnahme der toxischen Substanzen wird also durch das Chorion verlangsamt, jedoch nicht völlig verhindert (Van Leeuwen et al., 1985). Untersuchungen von Michibata (1981) und Kunze et al. (1978) zeigen, daß Schwermetalle an die Oberfläche des Chorions adsorbieren. Das Eindringen der Schwermetalle wird durch eine Komplexbindung an SH-Gruppen der Eimembran verhindert (Blaxter, 1969). Eine Akkumulation von Cadmium (Von Westernhagen & Dethlefsen, 1975; Michibata, 1981) und Zink (Wedemeyer, 1968) konnte im Chorion nachgewiesen werden. Die im Sediment von Krähenbach und Körsch nachgewiesenen Schwermetalle Cadmium, Blei, Kupfer und Zink könnten möglicherweise aufgrund der schützenden Chorionhülle auch bei Embryonen des Zebraäbrblings keine embryotoxischen Effekte induzieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Einlagerung von Schadstoffen im Dottersack, so daß eine Akkumulation von toxischen Substanzen in den Körper der Jungstadien mit der Resorption des Dotters erfolgt, und somit die Konzentration als auch die Zugänglichkeit der Schadstoffe erhöht (Guiney et al., 1980; Zeitoun et al., 1977). Die Zunahme der Mortalität nach  $\geq 48$  h Belastung der larvalen Zebraäbrlinge könnte mit der zunehmenden Resorption des Dotters und in Folge verstärkten Akkumulation von Schadstoffen zusammenhängen.

Beim Krähenbach konnte weder für das wäßrige Eluat noch für den acetonischen Extrakt ein LC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden. Nach einer Expositionsdauer von 96 h lag der LC<sub>50</sub>-Wert für das wäßrige Eluat der Körsch bei 65 mg und für den acetonischen Extrakt bei 5 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz. Einen Mortalitätsanstieg von 30 % ergaben auch ELS-Studien an der Bachforelle (*Salmo trutta*) nach 60 Tagen Belastung mit sowohl nativem Wasser als auch wäßrigem Sedimenteluat

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

der Körsch (Luckenbach et al., 1999). Eine vergleichbare Mortalität der mit nativem Wasser der Körsch für 96 h exponierten embryolarvalen Zebrabärblinge konnte nicht beobachtet werden.

Neben PAHs konnten vor allem im Sediment der Körsch PCBs chemisch nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b). PCBs sind eine in der Umwelt weitverbreitete Schadstoffgruppe, von der bekannt ist, daß sie den Schlüpfertag und das Überleben von Fischbrut reduziert. Eine Bioakkumulation von PCBs ergab unterschiedliche Effekte, wie eine Reduktion der Überlebensrate und des Schlüpfertags bei der Flunder (*Platichthys flesus*; Von Westerhagen et al., 1981), verstärkte Sterblichkeit von Eiern beim Saibling (*Salvelinus namaycush*; Monod, 1985), reduzierte Larvengröße bei der Flunder (*Platichthys flesus*; Black et al., 1988) sowie reduzierte Schlüpfertag und Schlüpfertag bei der Bachforelle (Mac & Swartz, 1992). Eine Belastung von Fischembryonen mit PAHs zeigte in verschiedenen Studien unterschiedliche Effekte wie Veränderungen in der Reproduktion (Tilghman Hall & Oris, 1991), Mutationen, teratogene Effekte und Tumorentwicklung (Landolt & Kocan, 1984). Embryonen und Larven des Störs (*Acipenser brevirostrum*), die mit Kohle- und Teer-kontaminiertem Sedimenten des Connecticut River in Massachusetts zeigten zu über 95 % embryolarvale Mortalität (Kocan et al., 1996). Diese verstärkte embryolarvale Mortalität nach Belastung mit stark PAH-kontaminiertem Sediment könnte die Ursache für die fehlende Reproduktion der Störpopulation in bestimmten Bereichen des Flusses sein (Kocan et al., 1996). Befischungsmaßnahmen an der Körsch zeigten im Gegensatz zum Krähenbach eine fehlende Reproduktion der Bachforelle (*Salmo trutta*; Triebkorn persönliche Mitteilung), die möglicherweise u.a. im Zusammenhang mit der konstanten PAH Belastung der Körsch Sedimente mit durchschnittlich 12,1 µg/kg (Jahresgang 1995/1996; Honnen et al., 1999b) stehen könnte.

### **Schlüpfverhalten:**

Deutliche Unterschiede im Schlüpfverhalten der Frühstadien war sowohl nach Belastung mit wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt als auch zwischen den beiden Fließgewässern festzustellen. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten alle mit wäßrigem Sedimenteluat belasteten Gruppen mit Ausnahme dem Körsch Eluat (1:1-Verdünnung) eine Stimulation des Schlüpfens zwischen dem 1. und 2. Expositionstag. Bei vergleichbaren *Early Life Stage*-Studien an der Bachforelle schlüpften die mit Körschwasser und wäßrigem Sedimenteluat belasteten Frühstadien im Vergleich zur Kontrolle 4 Tage früher (Luckenbach et al., 1999). Eine Exposition von Bachschmerlenembryonen (*Barbatula barbatula*) gegenüber Körsch-Wasser und wäßrigem Sedimenteluat ergab ebenfalls ein im Vergleich zur Kontrolle früheres Schlüpfen der Embryonen (Luckenbach et al., 1999). Bei der geringsten Verdünnung des wäßrigen Sedimenteluates der Körsch war zunächst eine verzögerte Embryonalentwicklung der belasteten Tiere nach 1 Tag zu beobachten, die nach 2 Tagen in 100 % Mortalität endete.

Im Gegensatz zum wäßrigen Sedimenteluat zeigten alle mit  $\geq 0,0125$  % acetonischen Extrakt der Körsch belasteten embryolarvalen Zebrabärblinge eine klare Schlüpfverzögerung gegenüber der Kontrolle. Bei der höchsten Konzentration mit acetonischen Extrakt aus der Körsch schlüpfte keines der belasteten Tiere. In diversen ELS-Studien zur Wirkung von Triphenylzinnacetat (Fent & Meier, 1994; Strmac & Braunbeck, 1999) und verschiedenen Schwermetallen (Dave & Xiu, 1991; Seim et al., 1984) konnte eine ähnliche Verzögerung des Schlüpfverhaltens bei Embryonen der Elritze (*Phoxinus phoxinus*), Zebrabärblingen und Regenbogenforelle beobachtet werden.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

In ELS-Studien an Zebrabärblingen konnten Görge & Nagel (1990) einen zunehmenden Sauerstoffverbrauch in Zebrabärblingseiern und Larven mit einer gleichzeitigen Verminderung des Schlüpfers nach Belastung mit dem Pestizid Deltamethrin nachweisen. Verschiedene Pestizide, wie Lindan, DDT, Endosulfan, Dichlorbenzol, Pentachlorphenol konnten in der Körsch analytisch nachgewiesen werden und möglicherweise zu dem verzögerten Schlüpfverhalten der mit acetonischen Sedimentextrakt belasteten Frühstadien der Zebrabärblinge beitragen.

Neben Pestiziden führt auch eine Belastung mit Schwermetallen zu einer Verzögerung bzw. Inhibition des Schlüpfens. Eine Exposition von embryonalen Zebrabärblingen (*Danio rerio*) mit 0,63 µg/L Kupfer führte bereits zu einer Verzögerung des Schlüpfens (Dave & Xiu, 1991). In Sedimenten beider Fließgewässer konnte Kupfer in durchschnittlichen Konzentrationen von 6,4 µg/kg für den Krähenbach und 32,5 µg/kg für die Körsch (Jahresgang 1995/1996) nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b).

### **Herzschlagfrequenz:**

Eine Belastung der frühembryonalen Zebrabärblinge mit acetonischen Sedimentextrakt aus der Körsch mit Konzentrationen  $\geq 0,025$  % ergab eine deutlich langsamere Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle bzw. zum Krähenbach, welche im Zusammenhang steht mit der erhöhten Sterblichkeit der exponierten Frühstadien. Eine vergleichbare Untersuchung an Bachschmerlenembryonen (*Barbatula barbatula*) induzierte dagegen nach 72 h Exposition mit Körsch Wasser einen um fast 20 % erhöhten Herzschlag (Luckenbach et al., 1999). Die Autoren beziehen den Anstieg der Herzschlagfrequenz auf eine expositionsbedingte Erhöhung des Metabolismus (Luckenbach et al., 1999).

### **Oedeme:**

Weitere auffällige makroskopisch erkennbaren Veränderungen in den mit acetonischem Sedimentextrakt aus der Körsch belasteten Embryonen und Larven war die häufige Ausbildung von Oedemen. Bereits ab einer Konzentration von  $\geq 0,0125$  % Sedimentextrakt aus der Körsch zeigten die exponierten Tiere zunehmend Oedeme in der Herzregion. Das Auftreten von Oedemen war sowohl in den mit acetonischen Sedimentextrakten des Krähenbaches exponierten Embryonen und Larven als auch in den mit wäßrigen Sedimenteluat beider Fließgewässer belasteten Tieren nicht zu beobachten. Untersuchungen an Frühstadien des Saiblings (*Salvelinus namaycush*) zeigten nach einer Belastung mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) u.a. eine Ausbildung von Oedemen im Bereich des Dottersackes und des Herzens (Guiney et al., 1997). Chemisch-analytische Untersuchungen der Krähenbach- und Körsch-Sedimente ergab eine umfangreiche Belastung vor allem der Körsch mit unterschiedlichen Schadstoffen wie mit PAHs und PCBs, TCDD konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b).

Neben PCBs und PAHs konnten vor allem in der Körsch zahlreiche Pestizide nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b). Von vielen Pestiziden ist bekannt, daß sie im ELS-Test bei verschiedenen Fischarten z.B. Pentachlorphenol in der Dickkopfritze (*Pimephales promelas*; Holcombe et al., 1982), Lindan, Atrazin, Deltamethrin (Görge & Nagel, 1990) und Triphenylzinnacetat (Strmac & Braunbeck, 1999) im Zebrabärbling (*Danio rerio*) eine Ausbildung von Oedemen induzieren.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

### Elektronenmikroskopische Befunde

Da gegenüber *nativem Wasser* beider Gewässer exponierten embryolarvalen Zebrabärblinge keine makroskopischen Veränderungen zeigten, jedoch chemisch analytische Befunde Hinweise auf eine Kontamination der Wassersäule mit Schwermetallen, PAHs und Pestiziden gaben (Honnen et al., 1999b), wurden die für 96 Stunden mit nativem Wasser belasteten Tiere auf subletale Effekte in der Leber elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Ergebnisse zeigen zeit- und dosisabhängige cytopathologische Veränderungen der Leber von Larven des Zebrabärblings nach Belastung mit nativem Wasser des Krähenbaches und der Körsch (Strmac & Braunbeck, 1997a). Jedoch ist weiterhin zu bemerken, daß eine reine Exposition der embryolarvalen Zebrabärblinge mit ISO-Kunstwasser minimale Veränderungen in der Leber wie eine leichte Auflösung der mitochondrialen Cristae, Myelinakkumulationen an Mitochondrien und im Cytoplasma als auch teilweise erweiterte Gallencanaliculi bewirken kann. Möglicherweise handelt es sich dabei um Fixierungsartefakte oder die Ionenzusammensetzung des Kunstwassers ist für die Frühstadien noch nicht optimal entwickelt und induziert die beschriebenen Veränderungen der Leber.

In Tabelle 7.3 wurden die Befunde in der Leber der vorliegenden ELS-Studie mit denen des *In vitro*-Zellkulturversuches (Probennahme Juli 1996) verglichen, bei denen isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle nativem Wasser des Krähenbaches und der Körsch ausgesetzt worden waren (vgl. Kapitel 4).

Qualitativ konnten sowohl einige übereinstimmende *In vitro*- und *In vivo*-Reaktionen zwischen den beiden Testsystemen als auch zwischen den beiden Fließgewässern beobachtet werden (Tab. 7.3). Weiterhin traten die cytopathologischen Veränderungen *in vitro* und *in vivo* nach Körschwasser Exposition zeitlich früher auf bzw. sie waren ausschließlich in der Körsch zu beobachten.

Auffällig war die weitgehende Übereinstimmung der Reaktion der beiden Testsysteme auf eine Exposition mit Körschwasser. Dagegen waren beim Krähenbach *in vitro* ein komplexeres cytologisches Schadbild im Vergleich zur Leber der larvalen Zebrabärblinge zu beobachten (Tab. 7.3). Eine Erklärung dafür könnte in einer im Vergleich zum Zebrabärbling erhöhten Empfindlichkeit der isolierten Hepatocyten von Regenbogenforellen gegenüber dem Schadstoffgemisch natives Wasser liegen. Da der Schadstoffgehalt im Krähenbach Wasser im Vergleich zur Körsch geringer ist (Honnen et al., 1999b), sind die vorhandenen subletalen Schadstoffkonzentrationen ausreichend, cytologische Effekte *in vitro*, aber nicht *in vivo* zu induzieren. Außerdem handelt es sich um zwei unterschiedliche Fischarten mit einer möglicherweise artspezifischen Reaktion und Empfindlichkeit auf Schadstoffbelastung. Das komplexere Schadbild der Körschwasser belasteten Hepatocyten läßt sich als cytologische Reaktion auf die umfangreichere Schadstoffbelastung der Körsch mit Schwermetallen, PAHs und vor allem Pestiziden werten.

Da der Krähenbach im Vergleich zur Körsch geringer kontaminiert ist und Schadstoffe an Schwebstoffe adsorbieren und zu einer Entgiftung des Wasserkörpers führen, sind die mit nativem Wasser des Krähenbaches induzierten Effekte in den isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle und der Leber der Embryolarvalstadien des Zebrabärblings überraschend. Dieser positive Befund spricht für den Einsatz der beiden Testsysteme in Kombination mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen als sensitive Detektoren für selbst geringe Spuren an umweltrelevanten Schadstoffen und Schadstoffgemischen.

Nach Betrachtung der ELS-Test Befunde lassen sich für den Krähenbach, aber vor allem für die Körsch einige Wasser-induzierte Veränderungen beschreiben. Der Kern ist einer der Angriffsorte.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

Tab. 7.3: Vergleich cytopathologischer Effekte, die in der Leber larvaler Zebraärblinge und isolierter Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Krähenbach und Körsch Wasser gefunden wurden.

	<i>In vitro</i> Krähenb.	<i>In vivo</i> Krähenb.	<i>In vitro</i> Körsch	<i>In vivo</i> Körsch
<b>Kompartimentierung</b>	Verd. 1:3 (1d)	1:1 (8d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
<b>Kern</b>				
Veränderte Kernform		1:1 (4d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Dilatation der Kernhülle	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:3 (1d)	
Heterochromatin Zunahme	Verd. 1:4 (2d)	1:1 (4d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Abnahme von Nucleoli	Verd. 1:4 (1d)		Verd. 1:4 (1d)	
Lageveränderung			Verd. 1:4 (1d)	1:1 (8d)
<b>Mitochondrien</b>				
Erhöhte Heterogenität	Verd. 1:3 (2d)	1:1 (4d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Auflösung der Cristae	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Akkumulationen	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:4 (1d)	
Myelinsakkumulation		1:1 (8d)		1:1 (4d)
<b>RER</b>				
Abnahme der RER-Menge		1:1 (8d)	Verd. 1:3 (2d)	1:1 (8d)
Abnahme der Stapelbildung	Verd. 1:4 (2d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Dilatation			Verd. 1:3 (2d)	
Fragmentierung	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)	Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
<b>SER</b>				
Zunahme der SER-Menge	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:3 (1d)	
<b>Golgi-Felder</b>				
Dilatation der Zisternen	Verd. 1:4 (1d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Fenestrierung	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Zunahme der Aktivität	Verd. 1:3 (2d)			
Abnahme der Aktivität			Verd. 1:3 (2d)	1:1 (8d)
<b>Lysosomen</b>				
Zunahme von Lysosomen	Verd. 1:3 (1d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Myelinkörper	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:3 (1d)	1:1 (4d)
Multivesikuläre Körper				1:1 (8d)
Vakuolen	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:4 (2d)	1:1 (4d)
<b>Peroxisomen</b>				
Zunahme von Peroxisomen	Verd. 1:4 (2d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
Akkumulationen	Verd. 1:3 (2d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (4d)
<b>Lipid</b>				
Zunahme				1:1 (4d)
<b>Glykogen</b>				
Abnahme der Glykogen Menge	Verd. 1:4 (1d)		Verd. 1:4 (1d)	1:1 (8d)
Glykogenkörper		1:1 (4d)		

Daten sind als niedrigste und zeitlich früheste Konzentration des Auftretens eines Effektes angegeben.

## 7. Embryotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

---

Die Zunahme an Heterochromatin könnte im Zusammenhang mit einer Inaktivierung bzw. Veränderung der metabolischen Aktivität des Kernes stehen. Eine Verlagerung des Kernes an die Peripherie läßt sich auf schädigende Wirkung auf das Cytoskelett zurückführen. Die Deformation der Kerngestalt kann als Versuch der Zelle gewertet werden, die Oberfläche zwischen Nucleo- und Cytoplasma zu vergrößern und somit einen Austausch intrazellulären Materials zwischen den beiden Zellkompartimenten zu erleichtern (Zahn & Braunbeck, 1995). Eine Deformation der Kerngestalt zeigte sich auch in der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit folgenden Schadstoffen 4-Chloranilin, Endosulfan, Atrazin, und Linuron (Braunbeck, 1994b). Atrazin ist eines der Pestizide, welches im nativen Wasser der Körsch chemisch nachgewiesen wurden (Honnen et al., 1999b).

Eine Fragmentierung und Vesikulierung der Zisternen des RER, wie sie nach Exposition mit Krähenbach und Körsch Wasser in der Leber der Larven beobachtet werden konnte, kann als morphologischer Ausdruck einer Interaktion zwischen Schadstoffen und zellulärer Proteinsynthese interpretiert werden (Zahn, 1995). Eine vergleichbare Halbfreilanduntersuchung an der Bachforelle (*Salmo trutta*) zeigte in der Leber der Fische nach Hälterung in Körschwasser unterschiedliche ultrastrukturelle Veränderungen wie die Deformation der Kernhülle, aber auch eine Vesikulierung, Fragmentierung und Dilatation des RER (Triebkorn et al., 1997). Dieser cytologische Effekt wurde ebenfalls durch diverse umweltrelevante Monosubstanzen, wie 4-Nitrophenol (Zahn, 1995), Dinitro-*o*-kresol (Zahn & Braunbeck, 1993), 2,4-Dichlorphenol (Zahn & Braunbeck, 1993), 4-Chloranilin (Zahn et al., 1993) in Dauerzelllinien und Primärhepatocyten induziert. Eine starke Vesikulierung des RER trat auch in den Hepatocyten juveniler Regenbogenforellen nach Belastung mit kontaminierten Sedimentextrakten auf (Engwall et al., 1994). Diese cytopathologischen Veränderungen sind als eher unspezifisch zu werten.

Die beschriebene Zunahme von Lysosomen kann als eine unspezifische Reaktion der Leber auf Streß betrachtet werden (Rez, 1986; Salas et al., 1980). Möglicherweise ist die Einwanderung von Makrophagen auf die gleiche Ursache zurückzuführen. Zahn und Braunbeck (1993) führen die Zunahme von Lysosomen und Myelinkörpern auf einen angestiegenen Umsatz von hepatocellulären Komponenten zurück. Der insgesamt erhöhte Lipidgehalt im Cytoplasma weist auf eine gestörte Lipoproteinsynthese oder einen abnormalen Transport von Lipid hin (Phillips et al., 1987). Die dilatierten Zisternen des Golgi-Apparates könnten dabei eine bedeutende Rolle spielen. Da Peroxisomen neben der Entgiftung von Wasserstoffperoxid auch am Lipidstoffwechsel beteiligt sind, könnte daher die beobachtete Zunahme von Peroxisomen als sekundäre Antwort der Hepatocyten auf den Fettabbau betrachtet werden (Zahn, 1995).

Die vorliegende Untersuchung belegt die Eignung von ELS-Tests mit Zebrabärblingen zum Nachweis des embryotoxikologischen Potentials von selbst geringen Volumina komplex belasteter Umweltproben. Nach Exposition der embryolarvalen Fühstadien mit Wasser und Sediment waren vor allem bei der Körsch zahlreiche Effekte zu beobachten. Die Befunde können einen erklärenden Beitrag zur Frage leisten, weshalb es in der Körsch in den letzten Jahren zu keiner Reproduktion der Bachforelle (*Salmo trutta*) kam.