

1. Einleitung

Gesetzliche Grundlagen

In unserer hochindustrialisierten Welt hat in den letzten Jahrzehnten die Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzung Ausmaße angenommen, daß Gesetze zur Begrenzung der Umweltverschmutzung und die Entwicklung von Testsystemen zur Erforschung der Auswirkungen von Chemikalien notwendig wurden.

Wasser als Lebensraum für aquatische Organismen und Biozönosen und vor allem als Lebensmittel für den Menschen ist ein lebensnotwendiges und schützenswertes Gut. Wassergefährdende Stoffe und Gewässereinleitungen müssen nach internationalen Richtlinien oder nationalen Gesetzen wie dem deutschen Chemikaliengesetz (Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen; 1980) und Wasserhaushaltsgesetz (WHG, 1986) auf akute Toxizität getestet werden. Nach dem Chemikaliengesetz sind zur Beurteilung von Stoffen neben toxikologischen Effekten auch ökotoxikologische Wirkungen auf Bakterien, Algen, Wasserflöhe und Fische zu erfassen (Rudolph & Boje, 1986). Im "akuten Fischttest" wird eine festgelegte Anzahl von Fischen über einen Zeitraum von 48 bis 96 Stunden verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Chemikalie ausgesetzt, und es wird die Konzentration ermittelt, bei der 50 % aller eingesetzter Versuchstiere sterben (LC₅₀-Test). Weiterhin werden im "verlängerten Fischttest" Schwellenkonzentrationen der zu untersuchenden Substanzen ermittelt, bei denen subletale Effekte (No Observed Effective Concentration, NOEC) nicht mehr zu verzeichnen sind. Auf der zweiten Stufe des Chemikaliengesetzes werden u.a. Untersuchungen zum Einfluß der Chemikalien auf die Reproduktion der Tiere verlangt.

Im American Chemical Society's Service von 1990 waren bereits über 10 Millionen chemische Substanzen dokumentiert. In der Bundesrepublik werden ca. 30.000 Chemikalien produziert, von denen ca. 5000 in Mengen über 10 t pro Jahr hergestellt werden (Streit, 1994; Steinhäuser, 1996) und potentiell in Fließgewässer gelangen können. Aufgrund von Emissionen aus Landwirtschaft, Industrie und Besiedlung gelangen teilweise erhebliche Mengen an Pestiziden, PAHs (polyaromatische Kohlenwasserstoffe), PCBs (polychlorierte Biphenyle) und Schwermetallen entweder durch Oberflächenabfluß (Runoff) und Drainagen des angrenzenden Umlandes, durch Sickerwasser und atmosphärischen Eintrag sowie durch Abwassereinleitungen in Fließgewässer.

Kontaminiertes Sediment - Ein ökologisches Risiko?

Eine rein chemische Analyse der kontaminierten Gewässer-Kompartimente erscheint aus verschiedenen Gründen unbefriedigend. Einerseits ist eine vollständige chemische Datenerfassung bei ca. 63000 im Gebrauch befindlichen Substanzen aussichtslos (Ahlf et al., 1991), andererseits ist die Aussagekraft von chemischen Analysen für biologische Wirkungen unbefriedigend, da weniger als 1 % der produzierten chemischen Stoffe auf ihre Toxizität für aquatische Organismen untersucht sind (Martell et al., 1988). Deswegen können Aussagen zur biologischen Wirkung chemischer Substanzen nur mit Hilfe von Biotests ermittelt werden. Für die Beurteilung der Belastung von Gewässern durch Schadstoffe und ihre biologische Wirksamkeit ist eine Kontrolle nur der Wassersäule (Isomaa et al., 1994; Stahl 1991; Helma et al., 1994, 1996), d.h. der gelösten Wasserinhaltsstoffe nicht ausreichend (Brunström et al., 1992; Engwall et al., 1996; Kwan & Dutka, 1990). Da viele Schadstoffe, insbesondere Schwermetalle, PCBs und PAHs an Schwebstoffe adsorbieren und damit bei abnehmender Fließgeschwindigkeit im Sediment abgelagert werden (Brunström et al., 1992; Engwall et al., 1996; Glück-

1. Einleitung

Macholdt & Lieser, 1988; Hellmann, 1996; Sengutta, 1993; Westrich, 1988), ist für eine umfassende Kontrolle der biologischen Wirksamkeit die Berücksichtigung der beiden Kompartimente Sediment und Schwebstoff ebenfalls erforderlich (Ahlf, 1995; Burton, 1991; Burton & MacPherson, 1995; Förstner et al., 1989). Durch den Prozeß der Sedimentation wird der Wasserkörper "detoxifiziert", jedoch das Sediment kontaminiert. Nach Ahlf (1995) wird die Sedimenttoxizität als "ökologische und biologische Änderung definiert, die durch kontaminiertes Sediment verursacht wird bzw. als negative Wirkung an einem Testorganismus, der einem belasteten Sediment ausgesetzt wurde". Unter veränderten hydrophysikalischen, -chemischen und -biologischen Bedingungen können diese Stoffe remobilisiert werden und zu akuten und/oder chronischen Schadeffekten an Organismen führen (Huggett et al., 1992b; McMahon et al., 1990; Reynoldson & Zarull, 1989; Skalsi, 1991; Wirgin et al., 1989). Diese partikelgebundenen Schadstoffe können für benthische Organismen verfügbar werden. Als "bioverfügbar" wird ein Schadstoff betrachtet, dessen Gegenwart im Sediment bzw. seine Mobilisierung vom Sediment zu meßbaren adaptiven oder schädigenden biologischen Effekten in einem Organismus oder einer Nahrungskette einschließlich dieses Organismus führt (ICES, 1992). Die Aufnahme von Schadstoffen in Organismen läßt sich primär als Austauschprozeß zwischen biologischem Gewebe und Wasser bzw. Sediment modellieren. Die Verteilungskoeffizienten der Schadstoffe zwischen der organischen Feststofffraktion und Wasser stehen in einer direkten Beziehung zum Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Schadstoffkonzentrationen im Gewebe von Organismen lassen sich aufgrund der Konzentrationen im Wasser, dem Gewebe-Lipidgehalt und dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten vorhersagen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedlich stark kontaminierte Fließgewässer im Großraum Stuttgart als Modelle ausgewählt (Krähenbach, Körsch), um das ökotoxikologische Schädigungspotential der Kompartimente Wasser und Sediment mit Hilfe biologischer Toxizitätstests zu untersuchen. Dazu wird die Wirkung von künstlichen Schadstoffgemischen, nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigen Eluaten, organischen Extrakten aus Sediment der beiden Fließgewässer Krähenbach und Körsch auf die beiden *In vitro*-Systeme RTG-2-Zellen (vgl. Kapitel 3) sowie Primärhepatocyten (vgl. Kapitel 4-6) der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und *in vivo* auf frühembryonale Stadien des Zebraärbblings (*Danio rerio*; vgl. Kapitel 7) getestet. Anschließend werden die Befunde mit Ergebnissen aus Halbfreilanduntersuchungen sowie chemisch analytischen Daten verglichen. Dabei soll ermittelt werden, ob

- Aussagen zur Toxizität von nativem Wasser und Sediment beider zu untersuchenden Modellfließgewässer getroffen werden können.
- die verschiedenen Kompartimente Wasser und Sediment unterschiedlich starke Toxizität zeigen, (wenn ja, welche?).
- sich Unterschiede in der Toxizität von Wasser und Sediment auf Zellen zwischen den einzelnen Probeterminen feststellen lassen, (ist eine Kontinuität gegeben?).
- Fließgewässer-spezifische Reaktionen in den einzelnen Testsystemen feststellbar sind.
- permanente Zelllinien und Primärhepatocyten aus der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie *Early Life Stage*-Tests mit Zebraärbblingen (*Danio rerio*) prinzipiell als biologische Toxizitätstests geeignet sind, das ökotoxikologische Schädigungspotential von komplex belasteten Umweltproben wie nativem Wasser und Sediment als auch künstlichen Schadstoffgemischen zu ermitteln und bewerten.

1. Einleitung

Bewertung der Sedimentqualität

Angesichts des Gefährdungspotentials kontaminierter Gewässersedimente für die ökologische und menschliche Gesundheit ist die Notwendigkeit unumstritten, die Sedimentqualität ähnlich der Wasserqualität einem Bewertungsverfahren zu unterziehen (Adams et al., 1992; Calmano et al., 1991; Chapman, 1986; Dutka et al., 1990; Förstner, 1983; 1990; Giesy & Hoke, 1990; Krebs 1992; Lee & Jones, 1992; Long & Chapman, 1985; Power et al., 1991; Power & Chapman, 1992). Chapman (1989) begründet die Notwendigkeit der Entwicklung von Sedimentqualitätskriterien als Ergänzung zu den Wasserqualitätskriterien, weil

- (1) die verschiedensten toxischen Schmutzstoffe, die in der Wassersäule nur in Spuren gefunden werden, im Sediment zu erhöhten Konzentrationen akkumulieren;
- (2) Sedimente zum einen ein Reservoir, zum anderen aber auch eine Quelle für die Schadstoffe in der Wassersäule darstellen;
- (3) Sedimente Schadstoffkonzentrationen über die Zeit integrieren, wogegen die Konzentrationen in der Wassersäule sehr viel variabler sind;
- (4) sich Sedimentschadstoffe zusätzlich zu den Schadstoffen in der Wassersäule auf benthische und andere sedimentassoziierte Organismen auswirken können;
- (5) Sedimente integraler Bestandteil der aquatischen Umwelt sind: Sie sind Habitat, Brut- und Aufzuchtgebiet für zahlreiche aquatische Lebewesen.

In den letzten Jahren wurden weltweit verschiedene Konzepte und Strategien entwickelt, um die Schadwirkung kontaminierter Sedimente zu erfassen und Risiken bewerten zu können (Adams et al., 1992; Chapman, 1989; Förstner et al., 1987, 1989; Giesy & Hoke, 1990; Long & Morgan, 1990). Dabei lassen sich folgende Verfahren unterscheiden:

- (1) Chemisch-physikalische Verfahren basieren ausschließlich auf chemisch-physikalischen Methoden (Di Toro et al., 1991; Mudroch et al., 1986; Pavlou, 1987).
- (2) Chemisch/ökotoxikologische Verfahren setzen chemisch-analytische Sedimentdaten in Beziehung zu im Organismus gemessenen Konzentrationen oder zu Biotests mit dotierten Sedimenten (Cairns et al., 1984; Giesy et al., 1990; Giesy & Hoke, 1990).
- (3) Ökologisch/ökotoxikologische Verfahren führen zu biologisch-beschreibenden oder biologisch-numerischen Kriterien (Burton, 1991; Burton et al., 1992; La Point & Fairchild, 1992).
- (4) Integrierte Verfahren umfassen in der Regel Sedimenttoxizitätstests (Tab. 1.1), chemische Sedimentanalysen, Rückstandsanalysen an Organismen, pathologische Untersuchungen und biozönotische Untersuchungen (Chapman, 1986; Chapman et al., 1992; Long & Chapman, 1985).

In der vorliegenden Arbeit soll eine integrierte ökotoxikologische Bewertung des Belastungszustandes von Fließgewässern erstellt werden.

Ebenen biologischer Organisation

Gelöste Wasserinhaltsstoffe sowie sedimentgebundene Schadstoffe können zahlreiche biologische Wirkungen erzeugen: auf organismischer Ebene Mortalität, erbgutverändernde und pathologische Effekte, auf Populations-Ebene Änderungen in Abundanz und Diversität, auf biozönotischer Ebene Änderungen in Struktur und Funktion. Nach Bartholomew (1964) findet jede Organisationsebene ihre mechanistische Erklärung auf der nächstniederen Organisationsebene. Eine Beeinträchtigung des Reproduktionserfolges einer bestimmten Art resultiert etwa aus einer Reihe von Schädigungen auf dem Niveau der Organe. Diese sind Folge von Schädigungen auf zellulärem Niveau, die sich wiederum auf molekulare Mechanismen zurückführen lassen (Braunbeck, 1989).

1. Einleitung

Tab.1.1: Die häufigsten in den USA verwendeten Süßwasser- und Sedimenttoxizitätstests (nach Burton, 1991).

Biologische Stufe/Testobjekt	Testparameter
Phytoplankton <i>Selenastrum capricornutum</i> Natürliches Phytoplankton	Wachstum, ¹⁴ C-Aufnahme Fluoreszenz, strukturspezifische Abundanz
Bakterien/Enzymatische Tests <i>Photobacterium phosphoreum</i> Sediment-Biozönose (Phosphatase) Sediment-Biozönose (Dehydrogenase) Sediment-Biozönose (β-Galactosidase) Sediment-Biozönose (β-Glucosidase)	Lumineszenz Enzym-Aktivität Enzym-Aktivität Enzym-Aktivität Enzym-Aktivität
Zooplankton <i>Colpidium campylum</i> <i>Brachionus spec.</i> Protozoen-Kolonie	Wachstum Überleben Struktur-Indizes, Respiration
Kleinkrebse <i>Daphnia magna</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Überleben, Reproduktion Überleben, Reproduktion
Benthische Invertebraten <i>Panagrellus redivivus</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Tubifex tubifex</i> <i>Stylodrilus heringianus</i> <i>Hyalella azteca</i> <i>Pontoporeia hoyi (Diporeia spec.)</i> <i>Corbicula fluminea</i> <i>Anodonta imbecilis</i> <i>Chironomus tentans</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Hexagenia limbata</i> Macrobenthische Biozönose	Überleben, Wachstum, Häutung Überleben Überleben Überleben, Meideverhalten, sedimentverarbeitungsrate, Wachstum Überleben, Wachstum, Reproduktion Überleben, Meideverhalten Überleben, Wachstum Überleben Überleben, Wachstum, Schlüpfen Überleben, Wachstum Überleben, Häutungshäufigkeit Biozönosen-, Populationsindizes
Amphibien <i>Xenopus laevis</i>	Überleben der Embryonen/Larven
Fische <i>Pimephales promelas</i>	Überleben der Embryonen/Larven, Teratogenität
Macrophyten <i>Lemna minor</i> <i>Hydrilla verticillata</i>	Wachstum (Blattzahl), Chlorophyll a, Biomasse, Trieblänge, Wurzellänge, Dehydrogenaseaktivität, Chlorophyll a, Peroxidasen

Somit ist funktionell der Angriffspunkt von Schadstoffen auf molekularer Ebene und strukturell auf dem Niveau von Zelle und Zellorganellen zu suchen. Der hohen ökologischen Relevanz von Untersuchungen auf Populations- und Ökosystemniveau stehen somit die Vorteile von Untersuchungen auf niedrigerer Ebene in Form der erhöhten Geschwindigkeit auf der molekularen Ebene und der größeren Empfindlichkeit von Nachweisen auf der Zellebene gegenüber (Braunbeck, 1989, 1994a; Burton, 1991). Für die vorliegende Arbeit ergeben sich somit die Fragen:

1. Einleitung

- Können Aussagen zum Wirkmechanismus einzelner in den Modellfließgewässern vorkommender Schadstoffe bzw. Schadstoffgruppen gemacht werden?
- Ist eine ökologische Relevanz der Ergebnisse für höhere Organisationsebenen gegeben?

Einsatz von Biomarkern

Zur Aufklärung chemikalienbedingter Schäden in Organismen wurde in den 80er Jahren in den USA das Konzept des Biomarkers entwickelt (Hinton & Laurén, 1990; Huggett et al., 1992a; McCarty & Shugart, 1990; Peakall, 1992). Als Biomarker werden Parameter definiert, die sich besonders als biologische Kenngrößen für die Belastung von Organismen durch Umweltchemikalien eignen (Braunbeck, 1995). Nach McCarty und Shugart (1990) eignen sich prinzipiell alle Strukturen und Funktionen lebendiger Systeme als Biomarker, sofern sie nur meßbar sind, ursächlich mit dem Schadstoff zusammenhängen und durch Veränderungen auf der Ebene von Molekülen, Organellen, Zellen, Organen, Individuen, Populationen oder Ökosystemen die vorausgegangene Exposition anzeigen. Eine Zusammenstellung von Biomarkern zur Bewertung kontaminierter Sedimente ist in Tabelle 1.2 zusammengefaßt. Eine zentrale Stellung bei Aufnahme, Akkumulation, Biotransformation und Entgiftung von Xenobiotika nimmt neben der Funktion als lebenswichtiges Stoffwechselorgan bei Wirbeltieren die Leber ein (Arias et al., 1988; Gingerich et al., 1982; Meyers & Hendricks, 1985). Zahlreiche *In vivo*- und *In vitro*-Untersuchungen mit unterschiedlichen Wirbeltieren und Endpunkten bestätigen die Eignung von Hepatocyten zum Biomonitoring von Schadstoffen und Schadstoffgemischen (Arnold & Braunbeck, 1994; Baksi & Frazier, 1990; Braunbeck, 1994 b; Braunbeck et al., 1990a,b; Gagné & Blaise, 1995; Oulmi et al., 1995a,b; Schnurstein et al., 1998; Strmac & Braunbeck, 1999; Zahn et al., 1995). Dabei konnten in der Fischleber von Zebrabärbling (*Danio rerio*; Braunbeck et al., 1989, 1990a, 1992a), Aal (*Anguilla anguilla*; Arnold & Braunbeck, 1994; Braunbeck & Völkl, 1991; Braunbeck et al., 1990b), Goldorfe (*Leuciscus idus melanotus*; Braunbeck & Völkl, 1993) und Reiskärppling (*Oryzias latipes*; Braunbeck et al., 1992b) sowie in isolierten Hepatocyten von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Braunbeck, 1993a; Zahn & Braunbeck, 1993) eine Vielzahl von adaptiven und degenerativen Effekten beschrieben werden.

Zellkulturen als Testsysteme

Zur Untersuchung der aquatischen Schadstoffbelastung werden Zellkulturen aus Fischen bereits seit längerer Zeit eingesetzt. Dabei lassen sich zwei Systeme unterscheiden: permanente Fischzelllinien und Primärkulturen von Hepatocyten (Ahne, 1985; Babich & Borenfreund, 1991; Baksi & Frazier, 1990; Blair et al., 1990; Braunbeck & Storch, 1992). Gerade Zellkulturen bieten neben ethischen Erwägungen im Vergleich zu *In vivo*-Tests einige wissenschaftliche Vorteile, wie:

- (1) Verminderung der Versuchstierzahl
- (2) Minimierung von Versuchsaufwand, Kosten und Zeit
- (3) Standardisierbarkeit der experimentellen Bedingungen
- (4) Ausschluß der individuellen Variabilität
- (5) Vereinfachung der Versuchsanordnung
- (6) zügige Versuchsdurchführung
- (7) geringer Personalaufwand

1. Einleitung

Tab.1.2: Zusammenstellung von Biomarkern in der Risikobewertung kontaminierter Sedimente (nach Benson & Di Giulio, 1992).

Biochemie

-Biotransformationsenzyme

Phase I-System: Art- und stoffspezifische Induktion von Enzymen aus der Gruppe der mischfunktionellen Oxydasen oder Monooxygenasen (Induktion des Cytochrom P-450)

-Metallothioneine, Phytochelatine

Induktion von metallbindenden Proteinen durch eine Reihe von Schwermetallen (z.B. Cu, Zn, Cd etc.)

-Streßproteine

Hitzeschockproteine (Induktion durch Hitze, Sauerstoff-, Salinitätsverhältnisse und Umweltkontaminanten)

Glucose-regulierte Enzyme (Induktion durch Glucose- oder Sauerstoffmangel und Umweltkontaminanten)

-Oxidativer Streß

Schadefekte an Zellen aufgrund von Sauerstoffradikalen bei Störung der Bildung von Antioxidantien (z.B. Glutathion) durch Xenobiotica (z.B. aromatische Diole und Quinone, Nitroaromaten, aromatische Hydroxylamine, Bipyridyle und verschiedene Chelatkomplexe der Übergangsmetalle)

Mutagenität/Gentoxizität

-Nucleotid-/DNA-Ebene

Ermittlung der Bildung von DNA-Addukten (PPL = phosphorous-32-postlabeling)

Ermittlung der DNA-Strangbrüche durch Bestimmung der Entspiralisierungsrates der DNA

Nucleosid-Quantifizierung (z.B. 5-Methyldeoxycytidin)

Messung der oxidierten Basen (z.B. 8-Hydroxydesoxyguanosin)

-Genomebene

chromosomale Analysen für Aberrationen, Schwester-Chromatidaustausch und Micronucleusbildung.

-Oncogennachweis

Immunologie

-Makrophagen-Funktion

-Messung der hormonalen oder Antikörperkonzentrationen

Physiologie

-Corticosteroidstoffwechsel

-Glykogen-, Lipidstoffwechsel

-Blutchemie

-RNA/DNA-Verhältnis

Histologie/Histopathologie

-histologische Änderungen in Leberzellen von Fischen

-Neoplasmen

1. Einleitung

Da diverse Studien an der Leber von Fischen die Eignung ultrastruktureller Kriterien zur Bewertung der Fischtoxizität von Schadstoffen im subletalen Bereich belegen (Braunbeck & Segner, 1992; Braunbeck & Völkl, 1991; 1993; Braunbeck et al., 1989; 1990a; Braunbeck et al., 1992a,b; Hinton et al., 1978; 1987; Klaunig et al., 1979; Lipsky et al., 1978; Rojik et al., 1983) und die Zelle als kleinste lebensfähige Einheit als ein geeigneter Indikator für Umweltstreß zu sehen ist (Braunbeck & Storch, 1990; Storch, 1985), werden in der vorliegenden Arbeit neben den qualitativen auch semiquantitative Erhebungen in isolierten Hepatocyten bzw. Leber durchgeführt, um die cytopathologischen Effekte (vgl. Kapitel 4.3, 5) zu erfassen.

Ergänzend wurden verschiedene Markerenzyme (vgl. Kapitel 4.2) gemessen, um die strukturellen Befunde mit funktionellen Parametern zu korrelieren und sowohl die Wirkmechanismen als auch die synergistischen und antagonistischen Effekte (Verstärkung oder Reduzierung der toxischen Wirkung von Stoffgemischen) von komplexen Schadstoffgemischen aufzuklären. Um den Einfluß von Schadstoffgemischen mit bekannter Zusammensetzung auf die isolierten Hepatocyten zu prüfen, wurden 2 Schadstoffgemische erstellt, auf die Zellen gegeben und auf ultrastrukturelle sowie biochemische Veränderungen untersucht. Weiterhin werden Primärhepatocyten eingesetzt, um das gentoxische Potential (vgl. Kapitel 6) der beiden Modell-Gewässer zu erfassen. Dabei soll untersucht werden, ob

- ein gentoxisches Potential im Wasser und Sediment der beiden Gewässer gegeben ist.
- sich permanente Zelllinien (RTG-2) oder Primärzellkulturen (isolierte Hepatocyten) besser für toxikologische Untersuchungen an komplexen Matrices (Umweltproben, Schadstoffgemischen) eignen.
- Übereinstimmungen oder Unterschiede im Reaktionsmuster von Primärhepatocyten auf Wasser- bzw. Sedimentproben und verschiedenen Schadstoffcocktails feststellbar sind.
- sich eine Aussage zur Eignung der ausgewählten Biomarker machen läßt.

Early Life Stages als Testsysteme

Als eine weitere Alternative zum "Fischttest" werden schon seit längerem frühembryonale Lebensstadien von Fischen als empfindliches Testsystem herangezogen, um die Wirkung umweltrelevanter Schadstoffe zu testen (*Early Life-Stages Tests* ELS; McKim, 1977). Obwohl diese Experimente ein Wirbeltier betreffen, erscheinen sie vertretbar, da die belasteten Fischembryonen im Gegensatz zu den juvenilen bzw. adulten Fischen noch nicht jenen Ausbildungsgrad des Zentralnervensystems erreichen, der Bewußtsein erwarten läßt (Sander & Baumann, 1983). Durch den Einsatz von ELS-Tests lassen sich Rückschlüsse auf die Wirkung von Umweltproben auf den Gesamtorganismus ziehen. Zudem stellt der ELS-Test ein Testsystem dar, welches eine hohe Übertragbarkeit der Befunde auf Freilandorganismen erwarten läßt. Im Rahmen dieser Arbeit können durch den ELS-Test (vgl. Kapitel 7) folgende Fragen beantwortet werden:

- Ist im Wasser und Sediment der beiden Fließgewässer ein embryotoxisches Potential vorhanden?
- Können Ergebnisse aus *In vitro*-Versuchen mit Fischen mit Befunden aus *In vivo*-Versuchen verglichen werden, und läßt sich eine Aussage zur Empfindlichkeit als auch Übertragbarkeit der verschiedenen Testsysteme auf das Freiland machen?

1. Einleitung

Charakterisierung der Modellfließgewässer

Als Modellfließgewässer wurden mit dem Krähenbach (Abb. 1.1) und der Körsch (Abb. 1.2) für die vorliegenden Untersuchungen zwei strukturell ähnliche kleine Fließgewässer im Großraum Stuttgart ausgewählt, die entlang der Mittel- und Unterläufe eine z.T. erhebliche Belastung mit PAHs, PCBs, Pestiziden und Schwermetallen infolge Besiedlung, Industrie, Verkehr (Flughafen Stuttgart) und Landwirtschaft aufweisen. Eine Übersicht des chemischen Belastungszustandes der Kompartimente beider Modellfließgewässer über den gesamten Probezeitraum ist in den Abb. 1.3 - 1.7 dargestellt.

Krähenbach (Abb. 1.1)

Der Krähenbach ist ein natürliches, kleines Fließgewässer mit starken Mäandern. Sein ca. 10 km² großes Einzugsgebiet liegt in einer schwach besiedelten Landschaft, die von Waldbeständen und wenigen landwirtschaftlich genutzten Flächen wie Streuobstwiesen, Acker- und Grünland dominiert werden. Entlang seiner Wegstrecke sind zwei Regenüberlaufbecken, aber keine Kläranlagen zu finden (Triebskorn et al., 1996). Bei einer Breite von 2-3 m weist er eine Tiefe von meist weniger als 1 m auf. Der Bachgrund besteht aus Kies mit größeren Steinen, Sand und Grobschluff. Die ständige Erosion an Sandstein und Muschelkalk macht den Krähenbach zu einem schwach basischen Carbonatgewässer, dessen Wasser als "hart" einzustufen ist (Triebskorn et al., 1996).

In der Fließgewässergütekarte von Baden Württemberg ist der Krähenbach nicht erfaßt, jedoch weisen Untersuchungen innerhalb des Projektes auf eine Einstufung zwischen II (mäßig verschmutzt) und III (stark verschmutzt) hin. Im Krähenbach Wasser lassen sich chemisch überwiegend Schwermetalle wie Zink und Kupfer sowie PAHs nachweisen (Abb. 1.3). Das Sediment zeigt eine konstante Belastung sowohl mit Schwermetallen (Kupfer, Zink, Blei) als auch PAHs und seltener PCBs (Abb. 1.4).

Körsch (Abb. 1.2)

Mit einer Länge von 25 km mündet die Körsch bei Deizisau in den Neckar, so daß ihr 125 km² umfassendes Einzugsgebiet mit Zuflüssen die gesamte Filderebene des Großraums Stuttgart einschließt. Durchschnittlich weist die Körsch eine Wassertiefe von 0,5 m und eine Breite von 3-5 m (maximal 8 m) auf. Aufgrund einer dichten Besiedlung, intensiver Landwirtschaft und lokaler Industrie findet sich eine relativ hohe Zahl an Kläranlagen entlang der Körsch, die eine potentielle Kapazität von über 330.000 Einwohnergleichwerten (ATV-Landesgruppe Baden Württemberg, 1994) aufweisen. Das führt dazu, daß die Körsch bei einer jährlichen Gesamtwasserfracht von 57 Mio. m³ durch etwa 20,4 Mio. m³ geklärter Abwasser belastet wird. Dies sind rund 35,8 % der Gesamtwasserfracht (Triebskorn et al., 1995). Weiterhin sind am Oberlauf der Körsch ca. 40 Regenüberlaufbecken und Regenüberläufe zu zählen, die als Auffangbecken von Wasserstößen bei Starkregen zwar die Vorfluter der Klärwerke entlasten, die Körsch jedoch zusätzlich belasten (Triebskorn et al., 1996).

In langsam strömenden Abschnitten kommt es zu Schlamm- und Sandablagerungen (Sedimentation), stellenweise wurde der Gewässergrund der teilweise noch mäandrierenden Körsch künstlich befestigt. Die Basis der Filderebene stellt eine Kalk-Sandsteinplatte (Relikt des Liasmeeres) dar (Frank, 1960), in die sich die Körsch langsam hineingegraben hat. So ist ihr Wasser, bedingt durch die Geologie des Untergrundes und den im Wasser gelösten Kalk, bezogen auf die Wasserhärte ebenfalls als "hart" einzustufen (Triebskorn et al., 1996).

1. Einleitung



Abb. 1.1: Der Krähenbach liegt in einer schwach besiedelten Landschaft, die von Waldbeständen und wenigen landwirtschaftlich genutzten Flächen dominiert wird.

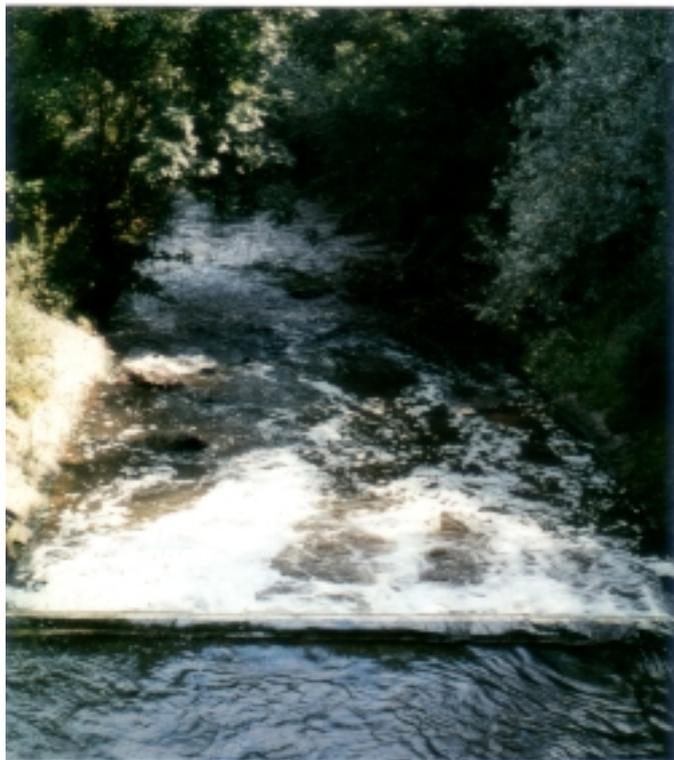


Abb. 1.2: Die Körsch liegt in einem dicht besiedelten Gebiet mit intensiver Landwirtschaft und lokaler Industrie.

1. Einleitung

In der Gütekarte der Fließgewässer Baden Württemberg wurde die Körsch mit Güteklasse III (stark verschmutzt) eingestuft, der in sie einmündende Sulzbach sogar mit Güteklasse III-IV (sehr stark verschmutzt). Das Körschwasser (Abb. 1.5) zeigt eine Belastung mit Schwermetallen wie Kupfer und Zink sowie PAHs und diversen Pestiziden (Atrazin, Lindan, Pentachlorphenol, Pirimicarb). Das Körsch-Sediment (Abb. 1.6, 1.7) weist eine Kontamination mit verschiedenen Schadstoffgruppen auf wie Pflanzenschutzmitteln (Lindan, HCB, DDT, DDE), Schwermetallen (Kupfer, Zink, Blei, Cadmium), PCBs und PAHs.

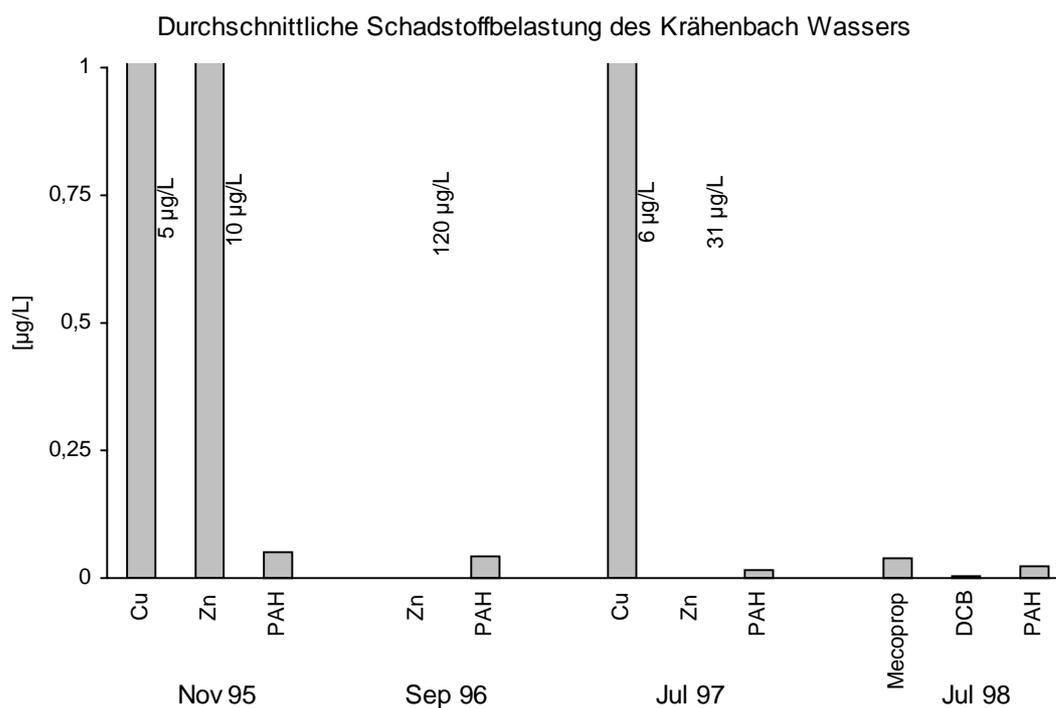


Abb.1.3: Durchschnittliche Schadstoffbelastung des Krähenbach Wassers zu den Probennahmeterminen von November 1995 bis Juli 1998. Abkürzungen: Cu = Kupfer, Zn = Zink, PAH = polyaromatische Kohlenwasserstoffe, DCB = Dichlorbenzol (Frahne et al., 1996, Honnen et al., 1997, 1998,1999a).

1. Einleitung

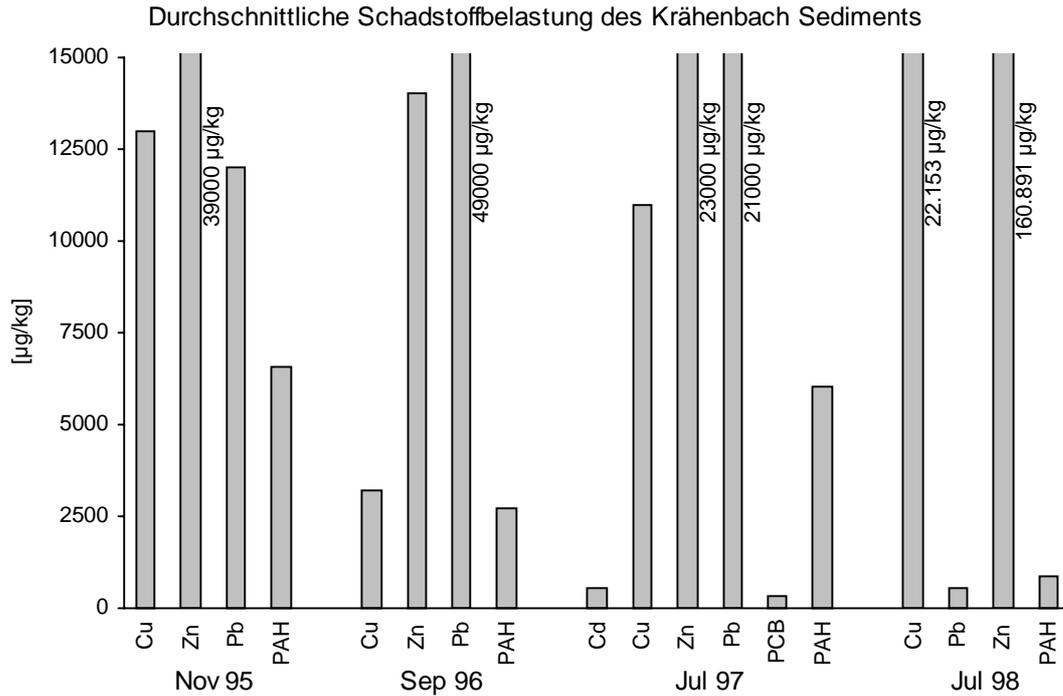


Abb. 1.4: Durchschnittliche Schadstoffbelastung des Krähenbach Sediments zu den Probennahmeterminen von November 1995 bis Juli 1998. Abkürzungen: Cu = Kupfer, Zn = Zink, Pb = Blei, Cd = Cadmium, PCB = polychlorierte Biphenyle, PAH = polyaromatische Kohlenwasserstoffe (Frahne et al., 1996, Honnen et al., 1997, 1998, 1999a).

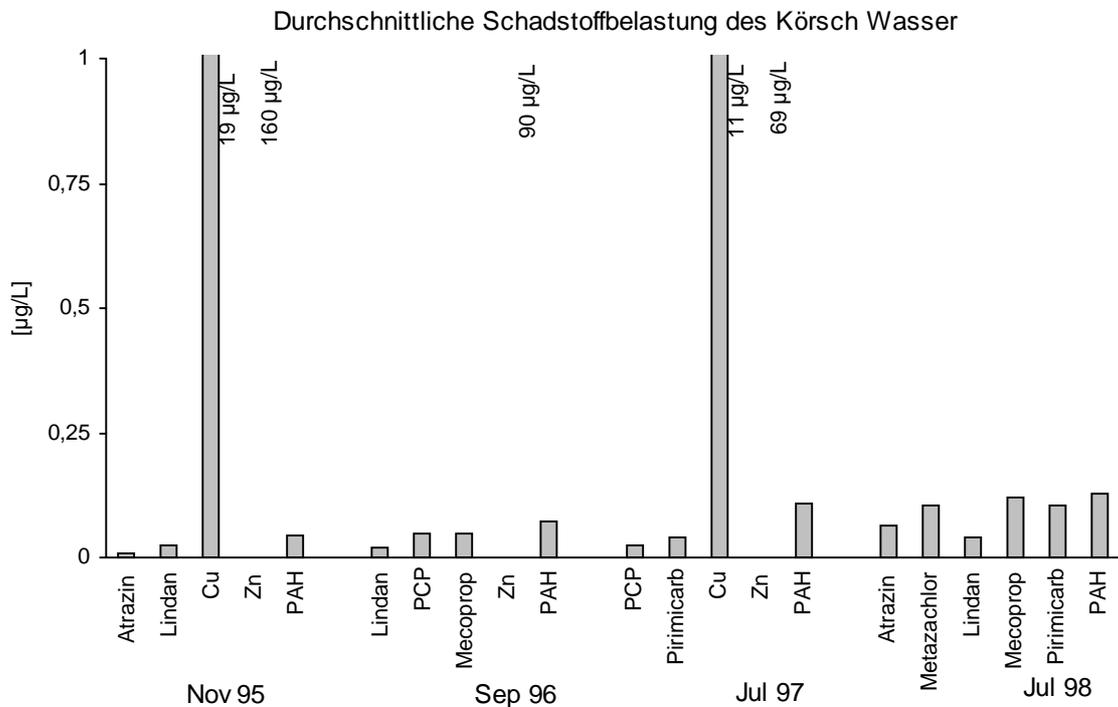


Abb. 1.5: Durchschnittliche Schadstoffbelastung des Körsch Wassers zu den Probennahmeterminen von November 1995 bis Juli 1998. Abkürzungen: Cu = Kupfer, Zn = Zink, PAH = polyaromatische Kohlenwasserstoffe, PCP = Pentachlorphenol (Frahne et al., 1996, Honnen et al., 1997, 1998, 1999a).

1. Einleitung

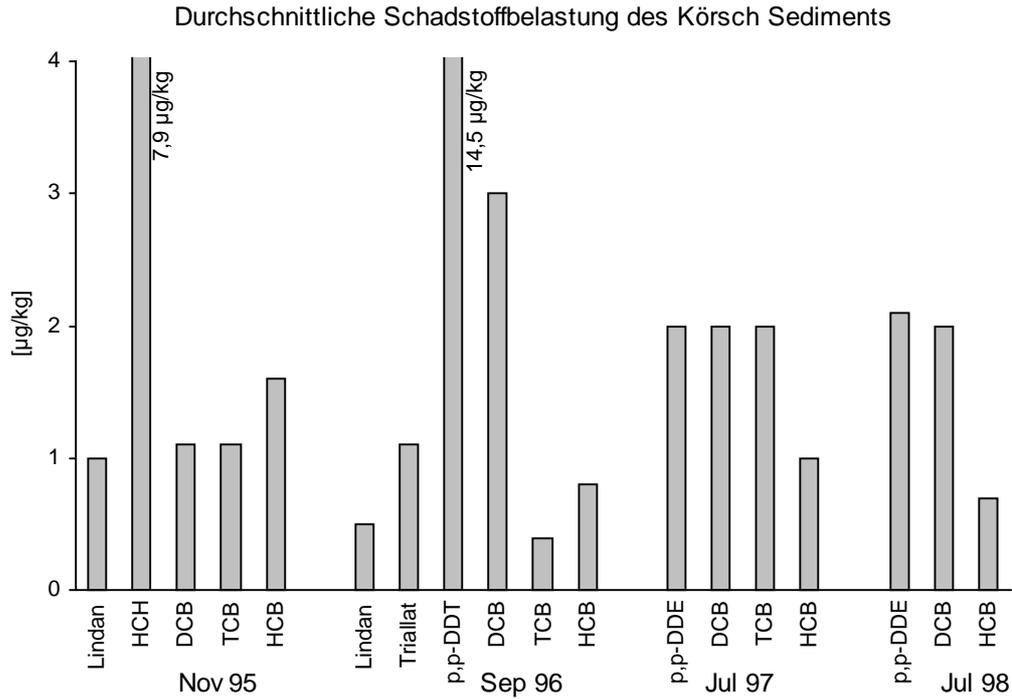


Abb. 1.6: Durchschnittliche Belastung des Korsch Sediments mit Pflanzenschutzmitteln zu den Probenahmenterminen von November 1995 bis Juli 1998. Abkürzungen: HCH = Hexachlorcyclohexan, DCB = Dichlorbenzol, TCB = Trichlorbenzol, HCB = Hexachlorbenzol (Frahne et al., 1996, Honnen et al., 1997, 1998, 1999a).

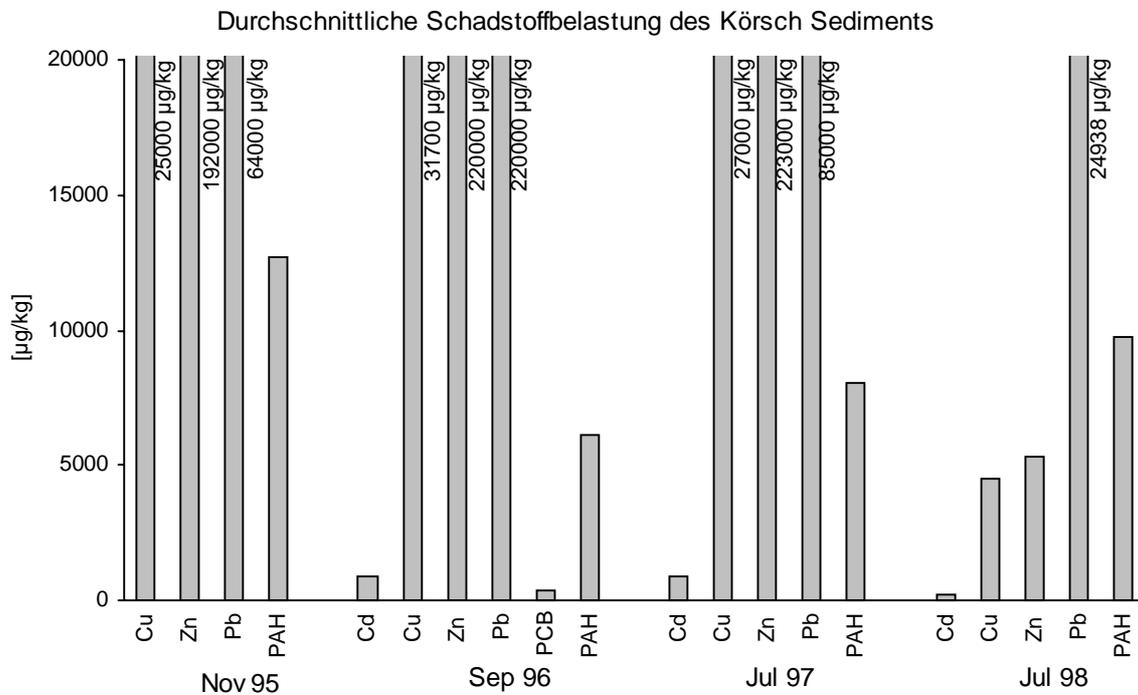


Abb. 1.7: Durchschnittliche Belastung des Korsch Sediments mit PAH's, PCB's und Schwermetallen zu den Probenahmenterminen von November 1995 bis Juli 1998. Abkürzungen: Cu = Kupfer, Cd = Cadmium, Zn = Zink, Pb = Blei, PAH = polyaromatische Kohlenwasserstoffe, PCB = polychlorierte Biphenyle (Frahne et al., 1996, Honnen et al., 1997, 1998, 1999a).

1. Einleitung

Zielsetzung der Untersuchungen

Die vorliegende Dissertation war eingebunden in das BMBF-Verbundprojekt "*Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.*" Übergreifendes Ziel des BMBF-Verbundprojektes ist es, durch simultanen Einsatz zahlreicher biologischer Tests sowie chemisch-analytischer, limnologisch-hydrologischer und mathematisch-statistischer Methoden ein Biotestset zu etablieren, welches zur ökotoxikologischen Diagnostik von Belastungszuständen in kleinen Fließgewässern einsetzbar ist.

In der vorliegenden Arbeit soll durch den Einsatz schnell durchzuführender Zell- und *Early Life Stages*-Tests ein biologisches Testset entwickelt werden, um das cyto-, gen- und embryotoxische Potential von Wasser und Sediment in Fließgewässern zu erfassen und zu bewerten. Die Durchführung von Tierversuchen bewirkt nicht nur einen hohen Aufwand und Verbrauch von Versuchstieren, sondern auch eine geringe Standardisierung der Versuchsbedingungen. Durch den Einsatz von alternativen Testsystemen soll die Anzahl von Versuchstieren einerseits vermindert, andererseits der Versuchs-, Kosten- und Zeitaufwand minimiert und die experimentellen Bedingungen standardisiert werden. Außerdem können bei Elutions- und Extraktionsverfahren von Sediment nur sehr kleine Eluat- und Extraktvolumina gewonnen werden, so daß sich *In vitro*- und ELS-Tests für diese Untersuchungen anbieten.

Schließlich sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich Einschätzungen zum Belastungszustand der beiden Modellfließgewässer geben?
- Können Korrelationen zwischen den biologischen Befunden und chemisch-analytischen Daten festgestellt werden?
- Läßt sich ein Schema zur integrierten, ökotoxikologischen Bewertung des Belastungszustandes von Fließgewässern erstellen?

1. Einleitung
