Entwicklung eines kombinierten Untersuchungssystems für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung von Fließgewässersedimenten und -schwebstoffen

Henner Hollert

Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg
2001

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplombiologe und Geograph (LA) Henner Hollert
aus Bensheim

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Entwicklung eines kombinierten Untersuchungssystems für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung von Fließgewässersedimenten und -schwebstoffen

Gutachter: HD Dr. Thomas Braunbeck
Prof. Dr. Heinz Karrasch

Für Malin,
Felix und Florentin

Danksagung

Meinem Mentor Herrn HD Dr. Thomas Braunbeck möchte ich für seine stete Förderung und die Möglichkeit danken, eine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie anzufertigen. Danke für den großen Freiraum, diese Arbeit ganz nach meinen Vorstellungen anfertigen zu können, und mich zugleich *pars pro toto* an die Erstellung von wissenschaftlichen Vorträgen, druckreifer Manuskripte, von Drittmittelanträgen und wissenschaftlicher Projektarbeit herangeführt zu haben. Besonders danken möchte ich ihm für die wertvollen Hilfen und freundschaftlichen Ratschläge zur Bewältigung meiner neuen Aufgaben in Lehre und Verwaltung, die mir nach Wechsel in ein Beschäftigungsverhältnis als Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Heidelberg erwuchsen.

Herrn Prof. Dr. Heinz Karrasch möchte ich für die Übernahme des Koreferats und sein stetes Interesse an dieser Arbeit danken, insbesondere für die Möglichkeit, dass unter seiner Anleitung eine geographische Diplomarbeit in das Promotionsprojekt integriert werden konnte. Ihm sei dafür gedankt, mir schon im Studium vorgeführt zu haben, was interdisziplinäre Arbeit und Ökologie alles bedeuten kann.

Herrn Prof. Dr. Storch, der nun seit mehr als einem Jahr mein neuer Arbeitgeber ist, möchte ich für das in mich gesetzte Vertrauen, den eingeräumten Freiraum und die Heranführung an die Lehre danken.

Eine interdisziplinäre Arbeit zu schreiben heißt, mit vielen Personen zusammenzuarbeiten und von vielen etwas lernen zu können. Zugleich bedeutet es, dass eine solche Danksagung viel zu wenig Platz birgt, für all den Dank, den man gerne aussprechen möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Chem. Matthias Dürr, der mir seit meiner Diplomarbeit, dann als Condoktorand aber auch nach seinem Wechsel an das Hygiene-Institut in Halle ein kompetenter Ratgeber, großartiger Kooperationspartner und lieber Freund ist. Ohne seine stete Unterstützung und das unkomplizierte Bereitstellen auch von unpublizierten Daten hätte diese Studie nicht in dieser Breite angefertigt werden können.

Insbesondere all denen, die im Rahmen dieses Promotionsprojektes ihre Diplom- und Staatsexamensarbeiten angefertigt haben, sei ganz besonders herzlich gedankt. Nur durch ihre engagierten Arbeiten konnte der integrative Charakter dieses Projektes angemessen verwirklicht werden. Im Einzelnen sei Ingrid Siebert (Makrozoobenthos kleiner Einzugsgebiete, endokrine Wirksamkeit bei einer Triade), Ute Karaus (Makrozoobenthos mittlerer/großer Einzugsgebiete, Comet-Assay bei einer Triade), Natalie Winn (Bakterienkontakttest, Hochwasseruntersuchungen), Marc Rudolf (Etablierung des Fischeitests mit nativen Sedimenten) und Bernhard Wetterauer (Endokrine Untersuchungen an Bioassay-dirigierten Fraktionierungen der Triade und Hochwasserschwebstoffen) gedankt, insbesondere für die nette Atmosphäre unter uns Schlammwühlern. Ute Karaus möchte ich dafür danken, dass Sie auch nach Ihrem Wechsel an die EAWAG (Schweiz) als freundschaftlicher Ratgeber zu Fragen des Makrozoobenthos zur Verfügung stand.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Volker Garke, Christine Jäckh, Mahal Nadarajah, Aliana Hörhager, Vanessa Ladewig und Britta Pätzold, die als wissenschaftliche Hilfskräfte oder im Rahmen eines Laborpraktikums einige wichtige praktischen Arbeiten durchgeführt haben.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie möchte ich allen danken, insbesondere Herrn Dr. Markus Islinger dafür, dass er immer über den Dingen stand, keine Berührungsängste vor einer Zusammenarbeit hatte und für mich ein freundschaftlicher Ratgeber in Fragen seines Spezialgebietes war. Ohne seine stete und kompetente Unterstützung, hätte der Aspekt endokrine Wirkung nicht in diesem Maße in das Projekt integriert werden können. Auch Sascha Pawlowski und Herrn Dr. Andreas Schnurstein sei für Ihre Hilfsbereitschaft im Rahmen des Dot-Blots und Comet-Assays gedankt.

Wertvolle Unterstützung nicht nur bei wissenschaftlichen Fragestellungen erhielt ich in der Arbeitsgruppe auch von Bernhard Glass, Thorsten Uhde, Markus Ulrich, Beate Kemink, Alexander Froschauer, Frau Dr. Susanne Knörr sowie am Institut von Herrn Dr. Berndt Hoese, Gisela Adam und Gabriele van der Linden. Herrn Hoese sei besonders für freundschaftliche Ratschläge und das geduldige Gegenlesen des Manuskriptes gedankt.

Am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg möchte ich Herrn Dr. Lothar Erdinger danken, weite Teile der praktischen Arbeiten in seinen Labors durchgeführt haben zu können, und für seine unkonventionelle Art, komplexe chemische Zusammenhänge darzustellen. Blanka Novak und Ute Riffler-Kleis sei für die praktische Durchführung zahlreicher Ames-Tests und Mechthild Stauder für die Unterstützung bei atomabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen und limnochemischen Messungen gedankt. Den genannten Personen und auch allen anderen Mitarbeitern des Chemielabors sei für die herzliche Atmosphäre gedankt und natürlich für den richtig guten Kaffee, ohne die die Hochwasserbeprobungen und –untersuchungen sicherlich schwieriger gewesen wären.

An der TU Hamburg-Harburg möchte ich Herrn PD Dr. Wolfgang Ahlf danken, der dieses Promotionsprojekt von Anfang an begleitet hat und nicht nur *Arthrobacter*-Bakterien, sondern auch viele sehr wertvolle

Tipps zur Sedimenttoxikologie zur Verfügung gestellt hat. Hermann Gratzer und Frau Dr. Susanne Heise sei besonders für Ihre herzliche Gastfreundschaft, die Einweisung in den Bakterienkontakttest, die Durchführung einiger Untersuchungen mit der Hamburger Biotestbatterie, die theoretische und praktische Einweisung in die Fuzzy Logic und die Hamburger Kneipenszene sowie für angeregte Diskussionen gedankt.

Am Institut für Wasserbau in Stuttgart gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bernhard Westrich und Herrn Dr. Ulrich Kern (jetzt Erftverband). Insbesondere Ingo Haag möchte ich für unsere spannende interdisziplinäre Kooperation bezüglich des Remobilisationsrisikos von Neckarsedimenten, das unkomplizierte zur Verfügung stellen auch unpublizierter Daten, seine Gastfreundschaft und für viele angeregte Diskussionen danken.

Am Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle gilt mein Dank Herrn Dr. Werner Brack, der mir ein lieber Kooperationspartner bei der Durchführung Biotest-geleiteter Fraktionierungen und EROD-Untersuchungen geworden ist. Danke auch für den netten Kurzurlaub in New York anlässlich der Jahrestagung der SETAC-Nordamerika.

Am Department of Environmental Toxicology der Universität Uppsala und am MTM-Research Center der Universität Örebro (Schweden) möchte ich allen für einen erfolgreiche Forschungsaufenthalte im Sommer 1999 und Winter 2000 danken. Herrn HD Dr. Magnus Engwall, Helena Olsman, Krister Halldin, Herrn Dr. Rickard Bjerselius und Herrn HD Dr. Björn Brunström möchte ich nicht nur für die kompetente Einweisung und Unterstützung beim Erlernen der Bioassays und TEQ-Kalkulationen danken, sondern auch für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, den Einblick in den schwedischen Way of life, angeregte Diskussionen und Gastfreundschaft.

Herrn Dr. Rainer Brüggemann und Herrn Dr. Stefan Pudenz (am IGB, Berlin) sei für die gelungene praktische Einweisung in die Hasse-Diagramm-Technik gedankt.

Ohne Herrn Dr. Roman Holtey-Weber und Herrn Dr. Heinrich Färber (Hygiene-Institut der Universität Bonn) und ihre Analyse zahlreicher Sediment-, Wasser- und Hochwasserschwebstoffproben hätte die chemische Identifikation endokriner Umweltschadstoffe nicht durchgeführt werden können.

Herrn Dr. HD Bert van Bavel und Herrn Prof. Dr. Mats Tysklind (Universität Umeå, Schweden) sei dafür gedankt, dass im Rahmen eines DAAD-Austauschprojektes von Herrn Matthias Dürr zahlreiche PAH-, PCB-, und PCDD/F-Analysen durchgeführt werden konnten.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Braukmann (LfU Karslruhe, jetzt Universität Kassel-Witzenhausen) möchte ich für die Software zur Analyse des Makrozoobenthos und zahlreiche wertvolle Hilfen, Rüdiger Becker (Umweltamt der Stadt Heidelberg) für Tipps zu Probennahmestandorten, Jens Stork (LfU Karlsruhe) für umfangreiches Probenequipment, Herrn Liening (Kraftwerk Wieblingen) für die Unterstützung bei der Probennahme der Schwebstoffe am Wieblinger Wehr, Gerd Schukraft für die Möglichkeit der Durchführung von Korngrößenanalysen am Geographischen Institut der Universität Heidelberg, Herrn Prof. Dr. Schöler (Institut für Umweltgeochemie der Universität Heidelberg) für die Möglichkeit der Durchführung von TOC-Analysen und das Ausleihen einer Redoxelektrode danken.

Ein Dankeschön möchte ich auch an Herrn Dr. Falk Krebs (BfG Koblenz), Mathias Ricking und Tobias Schulze (beider Freie Universität Berlin), Herrn Dr. Ueli Ochsenbein (Bodenschutzlabor des Kantons Bern, Schweiz) und Frau Dr. Helga Neumann-Hensel (Dr. Fintelmann und Meyer, Hamburg) aussprechen, für große und kleine Hilfeleistungen und Kooperationen, die zwar nur indirekt in dieser Studie dargestellt werden, aber dennoch von großer Bedeutung waren.

Dem Forschungszentrum Karlsruhe möchte ich für die Finanzierung der Studie und dem DAAD für die Förderung eines projektbezogenen Austausches mit den oben genannten schwedischen Instituten danken. Großzügige finanzielle Förderung erhielt ich von der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Malin danke ich für liebevolles Verständnis, konstruktive Ratschläge, Toleranz und stete Hilfsbereitschaft zu jedem Zeitpunkt der Arbeiten an dieser Dissertation, nicht zuletzt beim geduldigen Korrekturlesen des Manuskriptes. Meinen Kindern Felix und Florentin möchte ich dafür danken, dass sie mir immer wieder Prioritäten im Leben vor Augen geführt haben. Ihnen und meiner Frau Malin möchte ich diese Arbeit widmen, in der Hoffnung einen kleinen Beitrag zur Sicherung einer lebenswerteren Umwelt geleistet zu haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7

2 Material und Methoden 19

2.1 Behandlung der Wasserproben 19
2.1.1 Probennahme 19
2.1.2 Weiterverarbeitung im Labor 19
2.1.3 Aufkonzentrierung von Wasserproben 19
2.1.4 Bestimmung limnochemischer und hydrologischer Parameter 20
2.2 Behandlung der Sedimentproben 23
2.2.1 Probennahme 23
2.2.2 Gewinnung von Porenwasser 24
2.2.3 Gefriertrocknung der Proben 24
2.2.4 Elution und Extraktion der Sedimentproben 24
2.2.5 Fraktionierung von acetonischen Extrakten nach pH-Wert 25
2.2.6 Bioassay-dirigierte Fraktionierung mit Säulenchromatographie und HPLC 26
2.2.7 Bestimmung des Wassergehaltes der Proben 28
2.2.8 Bestimmung des Gesamtkohlenstoff- und Gesamtschwefelgehaltes 28
2.2.9 Bestimmung des Carbonatgehaltes und des organischen Kohlenstoffes (TOC) 28
2.2.10 Korngrößenanalyse 28
2.2.11 Schwermetallaufschluss 29
2.3 Behandlung von Schwebstoffen 29
2.3.1 Probennahme 29
2.3.2 Weiterverarbeitung im Labor 30
2.4 Bestimmung der Schwermetallgehalte 30
2.5 Makrozoobenthos 30
2.5.1 Methoden der Probennahme 31
2.5.2 Präparation von Chironomiden-Larven 31
2.5.3 Taxonomische Bestimmung 31
2.6 Biotests 36
2.6.1 Cytotoxizitätstest 36
2.6.2 Ames-Test 40
2.6.3 Nachweis der bakterientoxischen Wirkung mit Arthrobacter globiformis 42
2.6.4 Nachweis der gentoxischen Wirkung im Comet-Assay 44
2.6.5 Nachweis der endokrinen Wirkung im Dot-Blot-Assay 47
2.6.6 Induktion von Cytochrom P450 in Hühnerleberkultur 51
2.6.7 Fischeitest mit *Danio rerio* 53
2.7 Statistik und Bewertungstechniken 54
2.7.1 Mittelwertvergleiche 54
2.7.2 Korrelations- und Regressionsanalysen 55
2.7.3 Bewertung 56

3 Die eingesetzte Biotestbatterie 59

4 Integrierte Sedimentuntersuchungen im Einzugsgebiet des Neckars 65

4.1 Das Konzept integrierter Sedimentuntersuchungen und bisherige Anwendungen 65
4.2 Ausgangspunkt und untersuchte Fragestellungen 69
4.3 Die Struktur der eingesetzten Triade 71
4.4 Die Probennahmestandorte der Sedimentbewertungstriade 72
4.4.1 Fließgewässer mit einem kleinen Einzugsgebiet 73
4.4.2 Einzugsgebiete mittlerer Größe: Elsenz 75
4.4.3 Einzugsgebiete großer Größe: eine Flachwasserzone des Neckars bei Eberbach 78

4.5 Ergebnisse und Diskussion: Chemische Analysen ... 81
4.5.1 Physikalisch-limnochemische Parameter ... 82
4.5.2 Chemische Analysen von Substanzen mit endokriner Wirkung ... 86
4.5.3 Korngrößenanalysen ... 88
4.5.4 Schwefel- und Kohlenstoffgehalt der Sedimente ... 89
4.5.5 Schwermetallbelastung der Sedimente ... 90
4.5.6 Konzentrationen organischer Schadstoffe in den Sedimenten ... 92
4.6 Ergebnisse und Diskussion: In situ-Untersuchungen ... 97
4.6.1 Artenzusammensetzungen ... 97
4.6.2 Saprobienindex ... 103
4.6.3 Ökotoxikologischer Index nach Carmargo ... 104
4.6.4 Rhithron-Ernährungstypen-Index ... 105
4.6.5 Diversität und Evenness ... 106
4.6.6 Sauerstoffindikationen ... 107
4.6.7 Vergleichende Bewertung der Makrozoobenthosanalysen ... 108

4.7 Ergebnisse und Diskussion: Befunde der Bioassays ... 113
4.7.1 Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* ... 115
4.7.2 Leuchtbakterientest ... 121
4.7.3 Fischeitest mit *Danio rerio* ... 122
4.7.4 Akuter Cytotoxizitätstest mit RTG-2-Zellen ... 129
4.7.5 Algenhemmtest ... 131
4.7.6 Comet-Assay ... 132
4.7.7 Ames-Test ... 134
4.7.8 Endokrine Wirksamkeit ... 138
4.7.9 Dioxin-ähnliche Wirksamkeit ... 149

5 Überprüfung verschiedener statistischer Bewertungsmethoden am Beispiel der Befunde einer Sedimenttriade ... 159

6 Wirkungsbezogene Identifizierung cytotoxischer, mutagener und dioxinähnlicher Inhaltsstoffe – Fallbeispiel eines Sedimentes nach einer Kläranlageneinleitung ... 169

7 Ein kombiniertes ökotoxikologisches und hydraulisches Untersuchungskonzept für die Beurteilung des Erosionsrisikos und des Schädigungspotenzials von kontaminierten Sedimenten in staugeregelten Flüssen ... 181
7.1 Untersuchungen an Bohrkernen aus der Stauhaltung Lauffen ... 185
7.2 Untersuchungen zweier starker Neckarhochwasserereignisse ... 193
7.3 Bewertung der Befunde aus den Einzeluntersuchungen vor dem Hintergrund einer möglichen Remobilisierung ... 212

8 Zusammenführung und Ausblick ... 213

9 Zusammenfassung ... 221

10 Literatur ... 223

11 Wissenschaftliche Beiträge ... 247

12 Anhang: Reprint einer Empfehlung zur Bewertung von Sedimenten ... 253

1 Einleitung

Bei den Strategien zur Bewertung von Sedimenten und Schwebstoffen dominiert in der Bundesrepublik Deutschland noch immer der chemisch-numerische Ansatz (Ahlf 1995, Gratzer & Ahlf 1999a, Henschel et al. 1999, Hollert et al. 1999a, Neumann-Hensel et al. 2000a). Eine rein chemisch-analytische Unterscheidung gefährlicher von nicht gefährlichen Sedimenten erscheint jedoch in Anbetracht der Vielzahl bekannter sedimentassoziierter Verbindungen und dem geringen Wissen über deren toxische Wirkung nur in einem sehr begrenzten Maße möglich (Ahlf et al. 1991). Für eine Bewertung von Sedimenten und Schwebstoffen sind vielmehr biologische Wirkungstests notwendig, um summarisch die Wirkung aller Inhaltsstoffe zu erfassen, sowie deren synergistische und antagonistische Effekte (Verstärkung oder Reduzierung der toxischen Wirkung von Stoffgemischen) und Metabolisierung im Organismus (Toxifizierung und Detoxifizierung) zu berücksichtigen (Burton 1991, 1995, Gunkel 1994). Somit kann eine ökotoxikologische Bewertung der Sedimentqualität nur mittels einer Kombination von standardisierten chemischen *und* biologischen Testverfahren erfolgen (Förstner et al. 1989, Neumann-Hensel et al. 2000a).

Sedimenttoxizität ist nach Ahlf (1995) im weitesten Sinn definiert als „ökologische und biologische Änderung, die durch kontaminiertes Sediment verursacht wird. Sie kann auch operational bestimmt werden als die negative Wirkung an einem Testorganismus, der einem belasteten Sediment ausgesetzt wurde". Sedimentgebundene Schadstoffe verursachen zahlreiche in der Literatur gut belegte biologische Wirkungen (Übersichten bei Ahlf 1995, Burton 1991, 1995, Ingersoll et al. 1997, Zimmer & Ahlf 1994): auf organismischer Ebene Mortalität, erbgutverändernde, endokrine und pathologische Effekte, auf der Populationsebene Änderungen in Abundanzen und Diversität sowie auf biozönotischer Ebene Änderungen in Struktur und Funktion (Ahlf 1995). Die Schadwirkung partikulär gebundener Stoffe kann daher auf verschiedenen Organisationsebenen untersucht werden (Abb. 1.1). Dabei findet jede Organisationsebene ihre mechanistische Erklärung auf der nächstniederen Organisationsebene. So resultiert eine Beeinträchtigung des Reproduktionserfolgs einer bestimmten Art etwa aus einer Reihe von Schädigungen auf dem Niveau der Organe. Diese sind Folge von Schädigungen auf zellulärem Niveau und lassen sich wiederum auf molekulare Mechanismen zurückführen (Braunbeck et al. 1995b). Von größter ökologischer Relevanz sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die Veränderungen von Strukturen und Funktionen von Ökosystemen unter dem Einfluß von kontaminierten Sedimenten analysieren. Funktionell gesehen ist dagegen der Angriffspunkt von Sedimentschadstoffen auf molekularer Ebene und strukturell auf dem Niveau von Zellorganellen und Zellen zu suchen. Der hohen ökologischen Relevanz von Untersuchungen auf Populations- und Ökosystemniveau stehen somit die Vorteile von Untersuchungen auf niedrigerer Ebene in Form von erhöhter Geschwindigkeit und größerer Empfindlichkeit gegenüber (Burton 1991).
Prokaryontische Testverfahren (mit Bakterien) und **Tests an Invertebraten** (=Wirbellosen) für die Bewertung von Sedimenten werden mittlerweile insbesondere im angelsächsischen Raum häufig verwendet (Übersichten bei Burton 1991, Day et al. 1995, Hill et al. 1993, Ingersoll 1995, Ingersoll et al. 1995a, Kemble et al. 1994). Dabei handelt es sich zumeist um die klassischen Toxizitätstests Ames-, Leuchtbakterien- und Daphnien-, sowie den *Chironomus tentants*- und *Hyalella azteca*-Test.
Für eine Bewertung der Schadwirkung von Sedimenten und Schwebstoffen auf **Vertebraten** sind labornahe Ganztierversuche (Fischtest nach DIN 38 412) aufgrund ihrer schlechten Reproduzierbarkeit und ethischer Konflikte problematisch. Daher wurden in den letzten Jahren verstärkt *In vitro*-Testverfahren mit Zellkulturen für die Bewertung von partikelgebundenen Schadstoffen entwickelt (vgl. Ahlf 1995, Engwall et al. 1996, Gagné & Blaise 1995, Gratzer & Ahlf 1999a, Hilscherova et al. 2000, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1998a, Kammann et al. 2000, Kocan et al. 1985, Landolt & Kocan 1984, Legler 2001, Metcalfe et al. 1990, Murk et al. 1996, Otto et al. 1994).
Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden insbesondere Biotestverfahren eingesetzt, die für eine *prospektive Bewertung* von Schwebstoffen und Sedimenten geeignet sind. Wichtige Kriterien für

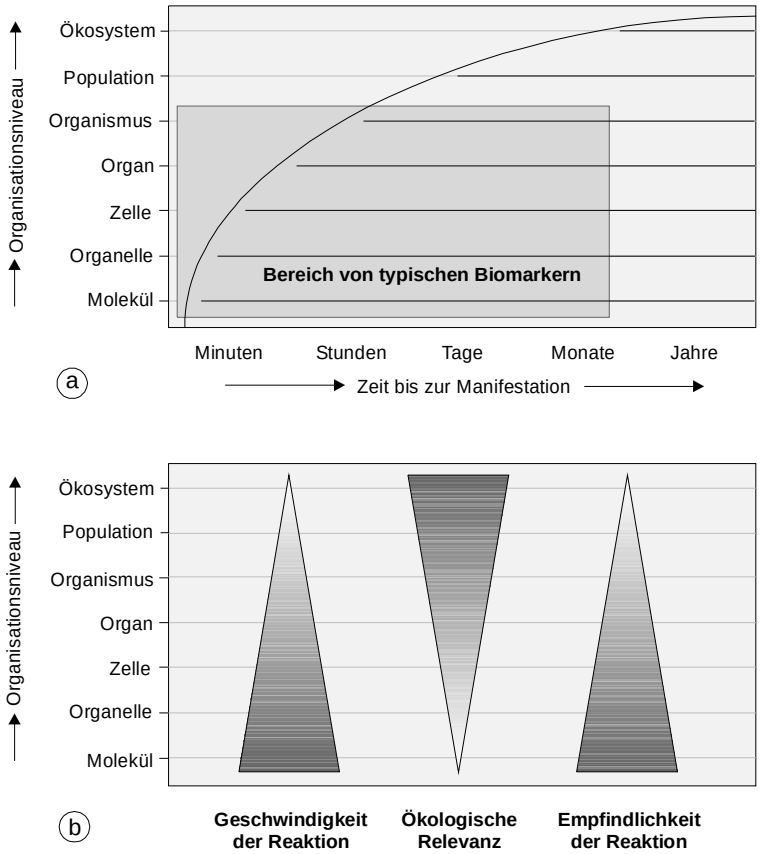


Abb. 1.1. Ökotoxikologische Effekte von sedimentassoziierten Schadstoffen können auf unterschiedlichen Organisationsebenen innerhalb der Hierarchie biologischer Organisation untersucht werden (a). Der Zeitraum bis zur Manifestation eines Effekts wird hierbei mit zunehmender Höhe des betrachteten Organisationsniveaus vom Sekunden- und Minutenmaßstab auf Monate bis Jahre ansteigen. Während zweifellos die ökologische Relevanz von Befunden mit steigender Integrationshöhe zunimmt, wird die Geschwindigkeit und Empfindlichkeit der Reaktion abnehmen (b); aus Braunbeck (1994).

solche biologische Testverfahren sind biologische Relevanz, Schnelligkeit, Standardisierbarkeit sowie vertretbarer personeller und finanzieller Aufwand.

Bei Biotestverfahren können Organismen oder Zellen auf verschiedene Weise gegenüber Sediment- und Schwebstoffproben exponiert werden: Die Untersuchung von **nativen Sediment- oder Schwebstoffproben** besitzt die größte ökologische Relevanz, da sie die *aktuelle* Bioverfügbarkeit von Schadstoffen berücksichtigt. Sie kann aber nicht mit allen hier dargestellten Biotests durchgeführt werden (Tab. 1.1). Bei vielen *In vitro*-Testverfahren ist es daher notwendig, die partikelgebundenen Schadstoffe durch verschiedene Verfahrensweisen in die gelöste Phase zu überführen vgl. (Ahlf 1995, Ahlf et al. 1991, Burton 1991, 1995, Hill et al. 1993, Hollert & Braunbeck 1997, Liß & Ahlf 1997, Zimmer & Ahlf 1994):

- Es kann das **native Porenwasser**, dem viele aquatische Organismen *a priori* ausgesetzt sind und das vordergründig den Hauptexpositionspfad von Sedimentschadstoffen darstellt (Burton 1991, Power & Chapman 1992), auf seine biologische Wirksamkeit untersucht werden. Die Art der Sammeltechnik für Porenwasser besitzt einen großen Einfluß auf dessen Toxizität (Bufflap & Allen 1995), die Methoden sind jedoch wenig standardisiert. Zudem können nur begrenzte Mengen effizient gesammelt werden. Das potentielle Schädigungspotenzial der Sedimente und die *langfristige* Bioverfügbarkeit wird bei der Prüfung von Porenwasser prinzipiell nicht erfaßt und *de facto* meist unterschätzt (Harkey et al. 1994). Porenwasser sollte als Expositionsphase genutzt werden, wenn untersucht werden soll, ob *benthosbewohnende* Organismen durch die Sedimente geschädigt werden können. Die Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB-WSV; BfG 2000) benutzt die ökotoxikologische Wirkung von Porenwasser im Leuchtbakterien-, Algen- und Daphnientest als wichtiges Kriterium für die Bewertung von Baggergutumlagerungen: „Baggergut, dessen Porenwasser bei einer Verdünnung 1:4 nicht toxisch wirkt, darf umgelagert werden. Bei toxischem Baggergut ist eine Einzelfallentscheidung erforderlich, für die gegebenenfalls weitere Untersuchungen erforderlich werden.“ Nach Wang (1999) stellen Toxizitätsuntersuchungen von anoxischen Porenwässern, die bereits in Tiefen von wenigen Millimetern

vorkommen können, ein großes Problem dar: Durch die aerobe Probenaufarbeitung und die Expositionssituation im Biotest können die Metalle von Sulfiden oxidiert werden (Entstehung von flüchtigem H_2S), so dass die Sulfidtoxizität im Bioassay *unterbewertet* wird. Andererseits geht mit der Oxidation der Sulfide oft eine Veränderung der Bindungsspezies einher, durch die Schwermetallsulfide und Polysulfid-Komplexe bioverfügbar werden. Die Toxizität dieser Substanzen wird somit im Bioassay oft *überbewertet*. Die Bedeutung des Porenwassers als wichtiger Expositionspfad für sedimentbewohnende Invertebraten könnte zudem geringer als bisher angenommen sein, da sich diese durch Röhrensysteme ein eigenes Milieu schaffen können, das mehr dem der Wassersäule als dem des Porenwassers gleicht (Wang 1999). Porenwasser für die Biotests kann durch Dialyseverfahren (Bufflap & Allen 1995, Mudroch & MacKnight 1994a, b) oder durch Zentrifugation von nativen Sedimenten bei 4°C über 10 min mit 3000 x g gewonnen werden (Hollert et al. 1999a). Die Untersuchung von Porenwässern mit einer Batterie von Biotests ist aufgrund der geringen Volumina, die sich aus Sedimenten gewinnen lassen, mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden.

- Die Überprüfung der **wässrigen Eluate**[1] von Sedimenten - die durch Schütteln von Sedimenten mit Wasser hergestellt werden - ist relativ gut standardisiert und ahmt oxidierende Umweltverhältnisse nach, wie sie bei einer Remobilisierung von Sedimenten zu erwarten sind. Für wässrige Eluate ist jedoch bekannt, dass sie das tatsächliche bioverfügbare Maß an Schadstoffen unterbewerten (Harkey et al. 1994). Für die Herstellung von wässrigen Eluaten (vgl. Ahlf 1995, Hollert & Braunbeck 1997) werden die Sediment- oder Schwebstoffproben in einer definierten Menge Aqua bidest. (1:2 oder 1:4) suspendiert und für 12 h bei 4°C mit einem Überkopfschüttler mit 20 Upm rotiert. Durch Zentrifugation (3000 x g bei 4°C) wird das wässrige Eluat von feinen Partikeln befreit. Die Proben werden nativ oder nach einer Sterilfiltration (0,2 µm) in den unten beschriebenen *In vitro*-Tests auf ihre ökotoxikologische Wirkung untersucht.
- **Organische Sedimentextrakte.** Sediment oder Schwebstoff können mit organischen Lösungsmitteln wie etwa Aceton extrahiert[2] werden (Campbell et al. 1992, Ho & Quinn 1993b, Landolt & Kocan 1984, True & Heyward 1990), mittels einer Fraktionierung kann dabei eine Aussage über die Dominanz verschiedener Schadstoffgruppen gemacht werden (Brack 1999, Brack et al. 1999a, 2000, Engwall et al. 1996, Ho et al. 1997, Ho & Quinn 1993a, b, Hollert et al. 1998b, 1999a). Durch organische Extraktionen kann versucht werden, die langfristige Schädigung von Organismen durch überwiegend fettlösliche Substanzen durch eine kurze Exposition gegenüber den potentiell verfügbaren Schadstoffen nachzuahmen. Dieser in der Ökotoxikologie weit verbreitete Ansatz ist in der Literatur nicht unumstritten (vgl. Braunbeck et al. 1995a). Die Extraktion kann durch einfaches Schütteln mit dem Lösungsmittel Methanol (Kwan & Dukta 1990, Neumann-Hensel et al. 2000a) oder als multiple Extraktion im Soxhlet-Apparat (Hollert & Braunbeck 1997) erfolgen.

Detaillierte Charakterisierungen des Schadstoffpotenzials von Sedimenten lassen sich über die Verwendung verschiedener Expositionsphasen in mehreren Biotests erhalten. Tab. 1.1 gibt einen exemplarischen Überblick über wichtige Sediment-Biotestverfahren und die möglichen Expositionspfade. Auch andere Sedimentbiotests haben sich bei internationalen und nationalen Forschungsvorhaben bewährt (Literaturübersicht bei: Ahlf 1995, Burton 1991, 1995, Ginn & Pastorok 1992, Ingersoll 1995, Ingersoll et al. 1995a, 1995b, La Point & Fairchild 1992, Long 2000a, Neumann-Hensel et al. 2000b, Reynoldson & Day 1993, Traunspurger & Drews 1996, van Beelen & Doelman 1997, Zimmer & Ahlf 1994). Die Biotestverfahren, die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens an die Untersuchung partikulärgebundener Schadstoffe angewendet wurden, sind in Abb. 1.2 dargestellt. Einige der genannten *In vitro*-Biotestverfahren konnten im Rahmen eines Methodenkompendiums des Deutschen Verbandes für Wasser- und Kulturbau (DVWK) einem breiten Publikum vorgestellt werden (Brack 1999, Dürr et al. 1999, Ensenbach 1999, Gratzer & Ahlf 1999b, Hollert et al. 1999b, h, Krebs 1999, Rönnpagel et al.

[1] eluieren: Überführung von partikelgebundenen Schadstoffen in die lösliche Phase durch das milde Extrahieren mit Wasser.
[2] extrahieren: Überführung von partikelgebundenen Schadstoffen in die lösliche Phase durch mehrmaliges Einwirken von organischen Lösungsmitteln.

1999, Schnurstein et al. 1999). Bei der Auswahl der Biotests in dieser Studie wurden sowohl verschiedene Hierarchie-Ebenen der Organismen (vgl. auch Abb. 1.1) als auch unterschiedliche Expositionspfade (Tab. 1.1 und Abb. 1.2) berücksichtigt. Durch die alleinige Verwendung *eines* Biotestverfahrens kann das Schädigungspotenzial von Sedimenten und Schwebstoffen allerdings nicht ausreichend beschrieben werden (Zimmer & Ahlf 1994). Die einzelnen Verfahren lassen sich gemeinsam in **Biotestbatterien** kombinieren (Ahlf 1995, Duerr et al. 1999, Fretwurst et al. 1997, Henschel et al. 1997b, Hollert et al. 1999c,e,g, Zimmer & Ahlf 1994). Durch die kombinierte Verwendung lässt sich eine Vielzahl von Informationen über die Sedimenttoxizität erhalten:
Von der Schädigung bestimmter Organismen kann nur sehr bedingt auf die Wirkung auf andere Lebewesen geschlossen werden. Obgleich in den meisten Fällen die sedimentinduzierte Schädigung bei verschiedenen Organismen gut korreliert, können bei Dominanz verschiedener Schadstoffgruppen Bakterien, Algen, Invertebraten und Wirbeltiere sehr unterschiedlich reagieren. Daher kann durch die alleinige Verwendung eines Biotests der Zustand von Sedimenten und Schwebstoffen nicht ausreichend bewertet werden. Für das Testdesign sind daher Biotestbatterien anzustreben, die mindestens einen Vertreter aus den trophischen Ebenen Produzenten, Konsumenten, Konsumenten höherer Ordnung und Destruenten nutzen (Ahlf 1995, Zimmer & Ahlf 1994).
Partikelassoziierte Schadstoffe können unterschiedliche Arten der Schädigung verursachen: Neben einer akuten toxischen Wirkung, die in der Regel mit dem Sterben der Organismen oder Zellen einhergeht, können auch vielfältige subletale Wirkungen auftreten, die für das Ökosystem sehr wohl eine Wirkung haben können. Sedimente können prinzipiell auch erbgutverändernd wirken (Mutagenität, Gentoxizität; Gagné et al. 1995, Jarvis et al. 1996, Kammann et al. 2000, Kocan et al. 1985, Marvin et al. 1995), die natürliche Entwicklung von Eiern und Embryonen stören (Teratogenität; Engwall et al. 1994, Ensenbach 1998, Strmac 1999), in den Hormonhaushalt der Tiere eingreifen (endokrine Wirkung; Legler 2001) oder pathologische Veränderungen in Tieren und Pflanzen (Otto et al. 1994, Strmac & Braunbeck 2000) verursachen. Für umfassende Charakterisierungen des Sedimentzustandes sollten daher zusätzlich zu den (zumeist unspezifischen) akuten Biotests solche mit exakt definierten Endpunkten eingesetzt werden (Hollert et al. 1999a, d, f). In Abschnitt 3 dieser Studie erfolgt eine detailliertere Beschreibung der einsetzten *In vitro*-Biotestbatterie und ihrer Validierung.

Stufenverfahren

Insbesondere in angelsächsischen Ländern werden häufig gestufte Beurteilungskonzepte benutzt, um die Qualität von Sedimenten zu bewerten. In einem Positionspapier des Fachausschusses „Gewässersedimente“ der Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh (Calmano 1996) wird ein solches gestuftes Bewertungskonzept vorgestellt, das sich weitgehend an Reynoldson & Day (1993) orientiert. In jeder Stufe wird entschieden, ob ein Sediment nutzungsbezogen unbedenklich ist oder ob weitere Untersuchungen erforderlich sind. Dabei können Biotestverfahren generell als Screeningmethoden verwendet werden (Calmano, 1996).

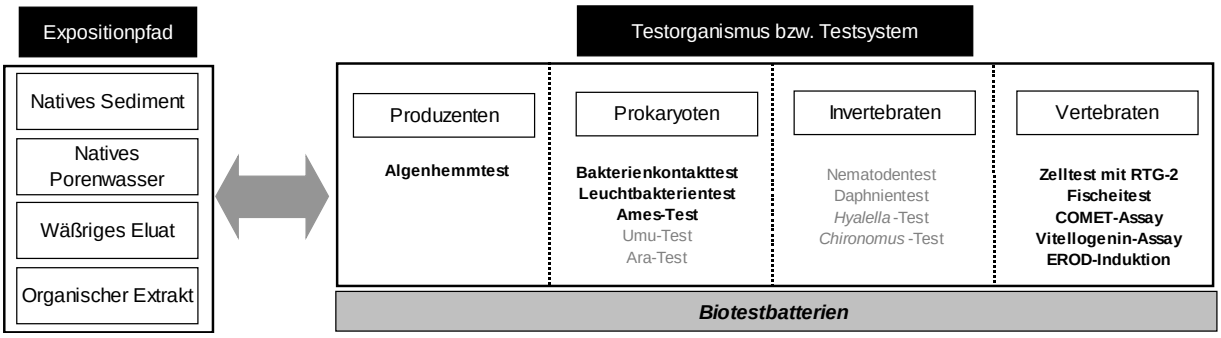


Abb. 1.2. Schematische Übersicht über Biotestverfahren für die Untersuchung und Bewertung von partikelgebundenen Schadstoffen und deren Expositionspfade. Die in dieser Studie angewendeten Verfahren sind fett dargestellt (aus Hollert et al. 1999c).

Ein Stufenverfahren braucht nicht weiter vorangetrieben werden, (1) wenn die nutzungsbezogenen Zielvorgaben (z.B. Sicherung der Trinkwasserqualität, Schutz der Lebensgemeinschaften im und auf dem Sediment) erreicht sind oder (2) wenn das ökotoxikologische Gefahrenpotenzial hinreichend charakterisiert ist. Eine Schädigung in nur einem Biotest kann ausreichen, um die Zielvorgaben für Sedimente zu verfehlen (Ahlf 1995). Stufenverfahren sind, da sie den Kostenfaktor betonen und ein übersichtliches Schema bieten, häufig als Managementstrategie für eine Sedimentsanierung oder zur Entscheidungsfindung bei der Umlagerung von Baggergut angeboten worden. Zudem sollte bei Stufenverfahren das Augenmerk auf die Expositionswege gerichtet werden, um allgemeingültige Mechanismen der Wirkung sedimentassoziierter Umweltchemikalien aufzuklären (Calmano 1996).

Tab. 1.1. Auflistung ausgewählter ökotoxikologischen Wirkungstests und der möglichen Expositionspfade für Untersuchungen an Sedimenten und Schwebstoffen (modifiziert aus Hollert et al. 1999g).

Test	Endpunkt	Abschnitt/ Referenz	Natives Sediment	Poren-wasser	Wässrige Eluate	Organische Extrakte[4]	Stand[5]
Wirbeltiere (Konsumenten höherer Ordnung):							
• Fischeitest	Akute Toxizität, Teratogenität	**2.6.7**	ja	ja[3]	ja	ja	+++
• Zelltest mit RTG-2	Akute Toxizität	**2.6.1**	nein	ja	ja	ja	++
• Dot-Blot-Assay	Endokrines Potenzial	**2.6.5**	ja[1]	ja	ja	ja	+
• MVLN -Zell-Assay	Endokrines Potenzial	Khim et al. (1999b)	nein	ja	ja	ja	+
• COMET-Assay, RTG-2	Gentoxizität	**2.6.4**	ja[1]	ja	ja	ja	++
• Histopathologie an Organen (Fisch)	subletale Toxizität	Braunbeck (1998)	ja	ja[3]	ja	ja	++
• Embryonale Hühnerleberkulturen	EROD-Induktion	**2.6.6**	nein [1]	ja	ja	ja	+
Wirbellose (Konsumenten niederer Ordnung):							
• Nematoden(kontakt)test	Toxizität	Ahlf (1995)	ja	ja[3]	ja	ja	++
• *Hyalella azteca*-Test	Toxizität	Ahlf (1995)	ja	ja[3]	ja	ja	+++
• Daphnientest	Toxizität	Ahlf (1995)	ja	ja[3]	ja	ja	+++
• *Chironomus tentants*-Test	Toxizität	Ahlf (1995)	ja	ja[3]	ja	ja	+++
Prokaryonten (Konsumenten niederer Ordnung oder Destruenten):							
• Bakterien(kontakt)test	Toxizität	**2.6.3**	ja	ja	ja	ja	++
• Leuchtbakterientest	Toxizität	Ahlf (1995)	ja	ja	ja	ja	+++
• Ames-Test	Mutagenität	**2.6.2**	ja[2]	ja[3]	ja	ja	+++
• *Ara*-Test	Mutagenität	Vahl et al. (1997)	ja[2]	ja[3]	ja	ja	++
• *umu*-Test	Gentoxizität	Vahl et al. (1997)	nein	ja[3]	ja	ja	+++
Produzenten:							
• Algenhemmtest	Toxizität	Ahlf (1995)	nein	ja[3]	ja	ja	+++

Grau unterlegt: in dieser Studie eingesetzte Verfahren.

[1]Der COMET-, EROD- und Vitellogenin-Assay kann bei der Untersuchung von Gesamtsediment nicht mit permanenten Zellen, embryonalen Hühnerlebern bzw. Primärhepatocyten, wohl aber an Proben von Organismen aus dem Ökosystem (passives Biomonitoring) angewendet werden. [2]Der Ames- bzw. ARA-Test kann nur mit autoklaviertem Gesamtsediment durchgeführt werden. Dabei ist von Transformationen chemischer Verbindungen auszugehen, so daß eine Gesamtsedimentuntersuchung mit Hilfe des Ames-, bzw. ARA-Tests nicht empfohlen werden kann. [3]Die Durchführung des Fischeitests und des Ames-Tests mit Porenwasser erfordert sehr große Mengen der Probe (etwa 100 mL). [4] Extrakte werden für die Toxizitätsuntersuchungen mit Bioassays in der Regel mit Wasser oder einem Nährmedium verdünnt, um eine Toxizität des organischen Lösungsmittels oder Lösungsvermittlers auszuschließen [5]Entwicklungsstand: + erste Orginalarbeiten über Untersuchungen an Sedimenten und Schwebstoffen, ++ mehrere Orginalarbeiten oder Ringtests im Zuge einer DIN-Validierung, +++ gültige DIN-, ISO-, EPA- oder ASTM-Vorschriften.

Bisher existieren in der Bundesrepublik noch keine umfassend validierten Stufenverfahren für die Bewertung von Sedimenten und Schwebstoffen. Einen Überblick über mögliche Stufenverfahren und erste Studien geben Ahlf (1995), Ahlf et al. (1997), Dürr et al. (1999), Henschel et al. (1997a, 1999), Hollert et al. (1999b,c,e) sowie Zimmer & Ahlf (1994).

Integrierte Sedimentbewertung

Ein Konzept, Sedimente unter Sicherstellung der ökologischen Relevanz zu untersuchen und zu bewerten, stellen verschiedene Ansätze zur integrierten Sedimentbewertung dar (Abb. 1.3, Literaturübersichten bei Ahlf 1995, Chapman et al. 1992, Zimmer & Ahlf 1994). Zu „integrierenden Beurteilungen“ kommt es nach Chapman et al. (1992) auf dem Weg von Untersuchungen, die verschiedene Messungen der Umweltqualität zum Zweck einer umfassenden Beurteilung des Systemzustandes kombinieren. Diese Messungen bestehen mindestens aus drei der folgenden fünf Komponenten (Ahlf 1995): (1) chemische Sedimentanalysen, (2) Sedimenttoxizitätstests, (3) Geweberückstandsanalysen, (4) pathologische Untersuchungen und (5) biozönotische Untersuchungen. Obwohl jede einzelne dieser fünf Komponenten wichtige Informationen zum Sedimentzustand bietet, gelangt keine von ihnen zu erschöpfenden Aussagen: Mittels chemischer Analytik kann die Anwesenheit und Konzentration von Schadstoffen im Sediment erfaßt werden, sie erlaubt aber keine Aussage über die Bioverfügbarkeit und Wirkung der Substanzen. Sedimenttoxizitätstests im Labor geben zwar Aufschluß über die Toxizität an den getesteten Organismen und Testsystemen, doch ist die Extrapolation der Daten auf Organismen im Freiland problematisch (Zimmer & Ahlf 1994).

Soll beispielsweise geklärt werden, ob ein bestimmtes Sediment kontaminiert und toxisch ist und ob Lebensgemeinschaften im Sediment Schadeffekte zeigen, so genügt ein vereinfachter, kostengünstigerer 3-Komponenten-Ansatz der integrierten Bewertung (Ahlf 1995). Nach Chapman et al. (1992) sollte in diesem Falle eine Sedimentbewertungstriade aus den Komponenten Sedimentchemie, Sedimenttoxizität in biologischen Tests und der Messung von Feldeffekten der benthischen Lebensgemeinschaft (z.B. Pathologie oder Struktur der Biozönose) eingesetzt werden. Integrierte Sedimentbewertungen wurden insbesondere im angelsächsischen Raum (vgl. Carr et al. 1996, Chapman 2000, Power & Chapman 1992), in der Tschechischen Republik (Machala et al. 1998, Staffová et al. 1998), am Golf von Cadíz (DelValls et al. 1998c) sowie im Bereich der Nordsee (Karbe et al. 1992, 1994,

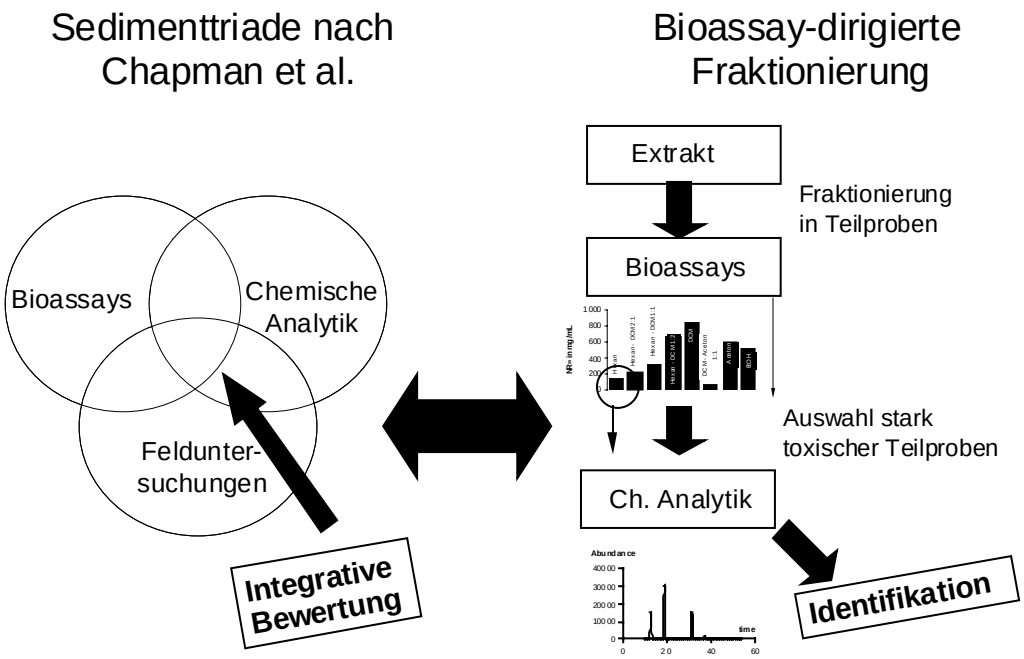


Abb. 1.3. Prinzipien der Sedimentbewertungstriade nach Chapman und Mitarbeitern (1992) und Bioassay-dirigierten Fraktionierung als zwei Möglichkeiten zur Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern.

Chapman 1992) und an der Elbe (Karbe et al. 1992, 1994) durchgeführt. Eine detaillierte Literaturübersicht über das Konzept der Integrierten Sedimentuntersuchung und bisherigen Anwendungen ist in Abschnitt 4.1 dieser Studie dargestellt.

Bioassay-dirigierte Fraktionierungen

Durch die Verwendung von Biotests kann das Schädigungspotenzial der partikelgebundenen Schadstoffe summarisch erfaßt werden, die problematischen Substanzen können jedoch nicht identifiziert werden. Eine Möglichkeit, nähere Auskunft über die Substanzgruppen zu erhalten, die für die toxischen Wirkungen verantwortlich sind, stellt die Bioassay-dirigierte Fraktionierung (BdF, engl.; ähnlich auch TIE = Toxicity Identification Evaluation) dar (Ankley & Schubauer-Berigan 1995, Brack et al. 1998, Engwall et al. 1996, Ho et al. 1997, Ho & Quinn 1993a, b, Hollert et al. 1998a). Bei der Bioassay-dirigierten Fraktionierung kann durch die Kombination aus chemischen Fraktionierungstechniken, Biotests und nachgeschalteten chemisch-analytischen Untersuchungen der jeweils problematischen Fraktionen eine nähere Charakterisierung der toxischen Stoffe erhalten werden (Abb.1.3). Bioassay-dirigierte Fraktionierungen können insbesondere in gestuften Bewertungsverfahren zur Identifizierung problematischer Substanzklassen bzw. Schadstoffe führen. Eine umfassende Literaturübersicht zu einzelnen Anwendungen von Biotest-geleiteten Fraktionierungen mit den Endpunkten Cytotoxizität, Genotoxizität und dioxin-ähnlicher Wirksamkeit ist in Abschnitt 6 dargestellt.

Bewertungsverfahren

Eine ökotoxikologische Bewertung von Sediment- und Schwebstoffproben sollte – da sie die biologisch schädliche **Wirkung** von partikulär gebundenen Schadstoffen ermittelt – neben chemischen Untersuchungen besonders auf biologischen Wirktests basieren. Während inzwischen einige gut validierte Biotestverfahren für die Untersuchung von Sedimenten und Schwebstoffen vorliegen und im Rahmen verschiedener Forschungsvorhaben eingesetzt wurden, gibt es einen verstärkten Forschungsbedarf bei der Aggregation der Daten und der Ableitung von ausreichend validierten Bewertungsstrategien: Die Befunde der einzelnen Untersuchungen aus Testbatterien können zunächst getrennt ausgewertet und beurteilt werden. Prinzipiell erscheint es sinnvoll, dabei alle erhobenen Ergebnisse zu berücksichtigen (Ahlf et al. 1997). Ähnlich wie in der medizinischen Differentialdiagnostik ermöglicht eine komplexere Untersuchung – im Bedarfsfall – mit spezifischeren biologischen Endpunkten (etwa Gentoxizität, endokrine Wirkung, P450-Induktion; Hollert et al. 1999d, Karbe et al. 1994), eine Bioassay-dirigierte Fraktionierung zur Ermittlung problematischer Substanzklassen (Brack et al. 1998, Engwall et al. 1997a, Hollert et al. 1998a) oder eine umfassende integrierte Sedimentbewertung (Carr et al. 1996, Chapman 2000, Power & Chapman 1992) ergänzende Aussagen zum Schädigungspotenzial.

Die Daten der einzelnen ökotoxikologischen Untersuchungen werden für eine Bewertung zunächst aggregiert. Die Ergebnisse können empirisch (unter Berücksichtigung zahlreicher Referenzdaten) in verschiedene Belastungsklassen gruppiert werden. Ahlf et al. (1997) benutzen für die Datenaggregation die Summe der Hemmungen einzelner Biotests und Canfield et al. (1994) führten eine Datentransformation in eine Skala von 0 bis 100 durch. Krebs (1988, 1999) entwickelte mit dem pT-Wert (*potentia toxicologiae*) einen Index, der aus dem negativen natürlichen Logarithmus der NOEC-Konzentration (=No observed effect concentration) einer binären Verdünnungsreihe gebildet wird. Mittels multivariaten Methoden wie Clusteranalysen und Faktorenanalysen (Ahlf et al. 1997, DelValls et al. 1998b) können die Befunde aus einzelnen Wirktests und chemischen Analysen mit dem Ziel gruppiert werden, ähnliche Datensätze zu Klassen mit vergleichbarem Schädigungspotenzial zusammenzufassen (Ahlf et al. 1997). Die Rohdaten oder Ergebnisse aus multivariaten Verfahren lassen sich beispielsweise mit Hasse-Diagrammen übersichtlich darstellen und klassifizieren (Brüggemann & Halfon 1997, Brüggemann et al. 1994, Liß 1997). Auch die Fuzzy Logic wurde schon in einzelnen Studien zur Klassifikation von Sedimenten herangezogen (Heise et al. 2000). Ein umfassende Übersicht zu statistischen Bewertungsverfahren ist in Abschnitt 5 dargestellt.

Untersuchungsziele und Fragestellungen

Im Rahmen dieses Projektes sollten etablierte Biotest- und neuere Analysen-Methoden (Abschnitt 2) für eine Untersuchung von komplexen Umweltproben adaptiert werden, um den (öko)toxikologischen Zustand von Gewässern zu erfassen. Als übergeordnetes Ziel sollte ein Konzept zur integrierten Bewertung der Kompartimente Wasser, Schwebstoff und Sediment in aquatischen Systemen erarbeitet werden.

Abschnitt 3: Methodenentwicklung. Neben der Biotestbatterie, die im Rahmen vergangener PAÖ-Projekte entwickelt wurde (Hollert & Braunbeck 1997), wurden weitere *In vitro*-Biotests für die Untersuchung partikulär gebundener Schadstoffe herangezogen: Mit dem Fischeitest mit *Danio rerio* und dem Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* sollte die Biotestbatterie um zwei weitere gut standardisierte Toxizitätstests verschiedener Trophieebenen erweitert werden. Mit dem Comet-Assay mit der permanenten Fischzelllinie RTG-2 (als eukaryontischem Genotoxizitätstest, Braunbeck et al. 2000, McKelvey-Martin et al. 1993, Schnurstein 2000) und dem nicht-radioaktiven Dot-Blot zum Nachweis von Vitellogenin-mRNA in Regenbogenforellen-Primärzellkulturen (als Biomarker für endokrin wirksame Sustanzen, Islinger et al. 1999b) sollten zwei weitere spezifische Endpunkte aus der Monosubstanzbewertung und Abwasseruntersuchung für die Untersuchung von Schwebstoffen und Sedimenten adaptiert werden. Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes an der Universität Uppsala (Schweden) konnte der EROD-Assay an embryonaler Hühnerleberkultur erlernt und an ausgewählten Proben durchgeführt werden. Die einzelnen Komponenten der Biotestbatterie und Aspekte der Validierung werden im Abschnitt 3 dieser Arbeit beschrieben. Die Biotestbatterie beziehungsweise einzelne Komponenten wurden bei den Einzeluntersuchungen dieser Studie eingesetzt (Abschnitte 4-7) und in Abschnitt 8 vor dem Hintergrund einer geeigneten minimalen Testbatterie diskutiert.

Abschnitt 4: Integrierte Sedimentuntersuchungen. Den inhaltlichen Schwerpunkt dieses Promotionsprojektes bildete eine Triade-Untersuchung von zwölf ausgewählten Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars, bei der chemische und limnochemische Analysen (Abschnitt 4.5), Aufnahmen des Makrozoobenthos (Abschnitt 4.6) und zahlreiche *In vitro*-Bioassays (Abschnitt 4.7) durchgeführt wurden. Während das Konzept Chapmans nur die Untersuchung von Sedimenten beinhaltet, sollte in dieser Studie auch die Verteilung des Schadstoffpotenzials auf die beiden Kompartimente Wasser und Sediment untersucht werden. Bisher wurden integrierte Untersuchungen fast ausschließlich für die Untersuchung mariner Systemen oder des Potamals großer Flüsse eingesetzt. Daher sollte mit dieser Studie überprüft werden, ob sich das Konzept auch für die Bewertung von Fließgewässern mit kleinen, mittleren und größeren Einzugsgebieten eignet. Bei der überwiegenden Anzahl von Triade-Studien wurden ausschließlich Bioassays zur akuten Toxizität (oftmals mit dem Endpunkt Mortalität, vgl. Abschnitte 4.7.1 bis 4.7.5) eingesetzt. Zahlreiche Studien zeigen, dass wir neben der akuten Toxizität auch vielfältige spezifische Schadeffekte durch sedimentassoziierte Schadstoffe beobachten können (Burton 1991, Hilscherova et al. 2000): Neben Genotoxizität und Mutagenität sowie Teratogenität konnten bei früheren Studien auch endokrine und dioxin-ähnliche Effekte dokumentiert werden (Literaturübersichten jeweils in den Abschnitten 4.7.3, 4.7.6 bis 4.7.9). Während verschiedene Biomarker zum Nachweis dieser Schadeffekte in Einzelstudien mehrfach angewendet wurden (Ahlf 1995, Benson & DiGiulio 1992), konnte sich die Verwendung von spezifischen Biomarkern bei Sedimenttriaden bisher noch nicht durchsetzen (Chapman 1990, 2000, Chapman et al. 1992). Daher sollte in den Abschnitten 4.7.3, 4.7.6 bis 4.7.9 dieser Teilstudie überprüft werden, inwiefern sich (1) an den untersuchten Fließgewässerstandorten spezifische Schadwirkungen nachweisen lassen, (2) diese auf die Kompartimente Wasser und Sediment verteilt sind, (3) sich die spezifischen Schädigungspotenzial zwischen verschiedenen Sedimentexpositionspfaden unterscheiden, (4) die Biomarkerergebnisse mit den Triadekomponenten Sedimentchemie und Veränderungen *in situ* korreliert werden können und (5) ob das Biomarkerkonzept eine sinnvolle Erweiterung für Sedimenttriaden darstellt. Analog zu den durchgeführten Bioassays wurden auch die chemischen Analysen möglichst mit Sediment und Wasser

durchgeführt, um die Schadstoffverteilung zwischen den beiden Kompartimenten zu charakterisieren (Abschnitt 4.5). Die Korrelation der spezifischen Biomarker mit den Befunden aus chemischen Analysen sollte dadurch überprüft werden, dass neben den konventionellen chemischen Messparametern (Abschnitte 4.5.1 bis 4.5.5) auch Analysen von Stoffen mit endokriner und dioxin-ähnlicher Wirkung (Abschnitte 4.5.6) durchgeführt wurden. In dieser Studie sollte weiterhin mit Hilfe des Toxicity equivalency factor-Konzeptes (TEF-Konzeptes, Van den Berg et al. 1998) ermittelt werden, welcher Anteil der endokrinen (Abschnitt 4.7.8) und dioxin-ähnlichen Wirksamkeit (Abschnitt 4.7.9) im Bioassay kausal durch chemische Analysen erklärt werden kann. Im Sinne von Chapmans Triade sollte in Abschnitt 4.6 analysiert werden, inwiefern ein Schadstoffpotenzial aus Bioassay oder chemischer Analytik mit einer Degradation *in situ* (Zusammensetzung des Makrozoobenthos) einherging. Da bisher nur sehr wenige Sedimenttriaden für kleine Fließgewässer durchgeführt wurden, galt es neben der Abundanzen und dem etablierten Saprobienindex (Abschnitt 4.6.2) auch andere Makrozoobenthosindices (Abschnitte 4.6.3 bis 4.6.6) bezüglich Ihrer Eignung zum Nachweis von ökotoxikologischen Schädigungen des Fließgewässers zu überprüfen (Abschnitt 4.6.7).

Abschnitt 5: Statistische Bewertungsmethoden. Die Aggregation und Bewertung von komplexen Datensätzen, die bei der Durchführung von Sedimenttriaden und der Anwendung von Biotestbatterien zwangsläufig entstehen, ist Gegenstand des Abschnittes 5 dieser Arbeit. Am Fallbeispiel des komplexen Datensatzes der Sedimenttriade (Abschnitt 4) soll die Verwendung verschiedener statistischer Methoden vor dem Hintergrund der Klassifikation der Daten aber auch bezüglich ihrer Eignung für den gewässerrechtlichen Vollzug überprüft werden. Ein Einzelnen wurden Rangsummen-basierte Verfahren, Clusteranalysen, Hasse-Diagramm-Technik und ein Fuzzy Logic-basiertes Expertensystem verglichen.

Abschnitt 6: Biotest-geleitete Fraktionierungen. Integrierte Sedimentuntersuchungen bieten zwar umfassende Informationen zum Schädigungspotenzial von Sedimenten und überprüfen die Relevanz der *In vitro*-Bioassays, erlauben aber keine Identifizierung der biologisch problematischen Schadstoffe. Mittels Bioassay-dirigierten Fraktionierungen können problematische Substanzklassen und u.U. sogar Einzelsubstanzen identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund wurde im zweiten Teil des Promotionsprojektes das Sediment eines kleinen Fließgewässers nach einer Kläranlageneinleitung, welches sich bei der Sedimenttriade als stark mutagen und dioxin-ähnlich wirksam und ökologisch degradiert erwiesen hatte, mittels einer komplexen Biotest-geleiteten Fraktionierung näher untersucht. Ziel dieser Teilstudie war es zum Einen durch den kombinierten Einsatz von Alumina-Säulenchromatographie und HPLC-Fraktionierungen und biologischen Screeningverfahren, die dioxinähnlichen und mutagen wirksamen Sedimentinhaltsstoffe zu identifizieren. Dabei sollten neben unpolaren Sedimentinhaltstoffen, die bereits in zahlreichen Studien untersucht wurden, ein Schwerpunkt auf die Identifizierung polarerer Inhaltsstoffe gelegt werden. Zum Anderen sollte durch diese Teilstudie die Eignung einzelner Bioassays der Biotestbatterie als Endpunkt für eine komplexe Biotest-geleitete Fraktionierung überprüft werden, um letztendlich ein leistungsfähiges System zu Identifizierung von cytotoxischen, mutagenen, gentoxischen, endokrin und dioxin-ähnlich wirksamen Sedimentinhaltsstoffen zusammenzustellen.

Abschnitt 7: Untersuchung des Risikos der Remobilisation von kontaminierten Altsedimenten. In den frühen siebziger Jahren konnte im Rahmen einer Untersuchung der Schwermetallbelastung in der Tonfraktion von Sedimenten ausgewählter deutscher Flüsse eine starke Belastung des Neckars mit den Elementen Cadmium, Nickel und Chrom festgestellt werden (Müller et al. 1993). Insgesamt hat sich die Gewässergüte des Neckars innerhalb der letzten 30 Jahre insbesondere durch den Ausbau von industriellen und kommunalen Kläranlagen stark verbessert (Müller et al. 1993). Die erhöhte Wasserqualität spiegelt sich in geringeren Schadstoffkonzentrationen in den jüngeren, oberen Sedimenten im Vergleich zu teilweise hohen Konzentrationen in den Altsedimenten wider. Gegenstand der Untersuchungen in Abschnitt 7 war es, das ökotoxikologische Gefährdungspotenzial von Altsedimenten und

die Gefahr einer möglichen Remobilisierung durch Hochwasserereignisse zu überprüfen. Dazu wurden 2 Untersuchungsstrategien eingesetzt: (A) Untersuchung von Sedimentbohrkernen: Jeweils 2 Sedimentbohrkerne verschiedener Probestellen aus der Staustufe Lauffen, die für ihre stark kontaminierten Altsedimente bekannt ist, wurden entnommen und mit einem interdisziplinären Ansatz mit chemischer Analytik, *In vitro*-Bioassays und im Strömungskanal auf ihr Erosionsrisiko untersucht. (B) Untersuchung von Hochwasserschwebstoffen: Während bereits in zahlreichen Studien Hochwasserschwebstoffe mit chemisch-analytischen Methoden untersucht wurden, gibt es bisher erst wenige Arbeiten zu Herkunft und biologischen Effekten von Schwebstoffen. Durch die Kombination chemischer Analysen von Sedimentbohrkernen und Schwebstoffen konnten Haag et al. (2000a) für ein Hochwasser zeigen, dass ein großer Anteil der schwebstoffgebundenen Schadstofffracht unterhalb der Stauhaltung Lauffen aus der Erosion kontaminierter Altsedimente stammt. Hollert & Braunbeck (1997) konnten bereits für ein mittleres Neckarhochwasser (1995/96) ein signifikantes ökotoxikologisches Schädigungspotenzial nachweisen. Daher wurde in dieser Studie bei einem stärkeren Neckarhochwasser (HQ_{20}, etwa 20-jährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit) im Oktober/ November 1998 mittels chemischen Analysen und biologischen Wirktests an Schwebstoffen aus den Stauhaltungen Lauffen und Heidelberg untersucht, ob eine Erhöhung des partikelgebundenen Schadstoffpotenzials erfolgte, die auf eine Remobilisierung von stark kontaminierten Altsedimenten schließen lässt. Die Schwebstoffe der Stauhaltung Heidelberg eines weiteren Neckarhochwassers im Februar 1999 (etwa HQ_{15}) wurden auf ihr bakterientoxisches, cytotoxisches, mutagenes und endokrines Schädigungspotenzial untersucht. Bei dieser Beprobung sollte geklärt werden, ob eine schnelle zeitliche Abfolge von stärkeren Hochwassereignissen zu einer verstärkten Remobilisation von Altsedimenten führen kann.

Abschnitt 8: Zusammenführung der Einzeluntersuchungen, Handlungsempfehlung. Im Abschnitt 8 dieser Arbeit werden die Befunde aus den einzelnen Teilstudien zusammengeführt und vor dem Hintergrund eines weiteren Forschungsbedarfs diskutiert. Auf der Basis der Befunde der einzelnen Teiluntersuchungen dieser Studie sollte eine gestufte Handlungsanweisung für die Untersuchung und Bewertung des ökotoxikologischen Potenzials von Fließgewässern zusammengestellt werden. In diesem Abschnitt wird auch die Zusammensetzung einer minimalen Biotestbatterie mit optionalen Erweiterungen vorgestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Behandlung der Wasserproben

2.1.1 Probennahme

Die Wasserproben wurden – sofern nicht anders gekennzeichnet – mit einem Wasserprobenentnehmer geschöpft und über einen Trichter in Glas- und Polyethylen(PE-)gefäße verschiedener Größen überführt. Die Wahl des Flaschenmaterials erfolgte dabei in Abhängigkeit vom angestrebten Untersuchungsendpunkt (Biotest, organische oder anorganische Analytik): Die Wasserproben für die Extraktion mit XAD-Harzen, für organisch-chemische und limnochemische Analytik sowie Biotests wurden in Glasflaschen (Duran, Schott, Mainz) gefüllt; bei diesen Untersuchungsparametern ist Glas aufgrund einer vergleichsweise geringen Adsorption der lipophilen Substanzen an den Wandungen und dem Fehlen von Weichmachern gegenüber PE-Flaschen zu bevorzugen. Wasserproben für eine atomabsorptionsspektroskopische Untersuchung wurden in PE-Flaschen transportiert und im angesäuerten Zustand (verdünnte HNO_3) gelagert, da die Verwendung von Glas zu Artefakten führen kann (Rump & Krist 1992).

2.1.2 Weiterverarbeitung im Labor

Die Proben wurden gekühlt und lichtgeschützt transportiert, im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt und wie folgt weiterverarbeitet:

- Für die Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in 5 Tagen (BSB_5) wurden die unfiltrierten Wasserproben, die bei der Probennahme direkt in Schliffglasflaschen abgefüllt wurden, im Labor in Karlsruher Flaschen überführt und wie in Abschnitt 2.1.4 dargestellt inkubiert.
- Jeweils 25 L der Wasserproben wurden unmittelbar nach Rückkehr ins Labor mittels Glasfaserfilter von 10 cm Durchmesser und 0,4 µm Porengröße (Sartorius, Göttingen) mit Stickstoff (N_2) druckfiltriert, um Schwebstoffe aus dem Wasser abzutrennen und eine Keimreduzierung zu erreichen.
- Für eine spätere Analyse der adsorbierbaren organischen Halogenverbindungen (AOX, Abschnitt 2.1.4) wurde umgehend filtriertes (AOX der gelösten Wasserinhaltsstoffe) und unfiltriertes (AOX der gelösten und partikulär gebundenen Wasserinhaltsstoffe) Wasser in Erlenmeyerkolben überführt und mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 2 gehäuften Spateln Aktivkohle versetzt.
- Für die Bestimmung der limnochemischen Parameter (Abschnitt 2.1.4) pH-Wert, Trübung, Elektrische Leitfähigkeit, Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm (SAK_{254}), Kalium-Permanganat-($KMnO_4$)-Verbrauch, Sulfat-, Ortho-Phosphat- und Chloridgehalt wurden 2 L unfiltriertes Wasser eingesetzt. Die Messungen wurden möglichst umgehend, in jedem Fall innerhalb von 12 Stunden durchgeführt.
- Für eine spätere Schwermetallgehaltsanalyse mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS, Abschnitt 2.4) wurden jeweils 50 ml filtriertes Wasser in PE-Zentrifugenröhrchen überführt und mit konzentrierter Salpetersäure versetzt.
- Jeweils 2 L filtriertes Wasser wurde in Glasflaschen (Duran, Schott) überführt und bei 4 °C gelagert. Innerhalb von 72 h wurden diese Proben im gekühlten und lichtgeschützten Zustand zum Hygiene-Institut der Universität Bonn transportiert. Dort wurden die Wasserproben von Herrn Roman Holtey-Weber auf ihre Gehalte an Polychlorierten Biphenylen (PCB), Phtalaten und Pestiziden sowie – nach On-line-Silylierung im GC-MS-MS (Holtey-Weber et al. 1999a, b) – auf die Konzentrationen (xeno-)östrogen wirksamer Substanzen untersucht.
- Bei den Hochwasserereignissen wurde jeweils 1 L Wasser bei der Probennahme in PE-Flaschen gefüllt und im Anschluss bei 4 °C gelagert, um später für die Bestimmung der Schwebstoffkonzentrationen (Abschnitt 2.3) eingesetzt zu werden.
- Wasserproben, die zu einem späteren Zeitpunkt in Biotests untersucht werden sollten, wurden in Glasflaschen (Duran, Schott) überführt und bei minus 24 °C gelagert.

2.1.3 Aufkonzentrierung von Wasserproben

Aufreinigung der XAD-Harze

Zur Aufkonzentrierung der Wasserproben wurde eine 1:1 Mischung (Vol %) der kommerziell erhältlichen Polyacrylsäureester-Gemische Amberlite®-XAD 4 und -XAD 7 (technische Ware, Serva, Heidelberg) nach Dürr (2000) eingesetzt. Durch eine Aufreinigung der technischen Ware unter sauren und basischen Bedingungen konnten die polareren, durch eine nachfolgende Extraktion mit Methanol (Polaritätsfaktor 0,95) die mittelpolaren und mit Aceton (Polaritätsfaktor 0,56) die unpolareren Verunreinigungen entfernt werden. Dazu wurden jeweils 700 ml

Harzgemisch in einen 2000 ml Rundkolben (Duran, Schott, Mainz) überführt, dreimal mit Aqua bidest., zweimal mit 0,1 M HCl, einmal mit Aqua bidest., zweimal mit 0,1 M NaOH und solange mit Aqua bidest. gewaschen, bis der pH 7 betrug. Im Anschluss wurden die Harze über jeweils 24 h in einer selbstgefertigten Extraktionsapparatur, bestehend aus einem 1000 ml Soxhlet mit einer Doppelkühlung mit den Lösungsmitteln Methanol (p.A., Merck, Darmstadt), Aceton (p.A., Merck, Darmstadt) und Methanol extrahiert. Das in möglichst großen Chargen (zwei während der gesamten Studie) gereinigte Harz wurde bis zur Verwendung in Methanol gelagert.

Extraktion der Wasserproben

Glassäulen (Ø 1,5 cm) mit Küken aus Teflon wurden mit 20 ± 0,5 cm des aufgereinigten XAD-Gemisches befüllt, die in einem Kühlraum mittels Stativen fixiert wurden. 20 L der druckfiltrierten Wasserproben (Abschnitt 2.1.2) wurden in einer Glasflaschen mit 5 % Methanol zur dynamischen Solvatisierung versetzt und mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert. Über einen Teflonschlauch, der mit einer Schliffolive an der Glassäule fixiert wurde, konnte die Wasserprobe über Nacht das XAD-Harz durchfließen. Dabei adsorbiert ein relativ breites Spektrum organischer Substanzen aufgrund ihrer Polarität an der Oberfläche des Harzes. Zur Verminderung des Wassergehaltes wurde die Säule nach der Extraktion mit Hilfe eines leichten Stickstoffstroms für 4 h getrocknet. Die adsorbierten Wasserinhaltsstoffe wurden mit zweimal 50 ml Methanol und zweimal 50 ml Aceton eluiert. Im Anschluss wurden beide Fraktionen vereinigt, das Volumen mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (200 mbar, 40 °C; Heidolph, Kelheim) reduziert und eine dreimalige Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan (p.A., Merck, Darmstadt) durchgeführt, um Wasserrückstände aus der organischen Phase abzutrennen. Der wässrige Rückstand wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und in Aceton rückgelöst. Die vereinigten Aceton- und Dichlormethanfraktionen wurden unter Stickstoff fast bis zur Trockene eingeengt und in 2 ml Dimethylsulfoxid rückgelöst, so dass die Wasserproben um einen Faktor 10.000 gegenüber der Orginalprobe angereichert wurden. Um die Effizienz der Aufreinigung (Gefahr des Ausblutens von XAD-Harzen) zu überprüfen, wurden 20 L Leitungswasser analog zu den Wasserproben extrahiert und als Blindprobe in den Bioassays eingesetzt. Die in DMSO rückgelösten Extrakte wurden in den unter 2.2.5 genannten Maximalkonzentrationen in den Biotests auf ihre toxische Wirkung überprüft.

2.1.4 Bestimmung limnochemischer und hydrologischer Parameter

Untersuchungen im Freiland

(A) Sedimentbewertungstriade. Vor Ort wurden an den Beprobungsstellen der Sedimentbewertungstriade folgende limnochemischen Parameter erfasst: Elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotenzial, Ge-

Tab. 2.1. Bei einer integrierten Sedimentbewertung im Freiland untersuchte limnochemische, hydrologische und morphologische Parameter. Die mit * gekennzeichneten Parameter wurden bei der Untersuchung von Hochwasserereignissen im Labor ermittelt.

Parameter	Maßeinheit	Methode/Messgerätetyp
Leitfähigkeit*	[µS/cm]	Microprozessor Conductivity Meter LF 96, WTW, Weilheim
Redoxpotenzial	[mV]	P1-pH/Millitvolt-Meter, Microelectrodes Inc., Bedford, NH, USA. Redoxelektrode: 4806, WTW
pH-Wert *		Microprozessor pH Meter pH 196, WTW
Gesamthärte	[°dH]	Komplexometrische Titration nach DIN 38406 – E 3-1 DEV E3.3
Carbonathärte	[°dH]	Acidimetrische Titration nach DIN 38409 Teil 7 DEV H7.2
Wassertemperatur *	[°C]	Microprozessor Oximeter OXI 196, WTW
Sauerstoffsättigung *	[%]	Microprozessor Oximeter OXI 196, WTW
Sauerstoffgehalt *	[mg/L]	Microprozessor Oximeter OXI 196, WTW
Wasserstand	[m]	Zollstock an einer markierten Gewässerstelle
Bachbreite	[m]	Zollstock an einer markierten Gewässerstelle
Fließgeschwindigkeit	[cm/s]	Driftkörpermethode
Sichttiefe	[cm]	Secchischeibe
Geruch	[Intensität/Qualität]	Olfaktorisch DEV B 1/2
Färbung	[Intensität/Qualität]	Visuell

samt- und Carbonathärte, Wassertemperatur sowie Sauerstoffkonzentration und –sättigung. Zudem wurden die hydrologischen und morphologischen Parameter Wasserstand, Gewässerbreite, Fließgeschwindigkeit, Sichttiefe, Geruch und Farbe des Wassers aufgenommen. In Tab. 2.1 sind die Analysemethoden und die verwendeten Messgeräte aufgeführt. Die Messung von Wassertemperatur, Sauerstoff, pH-Wert und Leitfähigkeit erfolgte *in situ* in der Gewässermitte. Zur Ermittlung der Gesamthärte und des Carbonatgehaltes wurde eine Wasserprobe der Strommitte entnommen und die Bestimmung vor Ort durchgeführt. Gewässerbreite, Wasserstand, Fließgeschwindigkeit und Sichttiefe wurden jeweils an einer markierten Stelle aufgenommen.

Weiterhin wurden folgende Daten während der Beprobung in ein Feldprotokoll der LfU aufgenommen: meteorologische Daten (Regenfälle und Bedeckung), hydrologische Daten (Breite, Tiefe, Fließgeschwindigkeit, Strömung, Wasserführung und der prozentuale Anteil der lenitischen Bezirke), Verbauung des Fließgewässers, Beschattung im Tagesgang, Vorkommen unterschiedlicher Habitate, Petrographie, makrooptische Verunreinigungen, Sichttiefe, Trübung, Farbe und Geruch des Wassers, Vorhandensein von Rohabwasser, Bakterien und siedlungsfeindliche Faktoren.

Fließgeschwindigkeit. Die Fließgeschwindigkeit wurde mit der Driftkörpermethode gemessen. Dabei wurde die Zeit ermittelt, die ein auf der Oberfläche eines Fließgewässers schwimmender Gegenstand benötigt, um die Strecke von 10 m zurückzulegen. Aus drei Messungen wurde das arithmetische Mittel für die Fließgeschwindigkeit gebildet, wobei zu beachten ist, dass die mittlere Strömungsgeschwindigkeit des Wassers nur etwa 85 % dieses Oberflächenwertes beträgt (Schwoerbel 1986).

Sichttiefe. Die Abnahme der Lichtintensität im Wasser wurde mit einer Secchischeibe abgeschätzt, die eigens zu diesem Zweck angefertigt wurde. Sie besteht aus einer runden Metallscheibe von 20 cm Durchmesser, deren Fläche in vier abwechselnd schwarz und weiß gefärbte Segmente unterteilt ist. Die Sichttiefe wurde dann erreicht, wenn während des Absinkens die Konturen der weißen Viertel nicht mehr zu erkennen waren (Klee 1993, Schwoerbel 1986).

Geruch. Es wurde eine geruchsfreie 1000 ml Glasflasche mit Wasser des betreffenden Fließgewässers gefüllt, mit einem Stopfen verschlossen, kräftig geschüttelt, der Stopfen wieder entfernt und gerochen (DEV B 1/2).

Färbung. Die Ermittlung der Färbung erfolgte visuell. Es wurde mittels einer 1000 ml Klarglasflasche aus der Mitte des betreffenden Fließgewässers Wasser entnommen und im diffusen Licht gegen einen weißen Hintergrund beurteilt.

(B) Hochwasserereignisse. Während der Hochwasserereignisse wurden die Abflüsse und Pegelstände des Neckars an den untersuchten Beprobungsorten Heidelberg und Lauffen kontinuierlich über die Internetseite der Hochwasservorhersagezentrale der Landesanstalt für Umweltschutz Karlsruhe, LfU (http://www.faw.uniulm.de:9876/uis/uis_allg.html) abgerufen. Übersichten über Abflüsse und Pegelstände wurden freundlicherweise von der Bundesanstalt für Gewässerkunde zur Verfügung gestellt

Untersuchungen im Labor

Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm

Tab. 2.2. Analysenmethoden und eingesetzte Messgeräte für die Bestimmung limnochemischer Parameter bei der Sedimenttriade und bei der Untersuchung von Hochwasserereignissen (*).

Parameter	Maßeinheit	Methode/Messgerätetyp
Ammonium	[mg/L]	Photometrische Bestimmung nach DIN 38406 – E5-1 DEV E5.2
Nitrit	[mg/L]	Spektrometrisches Verfahren nach DIN EN 26777 ISO 6777 DEV D10.3
Nitrat	[mg/L]	Photometrische Bestimmung nach DIN 38405 – D9-2 DEV D9.3.1
Sulfat	[mg/L]	Komplexometrische Titration nach DIN 38405 – D 5 - 1DEV D5.1
Ortho-Phosphat	[mg/L]	Photometrisches Verfahren nach DIN EN 1189: 1996 DEV D11.3
Chlorid	[mg/L]	Titration nach DIN 38405 – D1 – 1; DEV D1.2
SAK_{254}*	[AE]	Spektralphotometrische Messung nach DIN 38404 Teil 1 unter Anwendung des Verfahrens DEV C1-2 DIN 38404, Spektralphotometer (U 2000 Hitachi, Tokio, Japan)
$KMnO_4$-Verbrauch*	[mg/L]	Titration nach DIN 38409, Teil 5; DEV H4.1
Trübung *	[TE/F]	Photometrische Messung nach DIN EN 27 027, DEV C2; LPT 5, Dr. Lange, Berlin
AOX *	[mg/L]	DIN EN 1485: 1996; DEV H 14
BSB_5	[mg/L]	Microprozessor Oximeter OXI 196, WTW in Weilheim i. OB

(SAK_{254}). Viele Moleküle mit delokalisierten Elektronensystemen und/oder freien Elektronenpaaren zeigen Absorptionen im ultravioletten Spektralbereich. Daher kann der SAK_{254} als Summenparameter für gelöste organischer Inhaltsstoffe mit delokalisierten Doppelbindungen eingesetzt werden (Quentin et al. 1988).

Die nativen Wasserproben wurden zum Abtrennen des Schwebstoffes für 10 min bei 3000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der SAK_{254} wurde für jede Probe mit einem Spektralphotometer (U 2000, Hitachi, Tokio, Japan) als Median aus 12 Messungen (Quarzküvette, Schichtdicke 5 cm) bestimmt (DIN 38 404, Teil 3, DEV C3, 1976; Quentin et al., 1988).

Kaliumpermanganat-Verbrauch. Die Bestimmung des Kaliumpermanganat ($KMnO_4$)-Verbrauches, einem Summenparameter für die Belastung durch oxidierbare organische Stoffe, erfolgte durch Titration nach DIN 38409, Teil 5; DEV H4.1 (1968 & 1989).

100 ml der unfiltrierten Wasserprobe wurden in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Kühlbirne nach Zusatz von 5 ml 25% Schwefelsäure auf einer elektrischen Heizplatte zum Sieden erhitzt. Falls beim Erhitzen die Farbe der Lösung bräunlich wurde oder eine vollständige Entfärbung eintrat, wurde die Untersuchung mit einer in Aqua bidest. verdünnten Wasserprobe (Gesamtvolumen 100 ml) wiederholt. Die siedende Lösung wurde zügig mit 15 ml 0,01 N $KMnO_4$ versetzt, wieder bis zum Sieden erhitzt und noch 10 min bei gleichmäßigem schwachem Sieden (weitere Kochplatte mit etwas niedriger Temperatur) gehalten. Nach raschem Zufügen von 15 ml 0,01 N Oxalsäure wurde kurz weiter gekocht, bis sich die Lösung entfärbte. Die entfärbte Lösung wurde mit 0,01 N $KMnO_4$ bis zu einem kurz anhaltenden Farbumschlag nach rosa pipettiert (Dosimat 665, Metrohm, Filderstadt). Wurden weniger als 3 ml 0,01 N $KMnO_4$ verbraucht, wurde die Bestimmung mit einer größeren, bei mehr als 10 ml mit einer kleineren Wasserprobenmenge wiederholt. Der Titer der 0,01 N Kaliumpermanganatlösung (gegen 0,01 N Oxalsäure einstellen; Ermittlung des Korrekturfaktors *f*) wurde bei der Berechnung berücksichtigt. Die Berechnung des Kaliumpermanganatverbrauchs erfolgte nach der Gleichung:

$$G = \frac{[(15+a)\cdot f - 15]\cdot 0{,}316\cdot 1000}{b}$$

mit G = Kaliumpermanganatverbrauch in mg/L, a = verbrauchte $KMnO_4$-Lösung in ml, b = ml des untersuchten Wassers, *f* = Korrekturfaktor der $KMnO_4$-Lösung (f=15/Verbrauch $KMnO_4$ in ml)

Der Korrekturfaktor *f* wurde bestimmt, indem zu einer titrierten Wasserprobe 15 ml 0,01 N Oxalsäure gegeben und mit 0,01 N $KMnO_4$ bis zur kurz anhaltenden Rosafärbung titriert wurde (Quentin et al. 1988).

Adsorbierbare organische Halogenverbindungen (AOX). Der AOX ist ein Summenparameter für die in einer Umweltprobe vorkommenden organisch gebundenen Halogene Chlor, Brom und Jod. Neben den über 2500 natürlichen Organohalogenverbindungen gehen auch die zahlreichen anthropogenen halogenierten Syntheseprodukte wie chlorierte und bromierte Pestizide und Herbizide, Polychlorierte Biphenyle (PCB) und chlorierte Aromaten wie Hexachlorobenzene in diese Messgröße ein. Obgleich der Anteil der natürlichen Organohalogenverbindungen am AOX bisher unterschätzt wurde (Keppler et al. 2000), gilt er als ein etablierter Parameter zur Ermittlung der summarischen anthropogenen Belastung durch organische Halogenverbindungen. Die AOX-Bestimmung erfolgte nach DIN EN 1485, DEV H 14:

Zwei Doppelansätze mit jeweils 100 ml filtrierter und unfiltrierter Wasserprobe wurden mit zwei Tropfen konzentrierter Salpetersäure (HNO_3 konz.), 5 ml angesäuerter Natriumnitratlösung und 2 gehäuften Spateln Aktivkohle versetzt. Anschließend wurde das Gemisch auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Die durch das saure Milieu in Lösung gehaltenen organischen Halogenverbindungen adsorbieren dabei an die Aktivkohle. Nach mindestens einer Stunde wurden die Proben durch einen Polycarbonat-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert und bei etwa 1000 °C im AOX-Messgerät (Euroglas-Pyrolyse-Microcoulometer-Apparatur nach DIN 38409, Euroglas Analytical Instruments, Karlsruhe) verbrannt. Dabei reagiert organischer Kohlenstoff zu CO_2 und die gebundene Halogene zu hydrogenen Halogenen (HX). Die hydrogenen Halogene wurden durch einen Trägergasstrom in eine Titrationszelle überführt, in der die Menge an Haliden microcoulometrisch gemessen wurde.

Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB_5). Der Biochemische Sauerstoffbedarf wurde nach 5 Tagen bestimmt (DIN EN 38409, DEV H 51, 1987). Er ist ein Maß für den Verschmutzungsgrad des Wassers mit leicht abbaubaren organischen Substanzen und wird ermittelt als die Sauerstoffmenge [mg/L], die notwendig ist, um bei 20 °C die organische Substanz mit Hilfe der Stoffwechseltätigkeit der Mikroorganismen bis zu einem gewissen Ausmaß zu oxidieren (Klee 1993). Für die Untersuchung wurde das Wasser gekühlt und abgedunkelt ins Labor transportiert und in Karlsruher Flaschen (500 ml) gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass beim Einfüllen und Verschließen mit einem Glasstopfen kein zusätzlicher Sauerstoff in das Was-

ser gelangte. Die Flaschen wurden abgedunkelt in Wärmeschränken (BK 600 Heraeus, Hanau) bei 20 °C inkubiert. Am ersten Tag wurde in Intervallen von sechs, ab dem zweiten Tag alle zwölf Stunden die Sauerstoffkonzentration [mg/L], die Sauerstoffsättigung [%] und die Temperatur [°C] mit einem Oximeter (OXI 196, WTW, Weilheim) gemessen. War ein starker Sauerstoff-Verbrauch abzusehen, wurde das Wasser je nach Bedarf mit Kunstwasser (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.6) verdünnt. Eine Kontrolle wurde mitgeführt, da ein Absinken der Werte unter 2 mg/L eine Verfälschung der Ergebnisse durch anaerobe Vorgänge zur Folge haben kann (Schwoerbel 1986). Im Beprobungsmonat August wurde eine 1:4-Verdünnung aller Gewässerproben mit sauerstoffgesättigtem Kunstwasser vorgenommen. Der Sauerstoffgehalt wurde je nach Geschwindigkeit 1-2 mal täglich kontrolliert und bei Bedarf aufgesättigt.

Trübung. Die Trübung des Wassers wird dadurch hervorgerufen, dass eingestrahltes Licht an Schwebstoffpartikeln reflektiert wird. Sie beruht vielfach auf Lehm- und Tonteilchen, kann aber auch durch den Gehalt an Schwermetallen – besonders Eisen – und der Eigenfärbung des Wassers beeinflusst werden (Klee 1993). Die Trübung wird aufgrund ihrer hohen Korrelation zur Schwebstofffracht oft als Indikator für Schwebstoffgehalt in der Wasserprobe benutzt. Die Trübung wurde aus den aufgeschüttelten, nativen Wasserproben mit einem Streulicht-Trübungsmessgerät (LPT5, Dr. Lange) nach DIN EN 27 027 , DEV C2 (1994) bestimmt.

2.2 Behandlung der Sedimentproben

2.2.1 Probennahme

In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden in dieser Studie unterschiedliche Techniken für die Entnahme von Sedimenten eingesetzt.

Sedimentbewertungstriade

Im Rahmen dieser Teilstudie (Abschnitt 4) wurde nur oberflächennahes Sediment (0-5 cm) aus dem Fließgewässer entnommen, dessen Schädigungspotenzial im Rahmen einer möglichen Interaktion mit der Wassersäule untersucht werden sollte. Daher konnten die Proben als gestörte Proben entnommen werden, bei denen nicht auf die Erhaltung des natürliches Gefüges geachtet werden musste. Um der großen Variabilität der Sedimentproben, deren Schadstoffgehalt auf kleinster Fläche um ein Vielfaches variieren (Hakanson 1992, Ingersoll 1995, Mudroch & MacKnight 1994a), gerecht zu werden, wurden in einem Areal von etwa 5 m² jeweils zwanzig Proben nach dem Zufallsprinzip entnommen und in einem Gefäß aus Polyethylen zu einer Sammelprobe vereinigt. Aufgrund unterschiedlicher Zugänglichkeit der einzelnen Beprobungsstellen wurde das Sediment an gut erreichbaren Stellen mit einem Sedimentkerner (Polyethylenrohr mit 15 cm Länge und 5 cm Ø, verschließbar mit Stopfen aus PE), an schlecht erreichbaren Stellen mit einem Van-Veen-Bodengreifer (Hydro-Bios, Kiel-Holtenau, Abb. 2.1) entnommen.

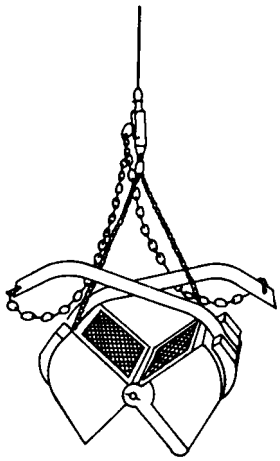


Abb. 2.1. Sedimentprobennehmer nach Van Veen, aus: Mudroch & MacKnight (1994).

Interdisziplinäre Untersuchungen von Bohrkernen der Staustufe Lauffen

Bei diesen Untersuchungen (Abschnitt 7), bei denen *In vitro*-Biotests, chemische Analysen und Analysen zur Erosionsstabilität von Sedimenten im SETEG-System kombiniert eingesetzt wurden, sollten nur wenige, möglichst lange und ungestörte Bohrkerne entnommen und nach einer Segmentierung in verschiedene Abschnitte tiefenorientiert analysiert werden. Die Entnahme der Bohrkerne erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Kern und Herrn Dipl. Hyd. Haag (Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart) und dem Tauchschiff Frosch (Wasser- und Schifffahrtsamt Stuttgart) im März 1998 mit 1,5 m langen Stoßröhren aus Plexiglas (Ø 13,5 cm, Haag et al. 1999b). Die Kerner wurden von Tauchern in das Sediment gerammt, mit einer Dichtung, die über ein Fallgewicht bedient wurde, verschlossen und mit einem hydraulischen Hebearm auf das Schiffsdeck gehoben. An insgesamt drei Standorten der Stauhaltung Lauffen wurden jeweils mindestens 2 korrespondierende Bohrkerne entnommen. Die Kerne wurden nach Transport in das Institut für Wasserbau mit Hilfe einer zerstörungsfrei arbeitenden Gamma-Strahl-Dichtemessanlage auf ihre sedimentologische Ähnlichkeit

überprüft und Dichtesprünge als Indikator für Hochwassereinschnitte ermittelt (Haag et al. 1999a). Mindestens ein Bohrkern wurde für die anschließende Untersuchungen zur Erosionsstabilität (Kern et al. 1999) bei 4 °C gelagert. Der korrespondierende Kern wurde in Abschnitte von 5 cm Dicke segmentiert, diese mit einem Edelstahllöffel homogenisiert und Teilmengen für physikochemische und chemische Analytik (Institut für Wasserbau, Stuttgart, Methoden bei Haag et al. 1999b), Altersdatierung (Cs-137, Pb-210, Institut für Umweltphysik, Heidelberg) sowie *In vitro*-Biotests (Abschnitt 2.6) in Weithalsgefäße überführt. Die Sedimentproben für die Bioassays wurden gekühlt bei 4 °C nach Heidelberg transportiert und innerhalb von 16 h weiterverarbeitet.

2.2.2 Gewinnung von Porenwasser

Da sich die Zusammensatzung des Porenwassers bei Sedimenten unter nicht-natürlichen Bedingungen sehr schnell verändern kann (Burton 1992), wurde unmittelbar nach dem Transport der Proben ins Labor mit seiner Gewinnung begonnen. Die Sedimentproben wurden mit Edelstahllöffeln in 50 ml Zentrifugenröhrchen (PE, Greiner, Frickenhausen) überführt und das Porenwasser durch Zentrifugation mit 3000 g bei 4 °C über 10 min (Biofuge und Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) gewonnen (Bufflap & Allen 1995, Burton 1991, 1992).

Die Porenwässer für den Ames-Test wurde nach Keimreduzierung mit Glasfaserfilter (MN GF-5, 0,45 µm, Macherey & Nagel, Düren), die Porenwässer für allen anderen Bioassays im nativen Zustand in Glasflaschen (Duran, Schott, Mainz) oder 10 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei -24 °C tiefgekühlt. Auf die Verwendung von Inertgas (N_2 oder He) wurde aufgrund der aeroben Aufarbeitung der Sedimente und der aeroben Exposition des Porenwassers in den Biotests verzichtet (Hollert & Braunbeck 1997, Zimmer & Ahlf 1994). Für die späteren Schwermetallanalysen wurden jeweils 25 ml des Porenwassers mit konzentrierter Salpetersäure versetzt und bei 4 °C gelagert.

2.2.3 Gefriertrocknung der Proben

Ein Großteil der Sedimentproben wurde für weitere Untersuchungen und zur Herstellung von Extrakten und wässrigen Eluaten für Biotests gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage: Beta 1-8 K mit Anlagensteuerung LMC-1; Christ, Osterode). Dazu wurden je 250 ml Sedimentprobe in 1 L Glaskolben (Duran, Schott, Mainz) überführt und im Kühlbad bei –30 °C für etwa 10 min rotiert, wobei die Sedimente als dünner Film an der Kolbenwand gefrieren. Die Kolben wurden an die Vakuumpumpe der Gefriertrocknungsanlage, die mit einem Eiskondensator verbunden war, überführt und bis zur Trockene dort belassen. Die gefriergetrockneten Sedimente wurden gemörsert, homogenisiert und bei 4°C und Dunkelheit in Glasgefäßen aufbewahrt.

2.2.4 Elution und Extraktion der Sedimentproben

Wässrige Elution

Mit wässrigen Elutionstests lässt sich im Biotest die Resuspension des Sedimentes bei oxidierenden Umweltverhältnissen simulieren (Ahlf 1995, Hollert et al. 1999g, Zimmer & Ahlf 1994), wie sie etwa bei Hochwasserereignissen und Baggergutverklappungen vorliegen.

Die Sedimentproben wurden in einer definierten Menge Aqua bidest. (1:4 nach Vorschrift der U.S. Environmental Protection Agency [EPA], Burton 1991, 1992); bei einer vermeintlich geringen Toxizität der Probe auch 1:2 oder 1:1) suspendiert; wenn nicht anders gekennzeichnet für 12 h bei 4 °C mit einem Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Kelheim) mit 20 Upm rotiert. Durch Zentrifugation (3000 g bei 4°C) wurden die wässrigen Eluate von feinen Partikeln befreit. Die Proben wurden nativ und nach einer Sterilfiltration (0,2 µm; Fa. Schleicher & Schuell) in den unten beschriebenen *In vitro*-Tests (siehe Abschnitt 2.6) auf ihre toxische Wirkung untersucht.

Organische Extraktion

In der Sedimenttoxikologie versteht man unter einer Extraktion das Überführen von partikelgebundenen Schadstoffen in eine andere, flüssige Phase, durch die einmalige oder mehrmalige Einwirkung eines organischen Extraktionsmittels (vgl. Ahlf 1995, Burton 1991, Hollert et al. 1999g, Zimmer & Ahlf 1994). Für eine möglichst vollständige, multiple Extraktion wurde eine einfache Extraktion in einer automatisch arbeitenden Apparatur (Soxhlet) aus einem Kolben mit 2 Siedesteinen, einem Extraktionsaufsatz und einem Rückflußkühler mehrmals wiederholt: Das im Kolben befindliche Lösungsmittel wird dabei teilweise verdampft; das Kondensat tropft auf die in der Extraktionshülse befindliche Sedimentprobe und wird anschließend in den Kolben zurückgeführt. Dabei reichern sich die abzutrennenden Fremdstoffe im Lösungsmittel an (Hollert & Braunbeck 1997). Die gefriergetrockneten Sedimentproben wurden durch Aufschütteln gleichmäßig in dem Lagerungsbehälter verteilt (homogenes Verteilen der verschiedenen Korngrößen) und jeweils in eine Extraktionshülse aus Zellstoff (100 bzw. 200 ml, Schleicher & Schuell,

Dassel) überführt. Die Extraktion der Probe kann mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Wasser, Ethanol, Aceton, Dichlormethan und Hexan) durchgeführt werden (Ho & Quinn 1993a,b, Hollert et al. 2000a, True & Heyward 1990); für die Gesamtextrakte wurde Aceton aufgrund seiner hohen Extraktionsleistung bei geringer Umweltschädlichkeit verwendet (Hollert & Braunbeck 1997). Die mit der Probe und Glaswolle aufgefüllte Hülse sollte bei laufender Extraktion zeitweise vollständig vom Lösungsmittel bedeckt sein. Um die Wärmeabgabe des Rundkolbens und des Steigrohres an die Außenluft gering zu halten, wurden diese mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Extraktion erfolgte unter ständiger Wasserkühlung, bei kleinen 100 ml Soxhlet mit 12 Zyklen pro Stunde über 8 bis 12 h und, bei großen 200 ml Soxhlet, mit 6 Zyklen pro Stunde über 24 h. Die Proben wurden im Rotationsverdampfer (300-500 mbar, 38 °C) konzentriert, Aliquote für organische chemische Analysen entnommen und nach Überführen in Schraubdeckelreagenzgläser mit N_2 (1,5-2 bar) fast zur Trockene eingeengt. Die Proben wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva) als Lösungsvermittler in einer Konzentration von 10 bis 30 g Sedimentäquivalent (Trockengewicht) pro ml DMSO rückgelöst und bei -24°C im Tiefkühlfach aufbewahrt. Die Extrakte wurden im Ames-Test nativ, im Cytotoxizitäts- und Bakterienkontakttest nach einer Verdünnung mit Medium mit einer Höchstkonzentration von 1 % DMSO im Testansatz eingesetzt. Die Höchstkonzentration im Embryotoxizitätstest mit *Danio rerio* und EROD-Assay mit Hühnerleberkulturen betrug 0,3 %, sowie im Comet- und Dot-Blot-Assay 0,15 % DMSO.

2.2.5 Fraktionierung von acetonischen Extrakten nach pH-Wert

Aus gefriergetrocknetem Sediment (180 bis 200 g Trockengewicht) wurde nach der oben dargestellten Arbeitsvorschrift ein acetonischer Extrakt hergestellt, dieser mit N_2 annähernd bis zur Trockene abgeblasen, in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und mit anschließender Flüssig/Flüssig-Extraktion (Ablaufschema der Trennung in Abb. 2.2) in eine stark saure, schwach saure, basische und neutrale Fraktion aufgetrennt (Erdinger et al. 1997, Ho & Quinn 1993b, Hollert et al. 2000a, Irmer et al. 1986, Robards et al. 1994). Das getrocknete Extrakt wurde mit 10 ml Dichlormethan (p. A., Merck) in einem 50 ml Reagenzglas mit Teflonschraubdeckel rückgelöst.

- 10 ml 0,05 M Na_2CO_3-Lösung wurde zu dem Ansatz pipettiert, das Reagenzglas aufgrund einer CO_2-Entwicklung mehrmals belüftet und für 10 min im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Kelheim) mit ¾ der maximalen Umdrehungszahl rotiert. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde das Reagenzglas auf einer Eis-NaCl-Mischung (-18 °C) bis zu einer Phasentrennung (10-20 min) inkubiert. Eine komplette Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 4000 Upm

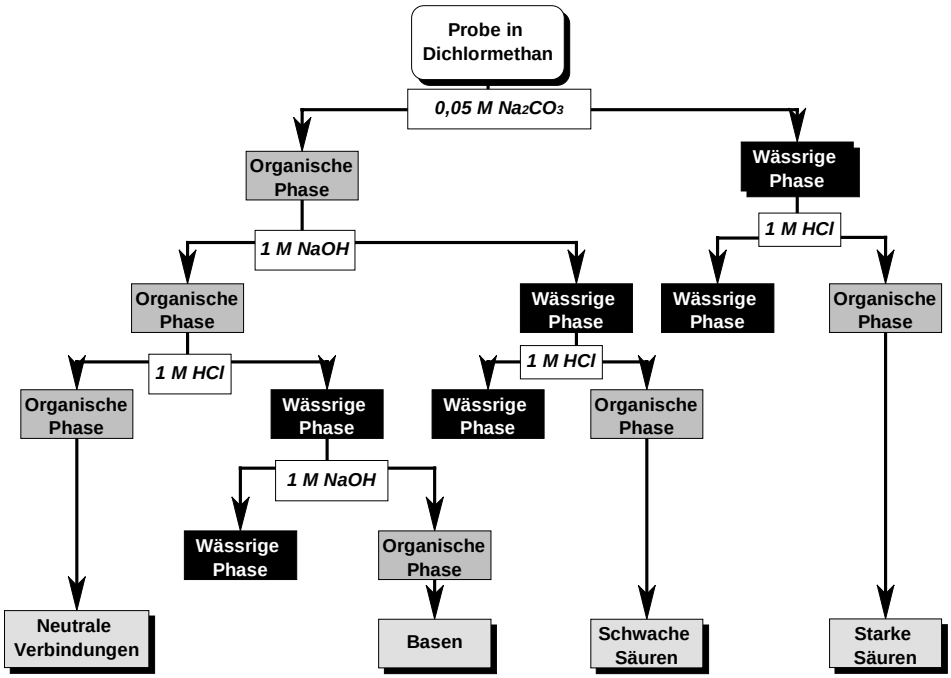


Abb. 2. 2. Schematische Vorgehensweise bei der Trennung von Extrakten mit einer Flüssig / Flüssig-Extraktion nach unterschiedlichem pH-Wert (Säure-Base-Trennung) in 4 Fraktionen mit stark sauren, sauren, neutralen und basischen Verbindungen; modifiziert nach Erdinger et al. (1997) und Robards et al. (1994).

(Megafuge 1.0. Heraeus, Hanau) über 10 min erreicht. Die wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgehoben und der Ausschüttelvorgang erneut wiederholt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 1 M HCl angesäuert und mit zweimal 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Durch die Fraktionierung reichern sich in diesem Ansatz die *starken Säuren* an.

- Die organische Phase wurde zweimal mit 10 ml 1 M NaOH ausgeschüttelt, die vereinigten wässrigen Phasen mit 25 ml 1M HCl angesäuert und zweimal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert; in dieser Fraktion sind die *schwachen Säuren* enthalten.
- Die organische Phase wurde mit zweimal 10 ml 1 M HCl ausgeschüttelt, der pH-Wert der wässrigen Phase mit 25 ml 1 M NaOH erhöht und mit zweimal 10 ml Dichlormethan extrahiert. In Dichlormethan überwiegen die *basischen Verbindungen*.
- Die verbleibende organische Phase enthält die *neutralen Verbindungen*.

Die erhaltenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer (38 °C, 300 mbar, Heidolph, Kelheim) eingeengt, in verschraubbare 10 ml Reagenzgläser überführt und mit Stickstoff (1,5 bis 2 bar) annähernd bis zur Trockene eingeengt. Die in DMSO rückgelösten Extrakte wurden bei – 24 °C gelagert und analog zu den acetonischen Gesamtextrakten in den Biotests auf ihre Toxizität untersucht.

2.2.6 Bioassay-dirigierte Fraktionierung mit Säulenchromatographie und HPLC

Zur Bestimmung der Identität von mutagenen und EROD-induzierenden Substanzen eines organischen Extraktes des Forellenbachs 1 (direkt nach der Kläranlageneinleitung) wurde in Kooperation mit Dr. Brack (UfZ, Leipzig) eine Bioassay-dirigierte Fraktionierung mittels Säulenchromatographie und HPLC sowie den biologischen Endpunkten Ames-Test und EROD-Induktion in der Zelllinie RTL-W1 durchgeführt. Fraktionierungen und EROD-Assays wurden am UfZ Leipzig von Herrn Dr. Brack und Herrn Dipl. Chem. Kind durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Fraktionierungstechniken und eine chemische Charakterisierung der Proben ist bei Brack (2000) dargestellt.

Das Sediment wurde für 24 h im Soxhlet mit Dichlormethan extrahiert. Schwefel wurde durch Ausschütteln des Extraktes mit 20 g aktiviertem Cu pro 200 g Sedimenttrockengewicht entfernt und das Extrakt in einer Konzentration von 10 g Sedimenttrockengewicht pro ml DMSO (SEq/ml) rückgelöst.

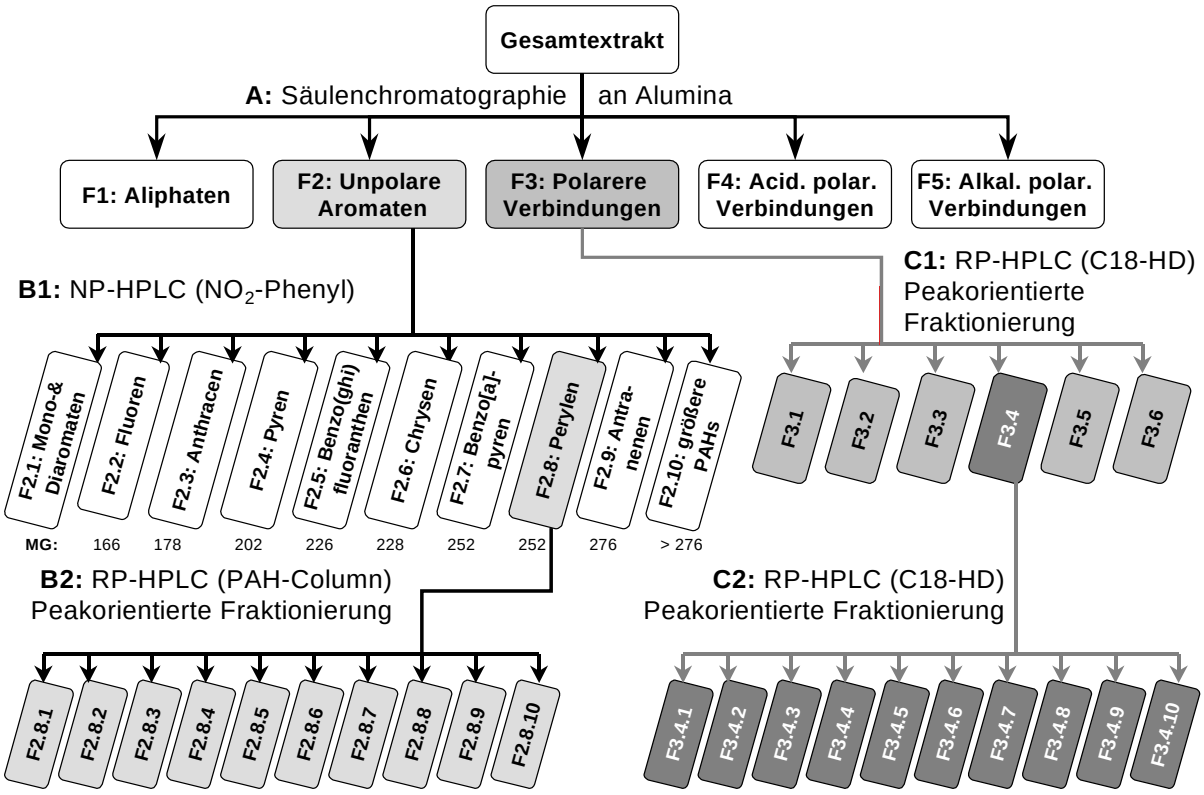


Abb. 2.3. Übersicht über die mit dem Extrakt des Forellenbachs 1 durchgeführten Fraktionierungsschritte. Für die Fraktionierung B1 sind die Molekulargewichte (MG) und Beispielsubstanzen der PAHs angegeben, die in der jeweiligen Fraktion eluieren. NP= Normal phase, RP= Reversed phase, in Klammern jeweils die verwendeten HPLC-Säulen.

Säulenchromatographie an Alumina (F.x)

Jede Säule wurde mit 90 g Alumina (ICN, activity I, mit 4,5 % H_20 deaktiviert) befüllt. Nach Beladung mit 10 ml entschwefeltem Sedimentextrakt, sorbiert an 18 g deaktiviertem Alumina, wurden die Säulen mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: F1: 72 ml *n*-Hexan (Aliphaten), F2: 270 ml *n*-Hexan/Dichlormethan (90/10), F3: 270 ml Dichlormethan, F4: 270 ml Methanol/Essigsäure (99/1). Ausschütteln der Fraktion F4 mit 100 ml 0,01 M HCl und 3 x 25 ml Dichlormethan und anschließendes Trocknen über Na_2SO_4 ergab F4ac. Die Fraktion F4alk wurde nach Einstellen auf pH 12 mit NaOH durch erneutes Ausschütteln mit 3 x 25 ml DCM eluiert. Alle Fraktionen wurden auf ein einheitliches Volumen eingeengt (= 10 g SEq/ml). Das säulenchromatographische Fraktionierungsverfahren wurde zuvor mit Standardsubstanzen entwickelt Brack et al. (2001a): F1: Heptadecan, Heneicosan, F2: Pentachlorbenzol, PCBs 28, 126, 209, 2,3-Dichlornaphthalin, 1,2,3,5,6,7-Hexachlornaphthalin, Fluoren, Benzo(a)pyren, Benzo(ghi)-perylen, F3: N-Phenyl-ß-Naphthylamin, Methylparathion, Prometryn (mittelpolare Substanzen, die sich bei vorhergehenden Studien für ein Fließgewässer der Neuen Bundesländer für in der Positivkontrolle Spittelwasser als ökotoxikologisch relevant erwiesen haben (Brack et al. 2000). Da die höchsten mutagenen und EROD-induzierenden Effekte von unpolaren und mittelpolaren aromatischen Verbindungen erwartet wurden, lag die Priorität auf der möglichst vollständigen Erfassung dieser Verbindungen in den Fraktionen F2 und F3. Eine unvollständige Abtrennung langkettiger Aliphaten musste dabei in Kauf genommen werden. Die am frühsten eluierende aromatische Verbindung Pentachlorbenzol eluierte zu > 90% in F2, während F2 auch noch etwa 30 % Heptadecan bzw. Heneicosan enthielt. Die letzte der eingesetzten unpolaren aromatischen Standardsubstanzen Benzo(ghi)perylen (MW 272) eluierte zu 99% in F2.

HPLC-Fraktionierung unpolarer Aromaten nach Zahl der aromatischen Ringe (F2.x)

Die Fraktion F2 wurde mittels präparativer Normalphasen-HPLC unter folgenden Bedingungen fraktioniert (Abb. 2.3, Schritt B1): Säule: Nucleosil 100 NO_2, Macherey & Nagel, Porendurchmesser 10 nm, 2,1 x 25 cm, Phase: ($-(CH_2)_3$-Phenyl-NO_2), Säulentemperatur: 10°C, Elutionsmittel: isokratisch Dichlormethan/n-Hexan 95/5, Fluss: 19 ml/min, Detektion: UV bei 250 und 280 nm. Diese Fraktionierungsmethode wurde anhand von Standardsubstanzen entwickelt Brack et al. (2001a). In Abb. 2.3 sind die Molekulargewichte der Standardsubstanzen sowie Beispielsubstanzen, die in den jeweiligen Fraktionen eluieren, dargestellt. Methylierte PAHs erschienen dabei in den gleichen Fraktionen wie die Muttersubstanzen und damit früher als PAHs vergleichbarer Molekulargewichte; somit erfolgte eine Fraktionierung tatsächlich nach Aromatizität und nicht nach Molekulargewicht.

HPLC-Fraktionierung der polareren Verbindungen (F3.x)

Die Aluminafraktion F3 (polarere Verbindungen) wurde mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC mit den nachfolgend genannten Parametern peakorientiert in 6 Teilproben aufgetrennt (Abb. 2.3, Schritt C1): Säule: Nucleosil 100-5 C18 HD, Macherey & Nagel, Porendurchmesser 10 nm, ∅ 2,1 cm, Länge 25 cm, Phase: Octadecyl, endcapped, monomere Belegung, Säulentemperatur: 10°C, Elutionsmittel: isokratisch Acetonitril, Fluss: 9,5 ml/min, Detektion: UV bei 250 und 280 nm, Fraktionen: F3.1 (3-7.8 min), F3.2 (7.8-10 min), F3.3 (10-15 min), F3.4 (15-20 min), F3.5 (20-26 min), F3.6 (26-42 min).

HPLC-Fraktionierung der Teilprobe F2.8

Die Teilprobe F2.8 (PAHs mit Molekulargewicht 252) des Forellenbachsedimentes wurde aufgrund ihrer ermittelten hohen direkten und indirekten Mutagenität mit Hilfe präparativer Umkehrphasen-HPLC peakorientiert fraktioniert (F2.8.x, Abb. 2.3, Schritt B2): Säule: Nucleosil 100-5 C18 PAH, Macherey & Nagel, Porendurchmesser 100 Å, Phase: Octadecyl, endcapped, polymere Belegung, Säulentemperatur: 10 °C, Elutionsmittel: isokratisch Acetonitril, Fluss: 9,5 ml/min, Detektion: UV bei 250 und 280 nm. Fraktionen: F2.8.1 (1-19.7 min), F2.8.2 (19.7-24.1 min), F2.8.3 (24.1-26.6 min), F2.8.4 (26.6-29.5 min), F2.8.5 (29.5-31.6 min), F2.8.6 (31.6-36.4 min), F2.8.7 (36.4-45 min), F2.8.8 (45-50 min), F2.8.9 (50-60 min). Das Chromatogramm für die Fraktion Forellenbach F2.8 ist in Abb. 2.4 dargestellt.

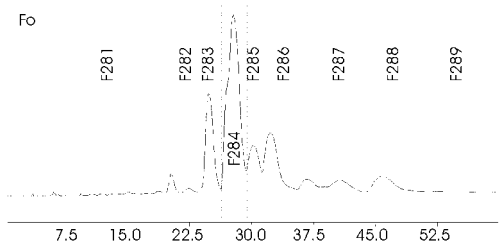


Abb. 2.4. Chromatogramm der Fraktionierung F2.8x (modifiziert nach Brack et al. 2001a).

HPLC-Fraktionierung der Teilprobe F3.4

Die peakorientierte Trennung der Fraktion F3.4 des Forellenbachsedimentextrakts erfolgte mittels präparativer Normalphasen-HPLC: Säule: Nucleosil 100 NO_2, Macherey & Nagel, Phase: (-$(CH_2)_3$-Phenyl-NO_2), Porendurchmesser 100 Å, 2,1 x 25 cm, Säulentemperatur: 10°C, Elutionsmittel: isokratisch Dichlormethan/n-Hexan 95/5, Fluss: 19 ml/min, Detektion: UV bei 250 und 280 nm. Fraktionen: F3.4.1 (5-13.7 min), F3.4.2 (13.7-15.75 min), F3.4.3 (15.75-17.2 min), F3.4.4 (17.2-18.5 min), F3.4.5 (18.5.-20 min), F3.4.6 (20-21.5 min), F3.4.7 (21.5-22.7 min), F3.4.8 (22.7-24.5 min), F3.4.9 (24.5-35 min). Abb. 2.5 zeigt das Chromatogramm der Fraktionierung.

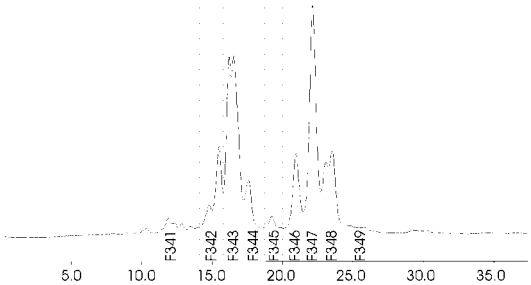


Abb. 2.5. Chromatogramm der Fraktion Forellenbach 1, F3.4, modifiziert nach Brack et al. (2001a).

Die Fraktionen wurden nach einem Lösungsmitteltausch nach DMSO im Ames-Test (Methode in Abschnitt 2.6.2) und EROD-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 (Methode in Behrens & Segner 1999, Brack et al. 2000) getestet.

2.2.7 Bestimmung des Wassergehaltes der Proben

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden je 10 g natives Sediment analytisch genau in Glasbecher eingewogen und in einen Wärmeschrank bei 105 °C inkubiert. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz wurden die Sedimente erneut gewogen und die Differenz zum Feuchtgewicht als Wassergehalt in Prozent umgerechnet (Wilhelm 1997).

2.2.8 Bestimmung des Gesamtkohlenstoff- und Gesamtschwefelgehaltes

Die Bestimmung des Kohlenstoff-(C_{total})- und Schwefelgehaltes (S_{total}) der Proben wurden am Institut für Umweltgeochemie der Universität Heidelberg mit einem Carbon-Sulphur Determinator (CS-225, Leco Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen Hochfrequenz-Induktionsofen mit einem Microprozessor und einer angeschlossenen Waage (MC 1 Analytic AC 210 S, Sartorius, Göttingen). Für die Analyse wurden etwa 50 mg gefriergetrocknete Probe in einen kleinen Keramiktiegel überführt und mit jeweils einem Spatel Wolfram (763-266, Leco Instruments, Kirchheim bei München) und Eisenspänen (501-077, Leco Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) versetzt. Dieses Gemisch wurde nach Homogenisierung im Hochfrequenz-Induktionsofen unter Sauerstoffatmosphäre verbrannt, um den Schwefeldioxidgehalt nach Trocknung in einer Schwefelinfrarot-Zelle zu messen. Anschließend wurde SO_2 katalytisch zu SO_3 oxidiert und in einer Schwefelfalle aus dem Gasstrom entfernt. Die Bestimmung des in der Gasphase verbleibenden CO_2 erfolgte Infrarot-spektrometrisch. Zur Kalibrierung wurde ein Reagenz mit bekanntem Kohlenstoff- und Schwefelgehalt (Leco Instruments) eingesetzt.

2.2.9 Bestimmung des Carbonatgehaltes und des organischen Kohlenstoffes (TOC)

Die Bestimmung des Carbonatgehaltes der Sedimentproben konnte am Institut für Umweltgeochemie durch gasometrische CO_2-Analyse in einer Müller-Gastner-Carbonatbombe (Müller & Gastner 1971) durchgeführt werden. Diese Methode beruht auf einer zum Karbonatgehalt der Probe proportionalen Druckzunahme, die sich durch eine CO_2-Entwicklung nach Säurezugabe ergibt. Für die Messung wurden ca. 700 mg gefriergetrocknete Sedimentproben eingewogen und mit 5 ml Salzsäure (25%, Merck, Darmstadt) versetzt. Da der äußere Luftdruck das Messverfahren beeinflusst, wurde das Manometer vor der Messung mit Hilfe einer Referenzproben (Calcit mit einem Carbonatgehalt von 95 %) kalibriert. Um den Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) zu bestimmen, wurde der anorganische Kohlenstoffgehalt vom Gesamtkohlenstoffgehalt abgezogen.

2.2.10 Korngrößenanalyse

Da generell der Gehalt an hydrophoben, organischen Schadstoffen mit abnehmender Korngröße durch die größere Sorptionsfläche zunimmt, stellt die Korngrößenverteilung eine wichtige Einflussgröße für Adsorption und Bioverfügbarkeit von sedimentbürtigen Schadstoffen dar (Burton 1991, Suedel & Rodgers 1994, Zimmer & Ahlf 1994).

Die Korngrößenbestimmung wurde am Geographischen Institut der Universität Heidelberg in einem kombinierten Sieb- und Schlämmverfahren (DIN 19683) durchgeführt. Eine Siebung wurde für Korngrößen von > 63 µm angewendet, die Schlämmung diente zur Bestimmung des Schluff- und Tonanteils. Die nativen Sedimente wurden zunächst im Wärmeschrank bei 105 °C getrocknet und (in Abhängigkeit von der Partikelgröße) zwischen 25 g und 150 g des

trockenen Materials für die Siebung der Fraktionen Feinkies bis Feinsand eingewogen
Die Nasssiebung erfolgte mit Aqua demin. in standardisierten Sieben (DIN 4188) mit einer Maschenweite von 2 mm (Feinkies), 0,63 mm (Grobsand), 0,2 mm (Mittelsand) und 0,063 mm (Feinsand). Alle Rückstände wurden anschließend bei 105 °C getrocknet, in einem Exsikkator bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz inkubiert und mit einer Analysewaage (Sartorius, Göttingen) gewogen. Über den verbliebenen Anteil der Fraktion < 63 µm wurde der Schluff- und Tongehalt per Schlämmung durch das Pipettierverfahren nach Köhn bestimmt (DIN 19683).

2.2.11 Schwermetallaufschluss

Der Aufschluss der Schwermetalle erfolgte am Hygiene-Institut als HNO_3-Mikrowellendruckaufschluss nach Kern et al. (1996). Jeweils 200 g gefriergetrocknetes Sediment wurden in druck- und säurebeständige Teflon-Behälter mit Berstscheiben eingewogen, mit 65 % HNO_3 (suprapur, Merck, Darmstadt) versetzt und über Nacht unter dem Abzug inkubiert. Die Proben wurden für eine Stunde in einer Mikrowelle (Remote Microwave System, Floyd. Inc.) mit dem bei Kern et al. (1996) dargestellten Mikrowellenprogramm aufgeschlossen und wie in Abschnitt 2.4 beschriebenen auf ihre Schwermetallgehalte untersucht. Zur Qualitätssicherung des Aufschlusses und der späteren AAS-Analysen wurde das Standard Referenz Material 2704 (Buffalo River Sediment; National Institute of Standard & Technology, Gaithersburg, USA) verwendet.

2.3 Behandlung von Schwebstoffen

2.3.1 Probennahme

Schwebstoffproben aus dem Neckar bei Heidelberg wurden routinemäßig alle 14 Tage sowie bei den Hochwasserereignissen im Oktober/November 1998 und im Februar 1999 mehrmals täglich in Intervallen von 8, 4 bis zu alle 2 Stunden entnommen. In der Stauhaltung Lauffen konnten die Schwebstoffe durch die freundliche Mithilfe von Herrn Dipl. Hyd. Haag und einiger Hilfswissenschaftlicher Kräfte des Instituts für Wasserbau in Stuttgart während des Hochwassers im Oktober/November 1998 in sechs- bis zwölfstündigen Intervallen und während des Zeitraumes vom 13.5.1998 bis zum 1.7.1998 wöchentlich entnommen werden.
Die Sammlung der Schwebstoffe für die Bioassays, Schwefel- und Kohlenstoffbestimmung erfolgte aufgrund der großen benötigten Probenmengen mit Schwebstofffallen, die an Schwimmstegen der jeweiligen Stauhaltungen etwa 10 cm unter der Wasseroberfläche befestigt wurden. Die Schwebstoffe für die Schwermetallanalysen und Schwebstoffkonzentrationsbestimmungen wurden durch Filtration aus jeweils 1 L Wasserprobe gewonnen, um die Schwermetallfracht bilanzieren zu können. Für ein mittleres Hochwasser am Neckar 1995/96 konnte gezeigt werden, dass die Schwebstofffrachten einer Schwebstofffalle und die Schwebstoffkonzentrationen in den Wasserproben mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,93 übereinstimmten (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a), so dass von einer guten Vergleichbarkeit der Biotest- und Schwermetalldaten ausgegangen werden kann.
Abb. 2.6 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Schwebstofffallen: ein 25 x 35 cm großer Polyethylen-Kasten mit einem verschraubbaren Deckel, der an der strömungszu- und der strömungsabgewandten Seite mit je drei Löchern von 1 cm Durchmesser versehen wurde. Die Einström- und Ausströmöffnungen ermöglichen das Durchströmen der Schwebstofffalle mit Wasser. Innerhalb des Kastens wird die Fließgeschwindigkeit durch Trennwände verlangsamt, wodurch eine Sedimentation der Schwebfracht in herausnehmbare Einsätze aus PE bewirkt wird. Bei der Probenentnahme wurden die Schwebstoffe nach vorsichtigem Anlanden der Schwebstofffalle zunächst durch Rühren mit einem Edelstahllöffel in den Einsätzen homogenisiert und anschließend mit einem Trichter in Polyethylenflaschen abgefüllt. Die Schwebstoffproben wurden unter Kühlung ins Labor transportiert, und umgehend wurde mit der weiteren Aufarbeitung begonnen. Ein Teil der nativen Proben wurde in PE-Weithalsflaschen überführt und für die Durchführung des Bakterienkontakttests (innerhalb von einer Woche) im Kühlraum bei 4 °C und Dunkelheit gelagert.

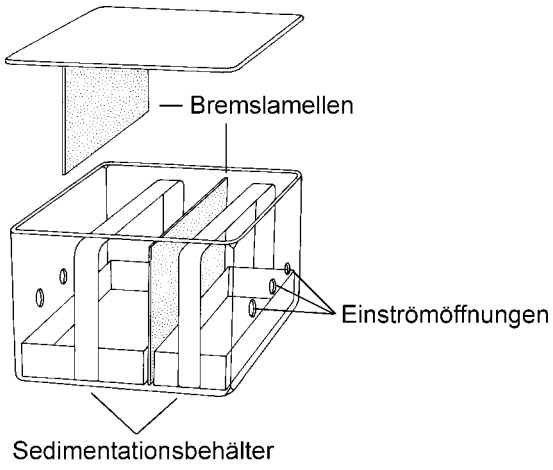


Abb. 2.6. Schematischer Aufbau der eingesetzten Schwebstofffallen.

2.3.2 Weiterverarbeitung im Labor

Ein Teil der routinemäßig entnommenen Schwebstoffproben wurde unmittelbar nach der Probennahme bei –30 °C schockgefroren, um über den Vergleich von gefrorenem und nativem Schwebstoff den Einfluss einer Sedimentlagerung bei –30 °C auf die Bakterientoxizität zu überprüfen. Der größte Teil der Schwebstoffe wurde analog zu den Sedimentproben (Abschnitt 2.2.3) gefriergetrocknet.

Die Weiterverarbeitung der Schwebstoffproben und die Durchführung der chemischen Analysen erfolgte analog zu den Sedimentproben und ist im Abschnitt 2.2 detailliert dargestellt.

Schwebstoffkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung des Schwebstoffgehaltes der Wasserproben der Hochwasserereignisse wurde jeweils 1 L Wasserprobe (Abschnitt 2.1) über eine Nutsche mit vorher gewogenen Zellulosefilter (0,4 µm Porengröße, 9 cm Ø, Filtrax, Niederschlag) filtriert. Die Filter wurden im Wärmeschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend analytisch genau gewogen.

Schwermetallaufschluss

Um in Kooperation mit dem Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart eine Bilanzierung der Schwermetallfracht des Hochwassers im Oktober/ November 1998 erarbeiten zu können, wurden für die atomabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen der Schwebstoffe nicht die Schwebstoffe aus den Schwebstofffallen, sondern die getrockneten Filter der Schwebstoffkonzentrationsbestimmung eingesetzt. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die Schwermetallkonzentrationen der Schwebstoffe auf die Wassermenge zu beziehen. Zur Qualitätssicherung des Aufschlusses und der späteren AAS-Analysen wurden das Standard Referenz Material 2704 (Buffalo River Sediment; National Institute of Standard & Technology, Gaithersburg, USA) und das Referenzsediment SL-1 (Trace Elements in Lake Sediments; Analytical Quality Control Service, IAEA Wien, Österreich) verwendet. Nachdem Vorversuche mit einem HNO_3-Mikrowellenaufschluss (Methode siehe Abschnitt 2.2.11) am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg ergaben, dass der Aufschluss bei Proben mit hoher Schwebstoffkonzentration nicht vollständig erfolgte, wurden die Proben freundlicherweise von Herrn Dipl. Hyd. Haag am Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart einem Nassaufschluss unterzogen (detailliertes Arbeitsprotokoll bei Haag et al. 1999b). Dazu wurden die getrockneten Filter mit den Schwebstoffen mit 65%iger Salpetersäure (suprapur, Merck) und 30%igem Wasserstoffperoxid (suprapur, Merck) versetzt und auf Ceran-Kochplatten aufgeschlossen, bis in der Suspension nur noch ein weißer Niederschlag zu erkennen war, der auf nicht aufgeschlossene Silikate zurückzuführen ist. Die Aufschlussdauer betrug zwischen 12 und 18 Tagen. Die so erhaltenen Proben wurden über aschefreie Blaubandfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und mit den in Abschnitt 2.4 beschriebenen Methoden mittels AAS-Analyse untersucht.

2.4 Bestimmung der Schwermetallgehalte

Die Konzentrationen der Schwermetallgehalte Arsen, Blei, Cadmium, Chrom, Kupfer, Lithium, Mangan, Nickel und Zink von Wasser-, Porenwasser-, Schwebstoff- und Sedimentproben wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Die Aufarbeitung der Proben ist in den Abschnitten 2.1.2, 2.2.2 und 2.3.2 dargestellt. Die mit HNO_3 angesäuerten Umweltproben wurden in einem Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer (SpectrAA 400, Varian, Palo Alto, CA, USA) mit Zeeman-Untergrundkompensation auf die Metalle Arsen, Blei, Cadmium, Kupfer, Lithium und Nickel sowie mit Flammen-AAS (SpectrAA 10, Varian) auf Chrom, Mangan und Zink, untersucht. Für die Messung von Arsen wurde 0,1 g/L Nickelnitratlösung (Merck, Darmstadt) zur chemischen Stabilisierung als Modifier benutzt. Die Messungen wurden in einem Raum mit Reinluftzufuhr durchgeführt. Vor jedem Messzyklus wurde eine Eichkurve erstellt. Die Standardlösungen wurden aus kommerziellen Stammlösungen (Merck, Darmstadt) durch Verdünnen mit 1%iger Salpetersäure hergestellt und jeden Tag frisch angesetzt. Eine Messung galt nur dann als valide, wenn der Standardfehler aus 2 Einzelmessungen ≤ 20% betrug.

2.5 Makrozoobenthos

Die Bestimmung des Makrozoobenthos bei einer Sedimentbewertungstriade an zwölf verschiedenen Fließgewässerstandorten wurden im Rahmen von zwei Diplomarbeiten durchgeführt. Detaillierte Beschreibungen der eingesetzten Methoden sind bei Karaus (1999) und Siebert (1999) dargestellt. Die Berechnung zahlreicher Indices zur Bewertung der Zönosen wurde, soweit nicht anders gekennzeichnet, mit dem Programm „Biologisch-ökologische Fließgewässeruntersuchung“ der LfU Baden-Württemberg durchgeführt, das Herr Prof. Dr. Braukmann (Universität Gesamthochschule Kassel, ehemals LfU, Baden-Württemberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

2.5.1 Methoden der Probennahme

Ein zentrales Problem der Fließwasser-Ökologie stellt die quantitative Erfassung des Zoobenthos dar. Vor allem wegen der wechselnden Beschaffenheit der Stromsohle, den unterschiedlichen Strömungsverhältnissen in Fließgewässern und der mit diesen Faktoren verbundenen mosaikartigen Verteilung der Benthosorganismen ist eine Vielzahl von Probennahmemethoden entwickelt worden (Braukmann 1987, Horne & Goldmann 1994, La Point & Fairchild 1992). Abhängig von der Beschaffenheit der Fließgewässersohle hinsichtlich Sedimentstruktur, Strömungsgeschwindigkeit und Gewässerbreite wurden in dieser Studie zwei verschiedene Beprobungsmethoden eingesetzt:

Sedimentkerner

Zur Erfassung des Makrozoobenthos in tonig und schluffigen Sedimenten (Triadestandorte Mühlbach 2, Eberbach 1, 2 und Elsenz 1, 2) wurde jeweils 1 L Sediment mit einem Sedimentkerner (Ø 5 cm) wie in Abschnitt 2.2.1 dargestellt entnommen. Um die gröberen Anteile des Sediments von den feineren zu trennen, wurde das Sediment durch Edelstahlsiebe (ISO 3310-1, Retsch, Hann) der Maschenweiten 1,25 und 2 mm gesiebt und mehrmals mit Wasser nachgespült. Das Sediment wurde in eine Schale überführt, die Tiere nach taxonomischen Gruppen sortiert und in mit Ethanol (70%) gefüllten Schnappdeckelgläschen fixiert.

Surber sampler

Die Probennahme des Makrozoobenthos an Standorten mit einer Dominanz der Korngrößen Mittelsand bis Kies (Forellenbach 1, 3, 4, Mühlbach 1 und Hilsbach) wurde mit einem Surber-Sampler (square foot stream bottom sampler) durchgeführt (Horne & Goldmann 1994). Es handelt sich hierbei um ein Fanggerät, das aus einem horizontalen und einem vertikalen Metallrahmen mit dem Maß 30 x 30 cm (square foot) besteht. An dem vertikalen Metallrahmen befindet sich ein Netz mit 500 µm Maschenweite (Hydro-Bios, Kiel). Der horizontale Rahmen, der am unteren Bereich des vertikalen Rahmens befestigt ist, dient der Vorgabe des Sammelareals. Durch Aufwirbeln des Untergrundes werden die Organismen mit der Strömung in das Netz getragen (Klee 1993). Dabei wurden die oberen 10 cm des Untergrundes wie folgt durchsucht: große und kleinere Steine wurden umgedreht und mit einer Bürste abgebürstet. Im Anschluss wurde der Untergrund wiederholt mit der Hand durchwühlt. Um alle Organismen zu erfassen, wurde das Netz sorgfältig nach Tieren durchsucht, die dann nach taxonomischen Gruppen sortiert in Ethanol (70 %) überführt wurden. Am Standort Forellenbach 2 konnte der Surber-Sampler aufgrund der geringen Fließgewässerbreite nicht eingesetzt werden. Hier wurde ein entsprechendes Areals mit vorgehaltenem Kescher durchsucht und zudem 10 faustgroßen Steine (Ø 15 cm) für die Sammlung der Organismen mit vorgehaltenem Kescher entnommen.

2.5.2 Präparation von Chironomiden-Larven

Die Bestimmung von Chironomiden-Larven erforderte eine spezielle Präparation, die bei einem Chironomiden-Workshop der Landeslehrstätte für Naturschutz und Landschaftspflege „Oderberge Lebus“, unter wissenschaftlicher Leitung von Dr. Otto, Fahrenkrug, erlernt werden konnte. Nachdem die Tiere im Freiland in 70 % Ethanol fixiert wurden, wurden sie einer Vorbestimmung unterzogen: Die Tiere bekamen eine Präparatnummer, wurden separat in Schnappdeckelgläschen mit 70% Ethanol überführt und auf folgende Merkmale hin untersucht:

- Kopf (Form, besondere Zeichnung, Größe)
- Farbe
- Kopf dorsal (Frontalapatome konvex, konkav oder gerade)
- Zahl der Augenpaare
- Zahl der Tubuli am achten Segment
- Länge der Antennen
- Vorhandensein von lateralen Tubuli am siebten Segment
- Länge des Procercus
- sonstige auffällige Besonderheiten
- Anzahl der Analpapillen

Nach dieser Vorbestimmung wurden die einzelnen Tiere 5 min in Kaliumhydroxid (10 %) gekocht, zweimal 5 min in Wasser gewaschen und im Anschluss je 5 min in 70 % und 96 % Ethanol fixiert.
Nach Abtrennen vom Körper wurde der Kopf mit der ventralen Seite nach oben auf einen Objektträger überführt, und nach Zugabe von zwei Tropfen Euparal (Chroma, Köngen) mit einem Deckglas bedeckt. Nach einer mindestens 2 Tage dauernden Trocknung konnten die Tiere bestimmt werden.

2.5.3 Taxonomische Bestimmung

Die taxonomischen Bestimmungen erfolgten mit Hilfe von Mikroskop und Binokular (Leitz, Wetzlar) mit der in Tab.2.3 aufgeführten Bestimmungsliteratur. Bei allen nachgewiesenen Arten wurde durch Vergleich mit der „Limnofauna Europaea“ (Illies 1978) geprüft, ob sie im Gebiet bereits historisch

nachgewiesen wurden. Der überwiegende Teil der Trichopteren wurde von Prof. Dr. W. Tobias (Senckenberg-Museum Frankfurt – Sektion Limnische Ökologie und Entomologie IV) und Teile der Chironomiden von Herrn Dr. Otto (Fahrenkrug) nachbestimmt.

Tab. 2.3. Verwendete Bestimmungsliteratur.

Systematische Gruppe	Literatur
Mollusca	Glöer & Meier-Brook (1994)
Hirudinea	Schmedtje & Kohmann (1988)
Crustacea	Gledhill et al. (1976), Schmedtje & Kohmann (1988)
Ephemeroptera	Studemann et al. (1992)
Plecoptera	Aubert (1959), Schmedtje & Kohmann (1988)
Coleoptera	Klausnitzer (1996), Schmedtje & Kohmann (1988)
Trichoptera	Pitsch (1993), Sedlak (1985), Waringer & Graf (1997)
Diptera	Hofmann (1971), Moller-Pillot (1984), Schmedtje & Kohmann (1988), Schmid (1993), Wiederholm (1983)

Saprobienindex

Der Saprobienindex diente in dieser Studie zur Ermittlung der Belastung von Fließgewässerbiozönosen durch biologisch abbaubare, organische Substanz und wurde nach DIN 38 410 – M 2 (DEV 1991) und zusätzlich nach der erweiterten Taxaliste (LfU-Baden-Württemberg 1992) bestimmt. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde das Streuungsmaß berechnet, das die Streuung der Saprobiewerte anzeigt, die für die Berechnung des Saprobienindex herangezogen wurden. Nur bei einem Streuungsmaß ≤ 0,2 und einer Summe der Abundanzziffern ≥ 15, kann die Belastung mit biologisch abbaubarer Substanz mittels des Saprobienindex eindeutig bestimmt werden. Der Saprobienindex wurde wie folgt berechnet und nach Tab. 2.4 klassifiziert:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{n} s_i \cdot A_i \cdot G_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i \cdot G_i}$$

S = Saprobienindex, i = laufende Nummer des Taxon, si = Saprobiewert des i-ten Taxon, Ai = Abundanzziffer des i-ten Taxon, Gi = Indikationsgewicht des i-ten Taxon, n= Anzahl der Taxa

Kopplungsanalyse nach Buck

Die Kopplungsanalyse wurde zur Vereinfachung der saprobiellen Bewertung von Fließgewässern entwickelt: Das begrenzte Einbeziehen verbreiteter und mit hoher Siedlungsdichte auftretender Taxa bringt einen relativ geringen Bestimmungsaufwand mit sich.

Das gekoppelte Auftreten der aspektbildenden Taxa gilt als Indikator für Gewässergüte bzw. organische Belastung. Anders als beim Saprobienindex, bei dem eine Berechnung des Mittelwertes der erfassten Saprobien durchgeführt wird, wird bei der Kopplungsanalyse nach einem aus der Mengenlehre abgeleiteten mathematischen Ansatz eine Schnittmenge ermittelt.

Nach diesem Prinzip ergeben sich aus 2 bis 5 Taxakombinationen 3000 Kopplungen mit einer bestimmten saprobiellen Valenz. Die Kopplung mit der höchsten Reproduzierbarkeit (geringste Streuungsbreite) bestimmt den Indexwert. Teil der Auswertung ist die Ermittlung der Sauerstoffversorgung auf biologischer Basis und eine Aussage über das mögliche Vorliegen einer Toxizität.

Die Abundanzstufen wurden gemäß Tab. 2.5 festgelegt. Als Kopplungsglieder wurden ausschließlich Taxa berücksichtigt, die mit Abundanzstufe 5 oder 7 gefunden wurden. Aus den gefundenen Kopplungsgliedern wurden alle theoretisch möglichen (zwei- bis fünfgliedrigen) Kopplungen gebildet und die von Alf & Buck (1992) und Buck (1986) aufgestellten Listen nach verwertbaren Kopplungen durchsucht. In der

Tab. 2.4. Kriterien zur Beurteilung des saprobiellen Gewässerzustandes von Fließgewässern (Biologische Gewässergüteklassifizierung) nach der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA 1998).

Saprobiebereich	Saprobiewert und Saprobienindex	Belastung mit leicht abbaubaren organischen Substanzen	Güteklasse
oligosaprob	1,0 bis < 1,5	nicht bis sehr gering belastet	I
oligosaprob bis β-mesosaprob	1,5 bis < 1,8	gering belastet	I-II
β-mesosaprob	1,8 bis < 2,3	mäßig belastet	II
β-mesosaprob bis α-mesosaprob	2,3 bis < 2,7	kritisch belastet	II-III
α-mesosaprob	2,7 bis < 3,2	stark verschmutzt	III
α-mesosaprob bis polysaprob	3,2 bis < 3,5	sehr stark verschmutzt	III-IV
polysaprob	3,5 bis 4,0	übermäßig verunreinigt	IV

Liste der Kopplungsgruppen wurde die zu jeder Kopplungsgruppe passende Güteklasse, Saprobienindex, Standardabweichung, die Anzahl der gefundenen Fälle (Kopplungen) und die Reproduzierbarkeit (als feste Kenngröße für den Grad der Verlässlichkeit) angegeben. Gab es Kopplungsgruppen mit gleicher Reproduzierbarkeit, wurde die Kopplung mit dem höchsten einzustufenden Indexwert (Saprobienindex) gewählt. Im Anschluss wurden nach dem ermittelten Indexwert die LAWA-Gewässergüteklassen abgeleitet (Tab. 2.6, Buck 1986). Die LfU (1992) führt an, dass die Kopplungsanalyse nur in kalkhaltigen (elektrolytreichen) Gebieten aussagekräftig und somit nicht auf alle Fließgewässertypen Mitteleuropas anwendbar ist. Im Rahmen dieser Studie konnte sie daher nur an den Standorten Elsenz 1 und 2, Hilsbach und Eberbach 1 und 2 durchgeführt werden.

Tab. 2.5. Kopplungsanalyse nach Buck. Schätzskala für die Abundanz des Makrozoobenthos.

Abundanzstufe	Individuenanzahl
1	1
2	2-19
3	20-39
5	40-79
7	> 80

Tab. 2.6. Kopplungsanalyse nach Buck. Ermittlung der Güteklasse nach dem Indexwert.

Indexwert	LAWA- Gewässergüteklassen
1,00-1,49	I
1,50-1,79	I-II
1,80-2,29	II
2,30-2,69	II-III
2,70-3,19	III
3,20-3,49	III-IV
3,50-4,00	IV

Tab. 2.7. Klassifikation der Sauerstoffversorgungsstufen, nach LfU (1992).

O_2-Stufe	Mindest-O_2-Konzentration [mg/L]
I (sehr gut)	≥ 8*
II (gut)	6 *
III (kritisch)	4 *
IV (schlecht)	2
V (sehr schlecht)	≤ 2 **

* höchstens kurzfristig unterschritten,
** auch Anaerobie über längere Zeit möglich

Sauerstoffmindestversorgung

Mit Hilfe des Vorkommens und der Abundanz bestimmter Wirbellosenarten bzw. –taxa kann der höchstens kurzfristig unterschrittene Minimumgehalt an gelöstem Sauerstoff bestimmt werden. Für diesen Index werden gegenüber Sauerstoffmangel mehr oder weniger empfindliche Zeigerorganismen eingesetzt, deren Generationsdauer von mindestens einem Jahr zur Indikation der langfristigen Sauerstoffminima eines Gewässers ausreicht (Böhmer et al. 1998, 1999, 2000, Buck 1986). Die Mindestsauerstoffversorgungsstufen wurden nach LfU (1992) klassifiziert (Tab. 2.7).

Karlsruher Methode

Die Karlsruher Methode nach Schmitz stellt kein ermittelndes statistisches Verfahren dar, sondern eine empirisch gewonnene Beschreibung des Gewässergütezustandes in fünf Stufen der Belastung mit organischen Stoffen und deren Abbauprodukten, sowie fünf Stufen der Sauerstoffversorgung (LfU 1992). Sie beruht auf einer Korrelation biologisch-limnologischer und chemischer Parameter, die an allen offiziellen Gewässergüte-Untersuchungsstellen Baden-Württembergs erhoben wurden (Böhmer et al. 2000). Die Klassifikation erfolgte nach LfU (1992) nach folgenden Kriterien (Karaus 1999):

Belastungsstufe I: Wasser klar, nur geringe Mengen suspendierter organischer Substanz. Keine Bildung von Eisen-II-Sulfid unter Steinen oder im Sediment, auch feinkörnige Substrate in allen Schichten stets braun oder hell gefärbt (oxidierter Zustand). Mikroflora artenreich, einzelne Arten stellenweise in größerer Individuendichte. Sessile Ciliaten und fadenförmige Abwasserbakterien nicht in mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien. Moose bisweilen häufig. Diatomeen (Kieselalgen), wie zum Beispiel *Diatoma hiemale* als auch inkrustierende Blaualgen, wie zum Beispiel *Chamaesiphhon*, können an Arten und Individuen zahlreich sein. Meist artenreiche Insektenfauna. Netzbauende Trichoptera (Köcherfliegenlarven) und Simuliidae (Kriebelmückenlarven) nie häufig. Planarien (Strudelwürmer) meist anwesend, Schnecken in gering dichter Besiedlung, Egel selten. Völlig unbelastete Gewässer zeichnen sich durch geringe Individuenzahlen und weniger Artenvielfalt aus als gering belastete.

Belastungsstufe II: meist klares Wasser, höchstens mäßige Drift suspendierter organischer Partikel. Bisweilen an Stellen geringer Wasserbewegung Bildung von Eisen-II-Sulfid unter Steinen. Feinkörnige Substrate in der Tiefe nur stellenweise schwärzlich (chemisch reduziert). Arten- und individuenreicher als die vorhergehende Stufe, besonders an solchen Organismen, die von der organischen Verunreinigung pro-

fitieren. Bisweilen schon mit bloßem Auge sichtbare Kolonien von sessilen Ciliaten und fadenförmigen Abwasserbakterien (*Sphaerotilus*) vorhanden. Submerse höhere Pflanzen, wie *Ranunculus* (Wasserhahnenfuß), *Potamogeton* (Laichkraut), *Berula* (Berle), *Callitriche* (Wasserstern) und *Glyceria* (Schwaden) bilden oft dichte Bestände. Fädige Grünalgen, wie *Cladophora* und *Vaucheria* vorhanden, jedoch nicht so zahlreich wie in der darauffolgenden Stufe. Viele Insektenlarven, netzbauende Trichopteren und Simuliidae, wenn vorhanden, dann nur an strömungsgünstigen Standorten zahlreich. Planarien, Gastropoden (Schnecken) und Egel häufiger als in Stufe I.

Belastungsstufe III: starke Drift suspendierter organischer Partikel, Wasser vielfach deutlich getrübt. Häufig starke Eisen-II-Sulfid-Bildung unter fast allen Steinen im lenitischen Bereich. Feinkörnige Substrate in der Tiefe weitgehend schwärzlich (chemisch reduziert). Sehr oft Massenentwicklung einer begrenzten Anzahl von Arten. Auf den meisten Substraten mit bloßem Auge sichtbare Kolonien von sessilen Ciliaten und *Sphaerotilus*, letztere nicht in Massenentwicklung. Submerse höhere Pflanzen oft noch flächendeckend. Häufig Massenentwicklung von Fadenalgen: *Vaucheria* und *Cladophora*, letztere bei guter Belichtung bisweilen das ganze Bachbett auskleidend. Als heterotroph angesehene Diatomeen, wie zum Beispiel *Nitzschia*-Arten, das Optimum ihrer Entwicklung erreichend. Substratweider wie die Chironomidae (Zuckmücken, vor allem gangbauende Formen: *Cricotopus-Orthocladius*-Gruppe), sowie die Schnecken *Ancylus* und Lymnaeidae als auch Egel (etwa *Herpobdella*) in Massen. Netzbauende Trichoptera (etwa *Hydropsyche*) und vor allem Simuliidae (*Odagmia ornata*) oft massenhaft.

Belastungsstufe IV: Wasser stark getrübt, sehr hohe Drift suspendierter organischer Partikel. Schlammablagerungen an lenitischen Stellen. Fast alle Steinunterseiten mit ausgedehnten Eisen-II-Sulfid-Flecken. Feinkörnige Substrate meist schlickig, in der Tiefe fast durchweg schwarz und faulschlammartig mit bisweilen wahrnehmbarem Schwefelwasserstoffgeruch. Starker Rückgang der Makroorganismenarten. Massenentwicklung von sessilen Ciliaten (*Carchesium*) und *Sphaerotilus*. Submerse Gefäßpflanzen (in Betracht kommen: *Potamogeton* und *Fontinalis*) nur noch vereinzelt. Blaualgenmatten an ruhigen Stellen manchmal größere Areale einnehmend. Die von der vorigen Stufe dominierenden Grünalgen (*Cladophora*, *Vaucheria*) meist durch *Stigeoclonium* ersetzt. Oft Massenentwicklung von Tubificidae (Schlammröhrenwürmer) und Chironomidae, zum Beispiel *Prodiamesa olivacea* und *Chironomus thummi-Gruppe*. Verschwinden von Filtrierern (zum Beispiel *Hydropsyche*) und von Bewohnern des Substratlückensystems (zum Beispiel *Gammaridae*) wegen Verstopfung durch Schwebstoffe.

Belastungsstufe V: sehr starke Trübung des Wassers. Im Stromstrich haben fast alle Steinunterseiten mehr oder weniger große schwarze Eisen-II-Sulfid-Flecken, im lenitischen Bereich sind sie unterseits vollständig schwarz. An ruhigeren Stellen starke Ablagerungen von Faulschlamm, vielfach mit H_2S-Geruch; feinkörnige Substrate gänzlich oder höchstens bis auf eine ganz dünne oxidierte Oberflächenschicht chemisch reduziert. Nur sehr wenige makroskopische Arten; Massenentwicklung von suspendierten heterotrophen Bakterien; *Sphaerotilus* weniger häufig, bisweilen absterbend. Massenentwicklung von bakterienfressenden freischwimmenden Ciliaten sowie von farblosen Flagellaten. Makroorganismen bis auf *Chironomus thummi-Gruppe* und *Eristalis* (Rattenschwanzlarve) fehlend oder höchstens eingedriftet.

Neben den allgemeinen Daten der Besiedlung und Beschaffenheit eines Fließgewässers gehen bei der Karlsruher Methode verschiedene limnochemische Kennwerte ein. Langjährige Untersuchungen der LfU Baden-Württemberg haben gezeigt, dass jeder Belas-

Tab. 2.8. Belastungsstufen nach der Karlsruher Methode, nach LfU (1992).

Belastungsstufe	Belastungscharakterisierung
I	gering (einschließlich unbelastet)
II	mäßig
III	kritisch
IV	stark
V	sehr stark

Tab. 2.9. Karlsruher Methode. Chemische Kriterien zu den Belastungsstufen, nach LfU (1975).

Stufe	Konz.	BSB_5 [mg O_2/L]	NH_4^+ [mg N/L]	NO_2^- [mg N/L]
I	$M=C_{50}$	1,4	0,07	0,003
	C_{25}- C_{75}	1,2- 2,7	0,03- 0,11	0,0001-0,008
	C_5- C_{95}	0,8- 3,0	<0,01- 0,37	<0,001- 0,031
II	$M=C_{50}$	2,6	0,16	0,20
	C_{25}- C_{75}	1,9- 3,0	0,10- 0,24	0,012- 0,050
	C_5- C_{95}	1,2- 5,5	0,03- 0,69	0,006- 0,14
III	$M=C_{50}$	3,2	0,31	0,030
	C_{25}- C_{75}	2,8- 4,0	0,25- 0,48	0,021- 0,065
	C_5- C_{95}	2,0- 8,5	0,09- 2,4	0,016- 0,29
IV	$M=C_{50}$	4,6	0,83	0,072
	C_{25}- C_{75}	4,0- 5,3	0,61- 1,3	0,055- 0,13
	C_5- C_{95}	2,5- 9,5	0,18- 5,2	0,028- 0,50
V	$M=C_{50}$	10,0	4,3	0,15
	C_{25}- C_{75}	8,2- 14	2,5- 5,7	0,095- 0,21
	C_5- C_{95}	5,3- 26	1,0- 17	0,025- 0,34

M= Median, C_{25}-C_{75} und C_5-C_{95}= Unterschreitungshäufigkeiten zur Charakterisierung der Streuung um den Median, BSB_5 = Biochemischer Sauerstoffbedarf, NH_4^+ = Ammonium und NO_2^- = Nitrit

tungsstufe – innerhalb einer bestimmter Schwankungsbreite – ein charakteristischer Median der Konzentration von BSB_5, Ammonium und Nitrit zugeordnet werden kann (Tab. 2.9).

Rhithron- Ernährungstypen- Index (RETI)

Der RETI wurde von Schweder (1992) aus dem River Continiuum Concept abgeleitet und kann zur Klassifikation von Fließgewässern mit weniger als 5 m Breite eingesetzt werden: Die typische Abfolge von Ernährungstypen in einem Fließgewässer verändert sich bezüglich einer Dominanz von Weidegängern und Zerkleinerern (im Oberlauf = Rhithral) zu Filtrierern und Sedimentfressern (im Unterlauf = Potamal). Schweder (1992) konnte zeigen, dass anthropogene Gewässerbelastungen zu einer Potamalisierung – der frühzeitigen Erhöhung des Anteils von Filtrierern und Sedimentfressern bereits im Oberlauf – führen können. Zur Ermittlung des RETI wurden alle gefundenen Makroinvertebraten einem Ernährungstypus zugeordnet und nach folgender Formel berechnet:

$$RETI = \frac{\sum W + \sum Z}{\sum W + \sum Z + \sum F + \sum S}$$

W = Weidegänger, F = Filtrierer, Z = Zerkleinerer und S = Sedimentfresser; Räuber werden nicht berücksichtigt.

Die Berechnung der Indizes erfolgte auf der Basis von Individuenzahlen. Der RETI kann Werte zwischen 0,01 und 0,99 annehmen. Bei RETI- Werten ≥ 0,5 – einer von Weidegängern und Zerkleinerern dominierten Zoozönose – kann von einer Ernährungsstruktur ausgegangen werden, die für naturnahe Fließgewässer typisch ist (Schweder 1992).

Diversität und Evenness

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturanalyse benthischer Biozönosen bietet die Ermittlung der Artendiversität. Diversitätsindices wurden häufig auch als Maßstab für Veränderungen der Lebensgemeinschaften eines Fließgewässers durch anthropogene Einwirkungen wie Abwassereinleitungen oder Verbauung benutzt (Literaturüberblick bei Böhmer et al. 1997 und Braukmann 1987). Die Diversitätsindices kombinieren die Anzahl an Taxa mit der Abundanz der einzelnen Taxa. Der Einsatz dieser Indices in der Bewertung von Fließgewässern beruht auf der Annahme, dass die Taxavielfalt einen Wert an sich darstellt und mit zunehmender Belastung eines Ökosystems zurückgeht (Böhmer et al. 1997). Die Diversität wurde in dieser Studie nach dem Shannon-Weaver-Index berechnet, der zur Messung der Artendiversität die Abundanzen und somit dominante Arten stärker berücksichtigt (Böhmer et al. 1998, 2000):

$$H_s = \sum p_i \cdot \log_2 \cdot p_i$$

H_S= Diversität bezüglich der Artenzahlen, p_i= relative Häufigkeit und S= Artengesamtzahl

Tab. 2.10 zeigt eine Klassifikation des Belastungszustands von Fließgewässern, die aufgrund der Beziehung zwischen dem Diversitätsindex nach Shannon-Weaver und dem Belastungsgrad abgeleitet wurde (Wilhm 1970). Der Einsatzbereich des Diversitätsindex liegt im Orts- und Zeitvergleich (vor und nach einer Störung), da die Absolutwerte der Diversität in Abhängigkeit vom Fließgewässertyp und untersuchten Habitat stark schwanken können. Nach Braukmann (1987) tritt bei dem Diversitätsindex oft eine sehr hohe Streuung auf, die zu einer Fehlinterpretation der Belastung führen kann. Der Index kann aber in jedem Fall als eine Ergänzung zu anderen Auswertungsmethoden fungieren. Problematisch ist weiterhin, dass der Wert der Diversität durch zwei völlig unterschiedliche Faktoren zustande kommen kann: eine hohe Artenzahl mit unterschiedlicher Individuenzahl oder eine gleichmäßige Verteilung der Individuen auf wenige Arten. Daher sollte bei einem Ökosystemvergleich die Evenness als Vergleichsmaß berücksichtigt werden. In der Evenness kommt die Gleichmäßigkeit der Organismenverteilung zum Ausdruck (Braukmann 1987). Sie wurde mit folgender Formel berechnet:

Tab. 2.10. Beziehung zwischen Diversitätsindex nach Shannon-Weaver und Belastungszustand von Fließgewässern (nach Wilhm 1970).

H_s	Gewässerzustand
> 3	reines Wasser
2-3	schwach verunreinigt
1-2	mäßig verunreinigt
< 1	stark verunreinigt

$$E = \frac{H_S}{H_{\max}} = \frac{H_S}{\log_2 s}$$

E = Evenness, H_S = Diversitätsindex, H_{max} = maximal möglicher Diversitätsindex und s = Artenzahl

Die Evenness kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Unter natürlichen Voraussetzungen liegt sie zwischen 0,6 und 0,8. Niedrige Werte (< 0,5) deuten auf ein gefährdetes Ökosystem hin.

Tab. 2.11. Klassifikation kalkarmer, versauerungsgefährdeter Fließgewässer mit Bioindikatoren in Säurezustandstypen, nach Braukmann und Vobis (1998).

Säurestufe	Säurezustandstyp	pH-Wert	Bioindikatoren
1	permanent nicht sauer	gewöhnlich über 6,5; nicht unter 6,0	sehr säureempfindlich, nur in permanent nicht sauren Gewässern
2	episodisch schwach sauer, überwiegend neutral	ähnlich zu Stufe 1, nur seltene pH-Erniedrigung; nicht unter 5,5	mäßig säureempfindlich, auch in leicht sauren Gewässern
3	periodisch (kritisch) sauer	normalerweise unter 6,5; bei Säureschüben auch unter 5,5	mäßig säuretolerant, vertragen starke Säureschübe
4	permanent sauer	ganzjährig unter 5,5; bei Säureschüben unter 4,3	sehr säureresistent, auch in permanent sauren Gewässern noch lebensfähig.

Säurestufen

Die Gewässerversauerung stellt eine mögliche Belastung kalkarmer Gewässer dar, die durch Schwefel- und Stickoxidemissionen in die Atmosphäre verursacht wird. Mit maximal 5-10 % potenziell versauerungsgefährdeter Fläche stellt dies in der Bundesrepublik Deutschland kaum ein quantitatives Problem dar, jedoch sind versauerte Gewässer gravierend gestört (Böhmer et al. 1997, 1998). Insbesondere Teile Odenwaldes sind aufgrund des kalkarmen Untergrundes stark versauerungsgefährdet (Braukmann & Vobis 1998) Die Klassifikation der Säurestufen erfolgte nach Braukmann und Vobis (1998) mit verschiedenen Indikatororganismen gemäß des Prinzips des empfindlichsten Taxons (Tab. 2.11).

Ökotoxikologischer Index

Der ökotoxikologische Index berechnet die Abweichung einer belasteten Fließgewässerprobestelle von einer Referenzstelle, indem der Artenfehlbetrag und der Prozentanteil der nicht gemeinsamen Arten addiert wird (Böhmer et al. 1999, 2000). Böhmer et al. (1999) weisen darauf hin, dass eine Vielzahl von Störungen den Artenfehlbetrag und den Prozentanteil der nicht gemeinsamen Arten beeinflussen können, so dass dieses Verfahren nicht nur eine spezifische toxische Wirkung sondern auch andere unspezifische Störungen anzeigt. Der ökotoxikologische Index kann jedoch als ein Hinweis für toxische Wirkung eingesetzt werden.

Der Ökotoxikologische Index EI wurde von Camargo (1990) entwickelt und erstmals für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung des Duratón durch eine Kläranlageneinleitung eingesetzt. Er berechnet sich aus:

$$EI = \frac{2A - B - C}{A} \times 50$$

A = Artenzahl des Referenzstandorts, B = Artenzahl der belasteten Stelle und C = Anzahl der gemeinsamen Arten

Bei einem Vergleich von 162 belasteten Gewässern und entsprechenden Referenzen ergab der Ökotoxikologische Index in fast allen Fällen eine leichte Zunahme, bei etwa zwei Dritteln der Fälle eine deutliche Reaktion mit über 20 % Abweichung von der Referenz (Böhmer et al. 1999). Aufgrund dieser hohen Empfindlichkeit empfehlen Böhmer et al. (1999) den Ökotoxikologischen Index in der Fließgewässerbewertung als geeignetes Maß für taxonomische Veränderungen.

2.6 Biotests

2.6.1 Cytotoxizitätstest

Geräte

- Sterile Werkbänke Flow Gelaire und NuAire NU-969 (ICN und NuAire Inc. Plymoth, USA)
- pH-Meter CG 838 (Schott, Mainz)
- automatischer Gasbrenner (Schütt)
- Phako-Inversmikroskop CK-2 mit SC-35 (Olympus, Hamburg)
- Mikrotiterplatten-Spektralphotometer Spectra™ III (TECAN, Crailsheim)
- LBK Ultraspec III Spektralphotometer mit Deuterium-Lampe (Pharmacia, Freiburg)
- Ultraschall-Desintegrator Sonoplus D 70 (Bandelin, Berlin)
- pH-Meter 761 Calimatic (Knick)
- Kühlbrutschränke (Heraeus, Hanau und Memmert, Schwabach)
- Kleinbild-Schwarz-Weiß-Film APX 25, ISO 25 / 15° (Agfa, Köln)
- Kleinbild-Positivfilm-Film Ektachrome T320 (Kodak)
- Kühlzentrifuge Biofuge 17RS (Heraeus, Hanau)

Chemikalien und Lösungen

Zellkulturmedien und Spüllösungen

Minimal Essential Medium (MEM), Eagle-Modifikation mit Earle´s Salzen, 20 mM Hepes und 2 mM L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen)

DPBS (Dulbecco´s Phosphate bufferd saline) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Biochrom, Berlin; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4 auf 1 L Aqua bidest.)

Medienzusätze

Gentamycinsulfat (Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin (10000 E/10000 µg/ml) in 0,9 % NaCl (Sigma, Deisenhofen)

Neomycinsulfat (Sigma, Deisenhofen)

Fötales Kälberserum (FKS), Charge 44H3385 (Sigma, Deisenhofen)

Dissoziationslösungen

0,05 % Schweine-Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung in Hank´s Balance Salt Solution (HBSS; Sigma, Deisenhofen)

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze) und Baker (Groß Gerau) bezogen.

Proteinpräparationen

Rattenleber-S9-Fraktionen: Leber-S9-Fraktion aus Aroclor 1254-induzierten Ratten bzw. Leber-S9-Fraktion aus Phenobarbital / ß-Naphthoflavon-induzierten Ratten (RRC-CCR, Roßdorf)

Lösungen

S9-Puffer: 6,9 mg NaH_2PO_4, 224 mg KCl, 294 mg $CaCl_2$, 203 mg $MgCl_2$ auf 100 ml Aqua bidest. (pH 7,4); für 3 Wochen bei 4 °C haltbar; 1,52 mg Glucose-6-Phosphat und 3,13 mg NADP pro ml S9-Mix im Testansatz; vor Gebrauch mit Sterilfilter (0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) filtrieren

Neutralrot-Färbelösung: 1 ml 0,4 % Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin, Sigma, Deisenhofen) in Aqua bidest. und 79 ml MEM ohne FKS mit Antibiotika; 24 h bei 37 °C inkubieren, vor Gebrauch mit Sterilfilter (0,4 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtrieren

Neutralrot-Waschlösung: PBS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Neutralrot-Extraktionslösung: 5 ml Eisessig, 250 ml Ethanol (99,9 %, p.a.) auf 500 ml Aqua bidest.

MTT-Färbelösung: 1 ml 5 mg MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid; Sigma Deisenhofen) in 1ml Aqua bidest. plus 9 ml MEM, ohne FKS, mit Antibiotika

MTT-Extraktionslösung: 10 % Triton-X-100, 0,1 N HCl in Isopropanol lösen

Laktatdehydrogenase-Reaktionsmedium: 2,5 ml NADH-Lösung (1,65 mg/ml) in 60 mM Tris-HCl, pH 7,4 plus 22,5 ml 60 mM Tris-HCl, pH 7,4

Laktatdehydrogenase-Substrat-Lösung: 2,5 ml 10 mM Na-Pyruvat (1,11 mg/ml) in 60 mM Tris-HCl, pH 7,4

Herkunft der RTG-2-Zellen

Diese fibrolastenähnliche Zelllinie wurde ursprünglich aus der Gonade der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gewonnen (Wolf & Quimby 1962). RTG-2-Zellen der 55. Passage wurden von Herrn Prof. Dr. Miltenburger (RRC-CCR, Roßdorf) zur Verfügung gestellt.

Kulturbedingungen

Die Kulturbedingungen für die RTG-2-Zellen orientieren sich an den Vorschriften, wie sie im derzeit gültigen Vorschlag für die DIN-Normierung des *In vitro*-Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen formuliert sind (vgl. auch Schulz et al. 1995). Die Zellen werden in Minimal Essential Medium (MEM), Eagle´s-Modifikation, mit 20 mM Hepes und Earle´s Salzen, 2 mM L-Glutamin, supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum, 50 mg/L Neomycinsulfat, 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in 80 cm²-Zellkulturflaschen (Nunclon™; Nunc, Wiesbaden) bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C ohne spezielle Begasung gehalten. Nach einer Inkubationsdauer von etwa 4 Tagen sind die Zellen zu einem geschlossenen Monolayer ausgewachsen und können bis zu 4 Monate ohne besondere Maßnahmen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Passage der RTG-2-Zellen werden die Zellen der dichtgewachsenen Kulturflaschen jeweils auf zwei neue Flaschen verteilt. Das alte Medium wird dazu aus den Flaschen dekantiert, und die Zellen werden für etwa 20 sec mit 15 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Sigma, Deisenhofen) gewaschen. Nach Abdekantieren dieser Lösung werden 2 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung zu den Zellen pipettiert. Nach etwa 2 - 3 min lösen sich die festhaftenden Zellen vom Untergrund; dies kann makroskopisch am Ablösen des matt erscheinenden Monolayers oder unter optischer Kontrolle am Inversmikroskop über-

prüft und durch leichtes Klopfen an die Flasche unterstützt werden. Die vereinzelten Zellen werden in 5 ml Medium aufgenommen – dabei wird das Trypsin durch die Protease-Inhibitoren des FKS sofort gehemmt –, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert, im Anschluss zu gleichen Teilen auf zwei 80 cm²-Flaschen verteilt und mit 12 ml Medium aufgefüllt.

Durchführung der Cytotoxizitätstests

Die Zellen einer dichtgewachsenen Kulturflasche mit einem Konfluenzgrad von 80 - 90 % wurden, wie oben beschrieben, abgelöst und in 2,5-fach konzentriertem MEM mit 25 % FKS, 125 mg/L Neomycinsulfat, 250 E/ml Penicillin und 250 µg/ml Streptomycin in einer Konzentration von 3 - 4 x 10^5 Zellen pro ml aufgenommen. Abb. 2.7 zeigt das Pipettierschema des Cytotoxizitätstests: Alle randständigen Kavitäten der Mikrotiterplatte (Nunc™) dienten als Blanks, so dass pro Schadstoffkonzentration 6 Replika getestet wurden. Die Verdünnung der wässrigen Proben erfolgte mit sterilem Aqua bidest. in Verdünnungsschritten von 1:2 (bzw. nach der G-Systematik, siehe Abb. 2.7), so dass sich eine maximale Verdünnung der Stammlösung von 1:256 (bzw. 1:16) ergab. Es wurden in die Wells der Mikrotiterplatte jeweils 80 µl der Zellsuspension und 100 µl der verdünnten Schadstofflösung oder einer Positivkontrolle (40 mg/ml 3,5-Dichlorphenol) pipettiert. Zum Ausgleich der geringen Biotransformationskapazität der RTG-2-Zellen wurden die Cytotoxizitätstests mit und ohne S9-Supplementierung untersucht (Braunbeck et al. 1996, Maron & Ames 1983, Segner 1998). Die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden entweder mit 20 µl S9 Mix (S9-Präperat in einer Konzentration von 2mg/ml in sterilfiltriertem S9-Puffer) oder mit 20 µl S9-Puffer ohne S9-Präparat befüllt

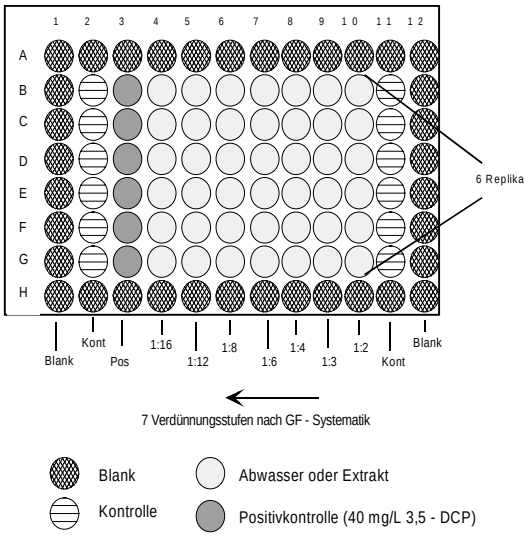


Abb. 2.7. Pipettierschema für Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen.

(Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a, Maron & Ames 1983). Im Anschluss wurden die Platten für 24 h (bei unsterilen Abwasserproben und Porenwässern) und für 48 h (bei Extrakten und sterilen Eluaten) bei 20 °C im Brutkühlschrank inkubiert.

Endpunkte der Cytotoxizitätstests

Die Schädigung der Zellen wurde mit den Endpunkten Neutralrotretention (Borenfreund & Puerner 1984), MTT-Assay (Mosmann 1983) und Laktatdehydrogenase-Freisetzung ins Medium (Weishaar et al. 1975) sowie lichtmikroskopisch im Inversmikroskop (CK-2, Olympus, Hamburg) untersucht.

Laktatdehydrogenase-Freisetzung ins Medium. Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist in intakten Zellen im Cytoplasma lokalisiert. Sein Austritt aus den Zellen wird durch intakte Zellmembranen unterbunden; eine gewisse Grundaktivität des Enzyms findet sich jedoch stets im Medium der Kontrollzellen. Eine Membranschädigung der Zellen, wie sie durch bestimmte umweltrelevante Schadstoffe (etwa Phenolderivate) induziert werden kann, führt zu einer verstärkten Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile und somit zu einer Anreicherung des relativ stabilen Enzyms Laktatdehydrogenase im umgebenden Nährmedium (Mitchel et al. 1980, Mosmann 1983). Die Messung der Laktatdehydrogenase gilt als ein etablierter Endpunkt der Cytotoxizität (Ahne 1985, Barile 1994, Braunbeck 1993, 1994, Decker & Matthes 1988, DelRaso 1992, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1996, 1999a, 2000a, b, Legrand 1992, Lenz 1991, Mitchel et al. 1980, Segner & Lenz 1993, Weishaar et al. 1975). Die Laktatdehydrogenase-Aktivität wurde direkt über die Konzentrationsabnahme von Niktotinadenindinukleotid (NADH) photometrisch bestimmt (Weishaar et al. 1975).

Dazu wurden jeweils 50 µl des Überstandes der Kavitäten einer mit Schadstoff inkubierten 96 Well-Platte

Gleichung 1. Berechnung der Laktatdehydrogenase-Aktivität. Die LDH-Aktivität wurde in Units pro Liter (U/L) berechnet und in % der unbelasteten Kontrollzellen angegeben (nach Lenz 1991 und Hollert & Braunbeck 1997).

$$U/L = \frac{\Delta E \times V_{Gesamt} \times 1000}{\varepsilon \times d \times \Delta t \times V_{Probe}} \qquad [\mathrm{mmol} \times \mathrm{min}^{-1} \times \mathrm{L}^{-1}]$$

$\Delta E = Extinktionsänderung$

$V_{Gesamt} = Gesamtvolumen\,[\mathrm{mL}]$

$\varepsilon = mikromolarer \quad Extinktionskoeffizient$

$\mathrm{NADH} \quad = 0{,}63 \quad \mathrm{mL} \times \mathrm{mmol}^{-1} \times \mathrm{cm}^{-1}$

$d = Schichtdicke \quad [\mathrm{cm}]$

$\Delta t = Länge \quad der \quad Messung \quad [\mathrm{min}]$

$V_{Probe} = Probenvolumen \quad [\mathrm{mL}]$

mit einer Mehrkanalpipette in eine unsterile Mikrotiterplatte (Renner, Darmstadt) auf Eis überführt. Als Referenz wurde in die Blanks 50µl 50 mM Tris-HCl-Puffer gefüllt. Zu allen Wells wurden 250 µl eines auf 25 ± 3 °C temperierten Reaktionsmixes (60 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 0,2 mM NADH) zugegeben. Luftblasen, welche die Messung stören, wurden mit einer Kanüle beseitigt. Nachdem die Reaktion durch zügiges Zufügen von 25 µl 10 mM Na-Pyruvat als Substrat gestartet wurde, konnte die Abnahme der Extinktion bei 340 nm mit einem Mikrotiterplattenreader (Spectra™ III, TECAN, Crailsheim) über 3 min verfolgt werden. Die Laktatdehydrogenase-Aktivität der einzelnen Wells wurde nach Gleichung 1 berechnet. Der Median der Aktivität aus 6 Messungen wurde in Prozent der LDH-Aktivität von unbelasteten Kontrollzellen angegeben. Neben dem NOEC-Wert (die Konzentration, bei der gerade keine signifikante Aktivitätsänderung stattfindet) wird der LOEC-Wert (die niedrigste Konzentration mit statistisch signifikanter Aktivitätsänderung) und gegebenenfalls ein LDH_{150}-Wert (die Konzentration bei der 150 % der LDH-Aktivität der Kontrollzellen erreicht wird) berechnet.

Neutralrot-Färbung. Der Endpunkt Neutralrot wurde in *In vitro*-Cytotoxizitätstests erstmals von Borenfreund & Puerner (1984) an einer Mäusezelllinie beschrieben; innerhalb eines Jahrzehnts konnte er sich als einer der wichtigsten Vitalitätstests für toxikologische und ökotoxikologische Fragestellungen etablieren (Balls & Clohier 1992, Borenfreund et al. 1988a, Borenfreund & Shopsis 1985a, b, Brack et al. 1999, Braunbeck 1993, 1994, Castano et al. 1994, 1996, DelRaso 1992, Ekwall et al. 1998, Gagne & Blaise 1998, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1996, 1999 a, b, 2000b, Lange et al. 1995, Saito & Shigeoka 1994, Schulz et al. 1995, Schüürmann & Segner 1994, Segner 1998, Vian et al. 1995, Zahn et al. 1995). Detaillierter Überblick über ältere Literatur bei Babich & Borenfreund (1992) und Barile (1994). Der Vitalitätstest beruht auf der Aufnahme des wasserlöslichen, leicht basischen Farbstoffes Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in die Lysosomen intakter Zellen. Die Anreicherung des Neutralrots resultiert aus der Deprotonierung des Farbstoffes im sauren Milieu der Lysosomen oder einer Bindung an saure Molekülen der lysosomalen Matrix (Barile 1994, Bulychev et al. 1978, Segner 1998). Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran resultieren in einer verringerten Farbstoffretention während des Waschvorgangs, die mittels einer photometrischen Messung bestimmt werden kann.

Die Neutralrotfärbelösung wurde aus einer Stammlösung (0,4 % in Aqua bidest.) durch eine 1:80-Verdünnung in MEM ohne FKS, jedoch mit Antibiotika hergestellt, über Nacht bei 20 °C vorinkubiert und zur Entfernung feiner Farbstoffkristalle durch einen 0,2 µm oder 0,4 µm Sterilfilter (Schleicher & Schuell) filtriert. Nach Absaugen des Expositionsmediums wurden 100 µl Neutralrot-Lösung in jede Kavität der Mikrotiterplatten pipettiert und diese für 3 h im Brutschrank bei 20 °C inkubiert. Das Färbemedium wurde dekantiert und die Zellen mit 100 µl PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Der in den Lysosomen der intakten Zellen zurückgehaltene Farbstoff wurde mit 100 µl Elutionslösung (50 % Ethanol, 1 % Essigsäure) unter Schütteln rückgelöst. Die Absorption wurde mit einem Mikrotiterplattenreader (Spectra™ III) bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm colorimetrisch bestimmt. Die Neutralrottests wurden mit Excel (Microsoft Inc.) ausgewertet. Dazu wurde der Median der Absorption des Blanks von den einzelnen Messwerten subtrahiert, und die einzelnen Messwerte wurden als Prozent des Medians der Kontrolle berechnet. Der Median wurde gegenüber dem arithmetischen Mittelwert bevorzugt, da er das robustere Lagemaß darstellt; er ist weniger von Ausreißern abhängig (Precht & Kraft 1992). Ein Test galt nur dann als valide, wenn die rechte Kontrolle nicht mehr als 20 % von der linken abwich. Von den Messwerten der einzelnen Konzentrationen wurden Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Varianz berechnet. Der Median der Konzentrationen und die Standardabweichung in Prozent der Kontrolle wurden in einem Histogramm dargestellt. Für die Bestimmung der EC_{50}-Werte (Effective Concentration) wurden die Mediane in einer Dosis-Wirkungs-Kurve metrisch aufgetragen; graphisch wurde der Wert ermittelt, bei dem die Kurve den Wert 50 % (= 50 % geschädigte Zellen) annahm. Als weitere Kenngröße wurde mit einer Regressionsanalyse eine exponentielle oder polynomische Trendlinie eingefügt und deren Bestimmtheitsmaß (R^2) als Maß für die Übereinstimmung der Kurve mit den Messwerten angegeben. Wurde der EC_{50}-Wert durch die Schadstoffbehandlung nicht erreicht, wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit nachfolgendem *Post hoc-Test* nach Dunnett ($p>0,05$) überprüft, ob sich die Zellvitalität unter Belastung signifikant veränderte. Neben dem NOEC-Wert (No Observed Effect Concentration, die höchste Dosis ohne Wirkung) wurde auch der LOEC-Wert (Lowest Observed Effect Concentration, niedrigste Konzentration mit signifikanter Vitalitätsänderung) ermittelt.

MTT-Färbung. Dieser erstmals vom Mosman (1983) beschriebene Assay benutzt ebenfalls eine colorimetrische Messung, um die Anzahl von lebensfähigen Zellen zu bestimmen. Der MTT-Assay wurde

bei zahlreichen *In vitro*-Cytotoxizitätsuntersuchungen als Endpunkt benutzt (Barile 1994, Borenfreund et al. 1988b, Braunbeck 1993, 1994, Braunbeck et al. 1995a, b, Carmichael & et 1987, Denizot & Lang 1986, Edmondson 1988, Hollert et al. 1999a, 2000a, b, Lange et al. 1995, Lenz 1991, Mosmann 1983). Ein großer Vorteil des Assays ist darin zu sehen, dass die Vitalität ohne zwischengeschaltete Waschschritte ermittelt werden kann, so dass auch die Vitalität von schlecht am Plastik der Mikrotiterplatten haftenden Zellen (Primärzellen) bestimmt werden kann (Hauck 1993). Zudem handelt es sich beim MTT-Test um einen echten Vitalitätstest, der eine physiologische Leistung (nicht einen Zustand) beschreibt. Der MTT-Test beruht auf der Reduktion des löslichen gelben MTT-Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolimbromid; Sigma, Deisenhofen) zu einem blauen, unlöslichen Formazanprodukt durch das mitochondriale, succinatabhängige Dehydrogenase-System. Diese Umwandlung findet nur in intakten Zellen statt, und die Menge des Formazans korreliert streng mit der Anzahl der vorhandenen Zellen (Denizot & Lang 1986, Lenz 1991).

Die Durchführung des MTT- Assays orientierte sich an den Vorschriften von Denizot & Lang (1986) und Lenz (1991). Die Zellen wurden – wie in Abb. 2.7 beschrieben – mit Fremdstoffen inkubiert, das Inkubationsmedium abgesaugt und 100 µl MTT-Färbemedium (1:10-Verdünnung einer sterilen MTT-Stammlösung mit 5 mg MTT pro ml Aqua bidest. in Medium ohne FKS, jedoch mit Antibiotika) in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gefüllt. Nach einer Inkubation über 4 h bei 20 °C wurde 100 µl der MTT-Extraktionslösung in die Kavitäten pipettiert, um das Formazan aus den Zellen zu lösen. Nach einer Rücklösedauer von etwa 30 min wurde die Intensität der Färbung mittels der Extinktion bei 540 nm gegen eine Referenz von 690 nm im Spektralphotometer (Spectra™ III) bestimmt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Resultate des MTT-Assays erfolgte analog zum Endpunkt Neutralrotretention.

2.6.2 Ames-Test

Testprinzip und eingesetzte Stämme

Zur Überprüfung des mutagenen Potenzials der Wasser-, Sediment- und Schwebstoffproben wurde in dieser Studie der Ames-Test benutzt. Er wurde am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg durchgeführt. Als Testorganismus dient dabei das Bakterium *Salmonella typhimurium* his^-, eine Mutante, die Histidin nicht synthetisieren kann und keine pathogenen Eigenschaften besitzt. *Salmonella typhimurium* his^- kann auf einem histidinhaltigen Agar kultiviert werden und ist bei -70 °C lagerfähig. Im Testansatz wird der Stamm auf Histidin-Mangelnährboden aufgetragen, und die Zahl der Rückmutationen (d.h. Revertanten) zu *Salmonella typhimurium* his^+ wird durch ihr Wachstum auf histidinfreiem Nährboden erfasst (Ames et al. 1975, Gunkel 1994b, Maron & Ames 1983); die Anzahl der entstandenen histidinunabhängigen (his^+) Kolonien dient als Maß für mutagene Aktivität (Helma et al. 1994, Maron & Ames 1983).

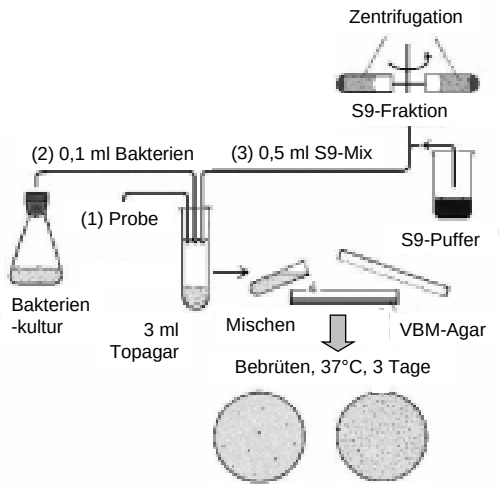


Abb. 2.8. Schematischer Ablauf des Ames-Tests, modifiziert nach Erdinger et al. (1997).

Der Ames-Test kann (1) nach dem von Ames entwickelten Platteninkorporationsverfahren, bei dem die Kolonien histidinunabhängiger Mutanten auf Minimalnährboden ausgezählt werden (Ames et al. 1975) oder (2) mit dem Fluktuationsassay, einer speziell an Mikrotiterplatten angepassten Testvariante, durchgeführt werden. Bei der zweiten Variante wird die Anzahl der Revertanten durch den Farbumschlag eines pH-Indikatormediums erkannt und durch Zählen der positiven Vertiefungen quantifiziert (Monarca et al. 1995).

Für gentoxikologische Untersuchungen werden unterschiedliche Stämme von *Salmonella typhimurium* mit verschiedenen Mutationen benutzt, wobei die in dieser Studie eingesetzten Stämme TA 98 und TA 100 durch folgende Eigenschaften charakterisiert sind (Ames et al. 1975, Gunkel 1994b, Maron & Ames 1983, Vahl 1997):

- Eine Mutation im Histidin-Operon (hisG46 bei dem Stamm TA100 und hisD3052 bei TA98), auf welcher der Ames-Test beruht.
- Deletionen im Excisionsreparatursystem (uvrB-Gen), durch welche die Bakterien nicht mehr in der Lage sind, gentoxininduzierte „fehlerhafte“ DNA-Bereiche auszubessern, so dass es zu einer

höheren Sensitivität gegenüber mutagenen Substanzen kommt.
- Eine rfa-Mutation (deep rough factor), die eine Strukturveränderung der Zelloberfläche (Fehlen einer Lipopolysaccharid-Schicht) bewirkt, aus der einerseits das Fehlen von humaninfektiösen Eigenschaften und andererseits eine höhere Permeabilität der Zellwand erklärt werden kann, so dass große Fremdstoffmoleküle leichter ins Zellinnere gelangen können.
- Zudem sind diese Stämme Träger des Plasmids pKM101, das Gene für eine Antibiotikaresistenz (Ampicillin) und ein besonders fehleranfälliges Reparatursystem („SOS repair“) enthält, welches die Sensitivität gegenüber mutagenen Substanzen weiter erhöht.

Durch die Verwendung verschiedener Ames-Stämme lassen sich spezifische Informationen über die Art der Genmutation erlangen: Während mit dem Stamm TA100 ein Basenaustausch detektiert werden kann, lassen sich mit dem Stamm TA98 Verschiebungen des DNA-Leserasters (Frameshift-Mutationen) nachweisen, die oftmals folgenschwere Veränderungen in der gesamten Aminosäuresequenz des Proteins bewirken (Erdinger et al. 1997).
Um auch die Wirkung von Promutagenen, die erst durch Enzyme (insbesondere durch Cytochrom P450-abhängige Enzyme) in DNA-schädigende Stoffwechselprodukte umgewandelt werden, zu detektieren und eine Annäherung dieses prokaryontischen Tests an eukaryontische Verhältnisse zu erreichen, werden die Testansätze mit S9-Präparaten (Jarvis et al. 1996, Maron & Ames 1983, Mersch-Sundermann et al. 1988, Vahl 1997, Zietz & Pfeiffer 2000) supplementiert. Der S9-Mix wird durch eine Injektion von Polychlorierten Biphenylen (PCB; etwa Aroclor 1254, 3-Methylcholanthren oder Mischungen wie Phenobarbital/ß-Naphthoflavon) in Säuger (zumeist Ratten) induziert und durch Zentrifugation der homogenisierten Leber gewonnen (Elliott et al. 1992, Maron & Ames 1983, Oinonen et al. 1994).

Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen der Sedimentproben im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten wurde der sogenannte Platteninkorporationstest nach Ames (Maron & Ames 1983) benutzt, bei dem die Kolonien histidinunabhängiger Mutanten auf Minimalnährboden ausgezählt werden (Abb. 2.8). Die Durchführung des Tests orientierte sich an dem Testprotokoll von Maron & Ames (1983) und ist als ausführliche Arbeitsanleitung für die Durchführung des Tests am Hygiene-Institut bei Erdinger et al. (1997) und Dürr (2000) dargestellt.
Die *Salmonella typhimurium*-Bakterien (Stämme TA98 und TA100) wurden in Nutrient Broth-Nährmedium unter Schütteln bei 37 °C für 10 h aus eingefrorenen Stammkulturen angezüchtet.
Dem Top-Agar wurde vor Testbeginn eine 10 %ige Biotin / Histidin-Lösung zugegeben, um durch eine mehrmalige Teilung der Bakterien auch Promutagene zu erfassen und ein Anwachsen der Bakterien zu einem sogenannten Hintergrundrasen zu gewährleisten (Überprüfen einer Bakterientoxizität). Um ein Erstarren der Mischung zu verhindern, wurde diese bei 37 °C im Wärmebad aufbewahrt. 2 ml Top-Agar wurden auf 2 Einmalkulturröhrchen (Falcon) verteilt. Danach wurden 100 µl des zu untersuchenden, in DMSO rückgelösten Extraktes oder 1 ml der Wasserprobe zu 0,5 ml S9-Präparat (aus Aroclor1254-induzierten Ratten, RRC-CCR, Roßdorf; bei dem nicht supplementierten Ansatz wurde eine analoge Menge S9-Verdünnungspuffer eingesetzt) und 0,1 ml der *Salmonella typhimurium*-Kultur gegeben. Diese Mischung wurde in Petrischalen mit Minimal-Agar (his^-) überführt und durch zügiges Drehen vor dem Erkalten gleichmäßig auf dem Agar verteilt (siehe Abb. 2.8). Als Positivkontrollen wurden für jeden Ansatz die in Tab. 2.11 aufgeführten Mutagene in den angegebenen Konzentrationen in jeweils 50 µl Lösungsmittel pro Platte eingesetzt.
Die Anzahl der spontanen Revertanten des jeweiligen Teststammes wurde mit einer Negativkontrolle, die nur die eingesetzte Menge des Lösungsmittels (100 µl DMSO bzw. 1 ml Aqua bidest.) enthielt, bei einer der Testansätze analogen Behandlung bestimmt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h bei 37 °C wurde die Revertantenzahl bestimmt und, um eine mögliche cytotoxische Wirkung der Schadstoffgemische zu erfassen, der Hintergrundrasen kontrolliert.

Tab. 2.11. Übersicht über die Positivkontrollen und die eingesetzten Konzentrationen, die bei der Untersuchung von Sedimentproben mit dem Platteninkorporationstest nach Ames (in 50 µl Lösungsmittel) pro Ames-Platte benutzt wurden.

S9-Mix	Stamm TA 98	Stamm TA 100
Mit	2,5 µg 2-Aminoanthracen (in DMSO)	2,5 µg 2-Aminoanthracen (in DMSO)
Ohne	0,1 µg 4-Nitroquinolin-N-oxid (NQO, in DMSO)	5 µg Natriumazid (in Aqua bidest.)

Bewertung der Befunde

Für eine einheitliche statistische Auswertung wurden in jedem Ames-Test die Kontrollen in 10 Parallelansätzen und die einzelnen Verdünnungen einer Verdünnungsreihe mit jeweils drei Replika untersucht. Der Induktionsfaktor wurde errechnet als Quotient aus den induzierten und den spontanen Mutanten. Während beim klassischen Ames-Test zur Bewertung von Chemikalien ab einem Induktionsfaktor von über 2 von einer mutagenen Wirkung des zu untersuchenden Agens ausgegangen wird, gilt der Ames-Test für Wasser und Abwasser nach der DIN 38415–4 bereits ab einer Erhöhung der Revertanten um die Zahl 20 bei TA98 und 80 bei TA100 (das entspricht in dieser Studie Induktionsfaktoren von 1,4 bis 1,9) als positiv. Beim *umu*-Test, einem Genotoxizitätstest, der ebenfalls *Salmonella typhimurium* einsetzt, stellt ein Induktionsfaktor von 1,5 den Grenzwert für eine genotoxische Wirkung dar (DIN 38415–3). Die OECD (1997) nennt als Kriterien für einen positiven Befund im Ames-Test eine konzentrationsabhängige Zunahme der Revertantenzahl über den getesteten Konzentrationsbereich und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Revertantenzahl bei einer oder mehr Konzentrationen in mindestens einem Stamm, mit oder ohne metabolische Aktivierung. Ein kritischer Induktionsfaktor als Grenzwert wird nicht genannt, wogegen statistische Methoden als eine Möglichkeit für die Bewertung der Testergebnisse angeführt werden (OECD 1997). Daher wurde in dieser Studie mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit nachfolgendem *Post hoc-Test* nach Dunnett ($p < 0,05$) überprüft, ob sich die exponierten Ansätze signifikant von den Kontrollen unterscheiden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Varianz der Testansätze ergab sich daraus eine mutagene Wirkung ab einem Induktionsfaktor von 1,3 bis 1,5. Während bei Mittelwertvergleichen mittels einfaktorieller Varianzanalysen die Proben ausschließlich mit der Kontrolle des jeweiligen Testansatzes verglichen werden und somit die Varianz der Kontrollen über die Zeit (Historische Kontrollen) unberücksichtigt bleibt, wurde in einem BMBF-Verbundvorhaben zur Erprobung von Genotoxizitätstests zur Bewertung von Oberflächengewässern auch die Varianz von Kontrollen berücksichtigt. Es wurde dazu für die eingesetzten Biomarker ein Signifikanzfaktor berechnet, der angibt, ab welchem Induktionsfaktor sich die Probe statistisch signifikant von der 95-Prozent-Perzentile aller historischen Kontrollen unterscheidet (Dürr 2000, Schnurstein 2000). Die dabei ermittelten Signifikanzfaktoren waren bei Ames-Test jeweils niedriger als die LOEC-Konzentrationen der einfaktoriellen Varianzanalyse, so dass bei der Verwendung einer ANOVA von keinen falsch-positiven Ergebnissen auszugehen ist.

2.6.3 Nachweis der bakterientoxischen Wirkung mit *Arthrobacter globiformis*

Testprinzip und verwendete Bakterien

Die Bakterientoxizität der Wasser-, Sediment- und Schwebstoffextrakte sowie von nativen Sedimenten und Schwebstoffproben wurde im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis* untersucht (Gratzer & Ahlf 1999a, Liß 1997, Liß & Ahlf 1997, Rönnpagel et al. 1995).

Die *Arthrobacter*-Bakterien werden mit der zu untersuchenden Umweltprobe in Kontakt gebracht, deren Toxizität durch die Hemmung von bakteriellen Dehydrogenasen (als Resazurinumsatz) photometrisch nachgewiesen und mit einer Kontrolle verglichen (Liu 1989). Durch die Dehydrogenase-Aktivität wird das blaue Substrat Resazurin (Absorptionsmaximum bei 595 nm) in das rosafarbene Resorufin (Absorptionsmaximum bei 620 nm) umgewandelt. Nur lebende Bakterien besitzen die wasserstoffabspaltenden Enzyme, die bei vielen Stoffwechsel-Prozessen (etwa Atmungskette) eine Rolle spielen und die Integrität der Zelle erfordern (Liß 1997).

Die verwendete Stammkultur von *Arthrobacter globiformis* wurde freundlicherweise von Herrn Gratzer und Herrn Dr. Ahlf (Technische Universität Hamburg-Harburg) zur Verfügung gestellt. *Arthrobacter globiformis* kann kommerziell bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig bezogen werden.

Arthrobacter ist unter den aeroben chemoheterotrophen Bakterien die im Boden am häufigsten vorkommende Gattung. Ein besonderes Merkmal ist die Vielgestaltigkeit (Pleomorphie) im Verlauf des Wachstums. Bei jungen Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase liegen die Bakterien als verzweigte Stäbchen von 0,5 - 0,8 x 1,4 µm vor, in der stationären Endwachstumsphase bilden sie Kokken von 0,6 - 0,8 µm Größe aus. Während *Arthrobacter* in der logarithmischen Wachstumsphase grampositiv ist, tendiert es gegen Ende dieser Wachstumsphase dazu, sich gramlabil zu verhalten (Gratzer & Ahlf 1999a, Liß 1997).

Testdurchführung

Die Durchführung des Bakterienkontakttests orientierte sich an dem derzeit gültigen DIN-Vorschlag für den Bakterienkontakttest (DIN 1998) und ist detailliert bei Gratzer & Ahlf (1999a), Liß (1997) und Winn (2000) dargestellt.

Anzucht der Stammkultur. Die Bakterien für die Stammkultur wurden mit sterilem DSM-Medium

vom Schrägagar des Transportgefäßes, bzw. später bei der Weiterzucht im Labor aus 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Lagerung bei –78 °C, Eppendorf, Hamburg) in sterile Erlenmeyerkolben mit 50 ml DSM-Stammmedium für Corynebakterien überführt. Die Vorkultur wurde bei Dunkelheit 8 Stunden im Wärmeschrank bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler (GFL, Burgwedel) mit 150 rpm inkubiert. Von der so hergestellten Bakteriensuspension wurde wiederum 1 ml in 50 ml DSM-Stammmedium pipettiert und mit 100 rpm bei 30 °C über 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde photometrisch die Absorption der Suspension bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt (SLT Spectra™ III. TECAN, Crailsheim) und durch Verdünnung mit DSM-Stammmedium auf 0,5 eingestellt. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde mit 4 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen) versetzt, in Portionen zu 1 ml in sterile 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei –78 °C schockgefroren.

Anzucht der Testkultur. Am Vortag des Versuchstages wurden 3 x 1 ml der *Arthrobacter globiformis*-Stammkultur langsam aufgetaut und in sterilisierte 250 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml auf Zimmertemperatur vorgewärmten DSM-Nährmedium (1:3 verdünntes DSM-Stammmedium) überführt.

Die Bakterien wurden über Nacht etwa 14-16 Stunden im Wärmeschüttelbad (GFL 1083, GFL, Burgwedel) bei 30 °C mit 60 rpm und Dunkelheit inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD_{595}) mit vorgewärmtem DSM-Nährmedium auf 0,3 bis 0,4 verdünnt und unter den oben genannten Bedingungen (über 1-2 Stunden) bis zu einer OD_{595} von 0,5 inkubiert. Für Kontakttests mit Festphase (native Sedimente und Schwebstoffe) wurde die Bakteriensuspension unverdünnt und für wässrige Lösungen (Monosubstanzlösungen, Extrakte, Porenwässer und Eluate) nach einer weitern Verdünnung auf eine OD_{595} von 0,15 verwendet.

Testdurchführung mit wässrigen Proben. Der Dehydrogenase-Assay wurde in 24-Well-Mikrotiter-Platten (Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. In den Kontrollansätzen (n=12) wurde jeweils 1 ml Aqua bidest. vorgelegt, in den Testansätzen (n=4) je 1 ml der wässrigen Probe bzw. einer Verdünnungsreihe der Probe in Aqua bidest. Je 1 ml der Bakteriensuspension (OD_{595} von 0,15) wurden in die Ansätze überführt, in die Blindansätze wurde dieselbe Menge an DSM-Nährmedium zugegeben.

Die Platten wurden verschlossen und bei 30 °C für 2 h bei Dunkelheit und auf dem Horizontalschüttler mit 70 rpm geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurde zu allen Ansätzen 400 µl Resazurinlösung (45 mg/l in Phosphatpuffer) hinzugefügt. Die Platten wurden unter den oben genannten Bedingungen weiter inkubiert, bis die OD_{595} des Kontrollansatzes mit Bakterien durch eine Oxidation des blauen Resazurins in das pinkfarbene Resorufin nur noch 70 % der OD_{595} des Ansatzes ohne Bakterien betrug (nach Zentrifugation über 20 sec bei 3000 g). Dieses Verhältnis wurde nach einer Reaktionszeit von 90 bis 120 min erreicht. Von jeder Kavität wurde zweimal 350 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Fa Renner, Darmstadt) pipettiert und photometrisch bei 595 nm gemessen.

Testdurchführung mit Feststoffen. Für die Überprüfung der bakterientoxischen Wirkung von nativen Sedimenten und Schwebstoffen wurden jeweils 3 g Probe (Feuchtgewicht) in 15 ml PE-Röhrchen eingewogen, für die Kontrollansätze erfolgte die Einwaage von 3 g Quarzsand. Untersuchungen von Gratzer & Ahlf (1999a) und Liß (1997) haben gezeigt, dass ein Kontrollsediment mit verschiedenen Tonmineralen und Quarzsand der Siebklasse W4 vergleichbare Befunde liefert. Von jeder Probe und Kontrolle wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, fünf unabhängige Replika getestet. Um Verdünnungsreihen zu untersuchen, wurde zunächst das Trockengewicht der Sedimente durch Trocknung im Wärmeschrank bei 105°C (Heraeus, Hanau) bestimmt. Die Höchstkonzentration betrug bei Bakterienkontakttests mit Verdünnungsreihen 2 g Sediment (Trockengewicht; DIN 1998). In den Verdünnungsstufen wurde das zu 2 g fehlende Gewicht mit Quarzsand der Siebklasse W4 ergänzt. Im Anschluss wurde zu allen Ansätzen 3 ml bidestilliertes Wasser zugegeben. In die Blindansätze (Proben und Kontrollen ohne Bakterien) wurde je 2 ml DSM-Nährmedium pipettiert und in die Probenansätze (Proben und Kontrollen mit Bakterien) je 2 ml einer Bakteriensuspension mit einer OD_{595} von 0,5. Alle Ansätze wurden 2 Stunden bei 30 °C und Dunkelheit im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Kelheim) mit 70 rpm inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4 ml Resazurinlösung (45 mg/l Phosphatpuffer). Die Testansätze wurden unter den oben beschriebenen Inkubationsbedingungen weiterbehandelt, bis die OD_{595} des Kontrollansatzes mit Bakterien etwa 70 % des Blindansatzes betrug. Der damit einhergehende Farbumschlag von Dunkelblau zu Pink (durch die Umwandlung des Resazurins in Resorufin) zeigte sich zumeist nach einer Inkubationszeit von 120 bis 150 Minuten. Im Anschluss wurden die Testansätze zunächst bei 4 °C für 5 min bei 2000 g zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Hanau), um die Probe von feinen Schwebstoffen zu befreien und dann in ein Eisbad überführt, um die Reaktion abzubremsen. Die Überstände der Zentrifugenröhrchen wurden zügig durch sterile Einweg-Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Durch die Sterilfiltration wurden die Bakterien ent-

fernt und somit ein endgültiges Abstoppen der Reaktion erreicht. Von den Filtraten wurden je Replika zweimal 350 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Renner, Darmstadt) überführt und photometrisch bei 595 nm gemessen.

Berechnung der Hemmung der Bakterien und Bewertung der Befunde

Die Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität der Bakterien wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$Hemmung\,[\%] = 100 - \left[\frac{OD\ Blindwert\ Probe - OD\ Probe}{OD\ Blindwert\ Kontrolle - OD\ Probe\ Kontrolle} * 100 \right]$$

Die Mediane der Hemmungen und die Standardabweichungen wurden graphisch dargestellt. Die Versuchsansätze wurden mittels (nicht parametrischen) einfaktoriellen Varianzanalysen mit nachfolgendem *Post hoc*-Test nach Dunnett ($p<0,05$) auf statistische Unterschiede zu den Kontrollansätzen überprüft. Abhängig von der Varianz der einzelnen Ansätze stellte dabei eine etwa 20%ige Hemmung bzw. Aktivierung der Bakterien den Schwellenwert für einen signifikanten Effekt dar. Dieser Grenzwert deckt sich gut mit den Befunden der Ringtests mit dem Bakterienkontakttest, die im Zuge einer DIN-Validierung durchgeführt wurden (Gratzer & Ahlf 1999a).

Verwendete Lösungen und Chemikalien

DSM-Stammmedium für Corynebakterien: 10 g/L Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Merck, Darmstadt); 5 g/L Select Yeast Extract (Sigma, Deisenhofen); 5 g/L (+)Glukose (Sigma, Deisenhofen); 5 g/L NaCl (Merck, Darmstadt) in Aqua bidest. auf pH 7,2 ± 0,2 einstellen und 20 Minuten bei 120 °C autoklavieren.

DSM-Nährmedium für Corynebakterien: DSM-Stammmedium 1:3 mit sterilem Aqua bidest. verdünnt.

Phosphatpuffer: 8,2 g/L Kalium-Dihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (Gerbu, Gaiberg); 13,24 g/L di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 (Roth, Karlsruhe); 2,0 g/L (+) Glukose (Sigma, Deisenhofen); 2,0 g/l Natriumacetat, wasserfrei (Riedel-deHaën, Seelze) in Aqua bidest. auf pH 7,2 ± 0,2 einstellen und 20 Minuten bei 120 °C autoklavieren.

Resazurinlösung: 45 mg Resazurin (7-Hydroxy-3H-Phenoxazin-3-on-10-Oxid-Natrium, Fluka, Buchs, Schweiz) in 1000 ml sterilem Phosphatpuffer. Die bei 4 °C und Dunkelheit gelagerte Resazurinlösung wurde bis zu 7 Tage nach ihrer Herstellung benutzt.

Positivkontrolle: Stammlösung mit 800 mg/L 4-Nitrophenol (Riedel-deHaën, Seelze) in Aqua bidest. Lagerung bei Dunkelheit und 4 °C über nicht mehr als 14 Tage. Endkonzentration des Nitrophenols im Bioassay: 40 mg/L, soweit nicht anders gekennzeichnet.

2.6.4 Nachweis der gentoxischen Wirkung im Comet-Assay

Testprinzip und verwendete Zellen

Der COMET-Assay (Mikrogelelektrophorese, Einzelzellgelelektrophorese) ist ein eukaryontischer Genotoxizitätstest, der ursprünglich für Säugetiere entwickelt wurde und auf der selektiven Wanderung von DNA-Fragmenten während einer Elektrophorese beruht (Singh et al. 1988).

Nach Lyse der Zellen und einer Färbung der DNA mit z.B. Ethidiumbromid kann das Ausmaß der DNA-Schädigung durch die Ausbildung eines Kometen (Auswandern von DNA-Fragmenten aus dem Zellareal) quantifiziert werden. Nachweisbare Effekte mit der hier angewendeten alkalischen Version des Assays sind Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, AP-Stellen (apurinische/apyrimidinische Stellen), Crosslinks und die Intensität der zellulären Reparatur, ein indirektes Maß für die Bildung von Addukten (McKelvey-Martin et al. 1993, Schnurstein 2000, Schnurstein et al. 1999). Prinzipiell kann der Comet-Assay mit jeder eukaryontischen Zelle eingesetzt werden. In dieser Studie wurde er *in vitro* mit der permanenten Zelllinie RTG-2 durchgeführt, die auch für die Untersuchungen der Cytotoxizität eingesetzt wurde. Bei vorhandener Zelltoxizität wurde die Probe soweit verdünnt, dass mehr als 80 % der Zellen die Exposition überlebten. Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Cytotoxizität ein genotoxisches Potenzial der Probe maskiert bzw. vortäuscht. Zum Ausgleich der geringen Biotransformationskapazität der Zellen wurde der Comet-Assay (analog zum Cytotoxizitätstest und Ames-Test) mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix durchgeführt, um auch Promutagene zu erfassen, die erst nach Aktivierung durch Biotransformationsenzyme der P450-Familie (Goksoyr & Förlin 1992, Stegeman & Kloepper-Sams 1987) eine genotoxische Wirkung entfalten.

Herkunft und Kulturbedingungen der RTG-2-Zellen sowie die Zusammensetzungen der hier genannten Lösungen sind im Abschnitt Cytotoxizität (2.6.1) detailliert beschrieben.

Testdurchführung

Exposition. Zur Exposition der Zellen wurden diese – analog zu der in Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Zellpassage – aus den Zellkulturflaschen gelöst und in einer Konzentration von jeweils 5-6 x 10^5 Zellen in 1 ml MEM-Medium in sterilen Petrischalen (Ø 3,5 cm, Nunc) ausgesät und 24 h bei 20 °C inkubiert, um

eine Anheftung der Zellen in den Schalen zu ermöglichen. Die Exposition erfolgte durch einen Austausch des Mediums gegen ein mit den entsprechenden Umweltgemischen versetztes Medium. In jede Petrischale wurde 800 µl MEM (komplett; 2,5-fach konzentriert), 1 ml wässrige Probe und für den Ansatz mit S9-Aktivierung 200 µl S9-Mix (S9-Präparat aus Phenobarbital/ß-Naphthoflavon-induzierter Ratte, (RRC-CCR, Roßdorf) in S9-Puffer mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml) oder für den Ansatz ohne S9-Aktivierung 200 µl S9-Puffer gegeben. Jede Probe wurde mit und ohne S9-Aktivierung inkubiert. Nach einer Expositionsdauer von 20 h wurden die Zellen kurz mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gespült und mit 200 µl einer Trypsin/EDTA Lösung vom Untergrund abgelöst. Nach Ablösung wurde die Reaktion durch die Zugabe von 800 µl Medium gestoppt und die Zellsuspension 10 min bei 150 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 70-150 µl Medium aufgenommen und die entstandene Zellsuspension im Comet-Assay weiterverarbeitet.

Comet-Assay. Die Durchführung des Comet-Assays orientierte sich an Karaus (1999) und Schnurstein (2000). Abb. 2.9 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf des Comet-Assay. Die aufgerauten Objektträger wurden mit einem Diamantschreiber gekennzeichnet, in 99 % Ethanol entfettet und getrocknet. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten mit puderfreien Latexhandschuhen, da Puderreste die Auswertung beeinträchtigen können. 1 % NMA (Normal Temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA) wurde in PBS (9,55 g/L Dulbecco´s Phosphate Buffer Saline, Sigma, Deisenhofen) auf einer Heizplatte bei 300 °C aufgekocht und auf einer weiteren bei 150 °C schwach siedend gehalten. Auf jeden Objektträger wurden 700 µl NMA aufgebracht, mit Hilfe eines Deckglases (Sondergröße 24 x 70 mm, Langenbrink, Emmendingen) gleichmäßig verteilt und für ca. 10 min in einem Trockenschrank bei 37 °C angetrocknet. Mittels eines weiteren Objektträgers wurde diese Gelschicht wieder abgezogen und die Objektträger im Wärmeschrank vollständig getrocknet (Verbesserung der Haftung der folgenden drei Gelschichten, die auf dem Objektträger verbleiben). 200 µl 0,5 % NMA wurden auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei verteilt, direkt anschließend wurde der Objektträger für 3 min auf eine waagerechte, eisgekühlte Metallplatte aufgelegt, um das Gel zu härten. Die Objektträger wurden in einer Färbebox auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, bis die zweite, Zellen enthaltende Gelschicht aufgetragen wurde. Die durch die Exposition (siehe oben) erhaltenen Zellsuspensionen wurden zu je 30 µl in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen portioniert und die Objektträger mit der vorbereiteten ersten Gelschicht im Trockenschrank bei 37 °C erwärmt, um ein gleichmäßiges Verteilen der zweiten Gelschicht zu ermöglichen. Das Deckglas eines Objektträgers wurde abgezogen. 90 µl LMA (Low Temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA in 9,55 g/l PBS aufgekocht und bei 37 °C flüssig gehalten) wurde mit den in Reaktionsgefäßen portionierten 30 µl Zellsuspension durch

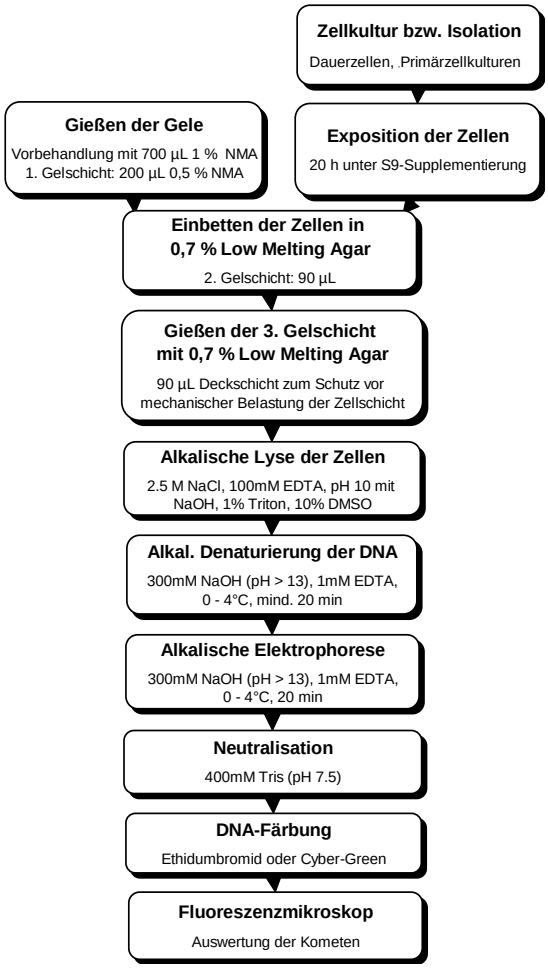


Abb. 2.9. Schematischer Ablauf des Comet-Assays mit RTG-2-Zellen (aus Schnurstein et al. 1999).

mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt, um davon wiederum 90 µl auf dem Objektträger mit einem Deckglas blasenfrei zu verteilen. Im Anschluss wurde das Gel für 3 min auf Eis gehärtet und für 5 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Als dritte Gelschicht wurden nach dem Abziehen des Deckglases 90 µl 0,7 % LMA aufgetragen, blasenfrei mit einem neuen Deckglas verteilt und wie oben auf Eis gehärtet und im Trockenschrank wieder auf 37°C angewärmt. Durch diese Behandlung sind die Zellen in einer Gelschicht eingeschlossen, die sandwichartig von zwei anderen umgeben wird. Die erste Gelschicht

stellt dabei die Verbindung zum Objektträger her und schafft durch ihre Dicke Abstand von diesem, so dass die Schärfenebene bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop oberhalb des rauen, unruhigen Untergrundes liegt. Die dritte Gelschicht sorgt für mechanischen Schutz der zweiten in den weiteren Bearbeitungsschritten und verhindert, dass die DNA eventuell nicht ganz eingeschlossener Zellen während der Lyse aus dem Gel diffundiert. Zur Zerstörung der Zellmembranen sowie zur Extraktion der Kernproteine wurden die Objektträger nach Entfernen der Deckgläser in 4 °C kalter Lyselösung (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 10, vor Versuchsbeginn mit 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO komplettiert) für mindestens 1,5 Stunden (oder über Nacht) im Kühlschrank unter stark alkalischen Bedingungen inkubiert. Kälte und Dunkelheit schützen dabei die DNA vor Autolyse und UV-Schäden. Nach der Lyse ist die DNA völlig ungeschützt, so dass alle weiteren Versuchsschritte in der Dunkelkammer durchgeführt wurden. Im Anschluss an die Lyse folgten Denaturierung und Elektrophorese der DNA. Dazu wurden die Objektträger in einer eisgekühlten Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, 4 °C, pH < 13) überschichtet und für 20 min inkubiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 25 V und 300 mA für 20 min (Power Supply Model 200/2.0, Bio-Rad, Richmond, USA). Hierbei wird durch Schadstoffeinfluss fragmentierte DNA zu Kometen (Schweifen) auseinandergezogen, die mit steigendem Fragmentierungsgrad der Moleküle immer länger und dichter werden (Singh et al. 1988, Tice et al. 1990). Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger für 2 min in Tris-Puffer (0,4 M, pH 7,5) getaucht. Im neutralen Umfeld spiralisiert sich die DNA wieder und kann so mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt werden. Die Gele können ab diesem Zeitpunkt bis zu zwei Wochen auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank gelagert werden.

Auswertung des Comet-Assays und Bewertung der Befunde. Jedes Gel wurde mit 75 µl einer Ethidiumbromidlösung (2 µM in Aqua bidest.) angefärbt, die mit einem Deckglas blasenfrei verteilt wurde. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan, Leitz) in einer Metallbox auf PBS-getränktem Tuch lichtgeschützt aufbewahrt. Bei 340-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 518 nm wurden die Kometen mit einem Bildanalysesystem (Optilas, München), bestehend aus einer Graustufen-CCD-Kamera (Pulnix TM-765E Kinetic), einem angeschlossenen PC mit zwei Monitoren und der Auswertungssoftware Comet 3.0™ (Kinetic Images, Liverpool, GB), vermessen. Pro Probe wurden 2 Gele ausgewertet, von denen jeweils 50 zufällig ausgewählte Zellen vermessen wurden. Mit Hilfe eines Makros für Excel™ 5.0 (Microsoft Corporation, USA) von Kinetic Images kann auf die Rohdaten der Messungen zugegriffen werden. Als Auswerteparameter wurde in dieser Studie das Tail Moment (als Produkt der Schweiflänge und Fluoreszenzintensität im Schweif) eingesetzt. Dies ist eine häufig verwendete Methode (Ashby et al. 1995, Schnurstein 2000), da sie die beiden wichtigsten Variablen, nämlich Länge des Kometenschweifs und Anteil der DNA im Schweif berücksichtigt. Die hundert ermittelten Tail Moment-Daten pro untersuchter Testkonzentration wurden mit dem Programm Sigma Plot 5.0 (Jandel-SPSS, Erkrath) als Box- and Wisker-Plots dargestellt, einem Diagrammtyp, der Median (inklusive seiner Lage als Maß für die Verteilung der Daten innerhalb der 25- und 75 % Percentilen), Standardabweichung, 25- und 75 % Percentile (als Grenzen einer rechteckigen Box) und die 5- und 95%-Percentile (als Kreise) demonstriert. Mittels einer nicht-parametrischen einfaktoriellen Varianzanalyse (Kruskall-Wallis-Test) mit nachfolgendem Dunnett-Test (Sigma Stat 2.0; Jandel-SPSS, Erkrath) wurde überprüft, ob sich die nicht-normalverteilten Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ von den Kontrollansätzen unterscheiden. Diese Proben wurden als genotoxisch bewertet. Analog zum Ames-Test (Abschnitt 2.6.2) wurden bei einem BMBF-Verbundprojekt zur Erfassung der genotoxischen Aktivität von Oberflächengewässern Signifikanzfaktoren berechnet, die auf Grundlage aller historischen Kontrollen angeben, ab welchem geometrischen Mittel des Induktionsfaktor eine Probe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 bzw. 5 % als positiv angesehen werden kann. Die dabei ermittelten Signifikanzfaktoren lagen unter der Signifikanzgrenze der Varianzanalysen, so dass bei der eingesetzten Bewertungsmethode keinesfalls von falsch-positiven Ergebnissen ausgegangen werden muss (Schnurstein 2000).

2.6.5 Nachweis der endokrinen Wirkung im Dot-Blot-Assay

Vitellogeninsynthese als Marker für endokrin wirksame Substanzen

In dieser Studie wurde Vitellogenin als Biomarker für die Untersuchung der endokrinen Aktivität von Umweltproben eingesetzt. Das Phospholipoglycoprotein Vitellogenin ist die Vorstufe der Dotterinhaltsstoffe aller eierlegender Wirbeltiere und tritt unter normalen Umständen nur bei weiblichen Organismen auf; werden jedoch männliche Individuen mit östrogen wirksamen Substanzen belastet, wird die Vitellogenese auch bei Männchen induziert (Ankley et al. 1998,

Arcand-Hoy & Benson 1998, Harries et al. 1997, Matthiessen & Sumpter 1998).

Natürliche Vitellogeninsynthese und Induktion durch Schadstoffe. Die Induktion der Vitellogeninsynthese in den Leberzellen weiblicher oviparer Vertebraten erfolgt normalerweise nach der Bindung des natürlichen Induktors 17ß-Estradiol an den intrazellulären Estradiolrezeptor (Flouriot et al. 1996). Durch die Bindung des Hormons dissoziieren die rezeptorassoziierten Proteine Hsp 90 (Dimer), Hsp 70 und p55 (Landel et al. 1995, Sabbah et al. 1996). Nach einer Dimerisierung mit einem zweiten Hormon/Rezeptor-Komplex bindet dieser an sogenannte Estrogen Responsive Elements (ERE) der DNA (Katzenellenbogen et al. 1993). Diese DNA-Elemente können die Expression von Genen entweder verstärken oder reduzieren. Auch das Vitellogenin-Gen unterliegt der Steuerung eines ERE. Nach Bindung eines Östrogen/Estradiolrezeptor-Komplexes an dieses Steuerelement erfolgt eine Induktion der Vitellogenin-mRNA-Synthese. Neben 17ß-Estradiol sind zahlreiche weitere Substanzen in der Lage, an den Estradiolrezeptor zu binden und somit zu einer Induktion der Vitellogeninsynthese zu führen (Andersson et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Flouriot et al. 1996, Harries et al. 1999, Islinger et al. 1999b, Pawlowski 1998, Routledge et al. 1998).

Verschiedene Biomarker zum Nachweis von Vitellogenin. Die Vitellogenin-Induktion kann sowohl im lebenden Organismus (*in vivo*) als auch *in vitro* in isolierten Hepatocyten (Leberzellen) erfolgen und auf der Ebene von Proteinen durch Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder auf der Ebene der mRNA über RNA-Sonden sowie RT-PCR nachgewiesen werden (Übersichten bei Islinger et al. 1999a, b, Matthiessen & Sumpter 1998, Ren et al. 1996, Sumpter & Jobling 1995).

Für die Untersuchungen zur endokrinen Wirksamkeit von XAD-Wasserextrakten, Abwasserproben, Porenwässern und acetonischen Extrakten wurde ein nichtradioaktiver Dot-Blot/RNAse-Protection-Assay zum Nachweis von Vitellogenin-mRNA in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) eingesetzt, der von Islinger et al. (1999b) entwickelt und an den Monosubstanzen 17ß-Estradiol, 17a-Ethinylestradiol, Bisphenol A, Genistein und 4-Nonylphenol überprüft worden war.

Testprinzip

Abb. 2.10 zeigt den schematischen Ablauf des Dot-Blot-Assays. Die Gesamt-RNA wird aus mit Umweltproben exponierten Hepatocyten mit Hilfe eines kommerziellen Testkits (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) isoliert. Zur Überprüfung der Intaktheit der RNA wird stellvertretend die Intaktheit der ribosomalen RNA im 1%-Agarose-Gel untersucht. Zur Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA im Dot-Blot/RNAse-Protection-Assay wird eine cRNA-Sonde verwendet, bei der anstelle von UTP an jeder 20. bis 25. Stelle der Nucleotidkette Digoxigenin-UTP eingebaut wurde (Ren et al. 1996). Der Nachweis der Digoxigenin-markierten RNA erfolgt über einen Antikörper gegen Digoxigenin, der wiederum an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates für die alkalische Phosphatase (CDP-Star) wird ein Produkt gebildet, das sichtbares Licht emittiert, das auf entsprechend empfindlichen Röntgenfilmen (BioMax ML Light-1, Kodak) nachgewiesen werden kann.

Spendertiere

Als Spendertiere für die Hepatocytenkulturen wurden zweijährige männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet, welche von der Forellenzucht Mariental (Buchen) bezogen wurden. Die Tiere wurden für mindestens 4 Wochen in 600 L Kunststoffwannen bei 12 ± 2 °C sowie einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden im Durchfluss gehältert. Die Fütterung erfolgte 5 x wöchentlich mit kommerziellem Forellenfutter der Raiffeisen e.G.

Testdurchführung

Die Durchführung des Dot-Blot-Assays erfolgte auf Grundlage der Methode von Islinger et al. (1999b). Detaillierte Arbeitsanweisungen für Untersuchung von Abwasserproben und Porenwässern sind bei Hollert et al. (2000e) und Pawlowski (1998) sowie für die Untersuchung von acetonischen Extrakten und XAD-Wasserextrakte bei Siebert (1999) dargestellt.

Isolation der Primärhepatocyten

Das Versuchstier wurde zunächst in einer gesättigten Benzocain-Lösung (Ethyl-*p*-aminobenzoat, Sigma, Deisenhofen) betäubt, gewogen und äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Unter der Sterilwerkbank wurde der Fisch ventral von den Bauchflossen bis zu den Brustflossen sowie lateral bis zur Niere eröffnet und die Vena porta freigelegt. Anschließend wurde eine Flügelkanüle (Ø 0,8 mm) in die Vena porta eingeführt und mittels Arterienklemmen fixiert. Die Präperfusion der Leber erfolgte mit Präperfusionsmedium für maximal 8 min mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 7 ml/min (Pumpe Reglo M8: Stufe 70; Ismatec, Zürich, Schweiz). Währenddessen wurde die Leber herauspräpariert und an einem Stativ fixiert. Im zweiten Perfusionsschritt wurde die Leber für 15 min bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 ml/min (Stufe 60) mit 70 ml Isolationsmedium (entspricht Kulturmedium ohne Antibiotika) mit 0,02 % Collagenase H (aus *Chlostridium histolyticum*, Roche

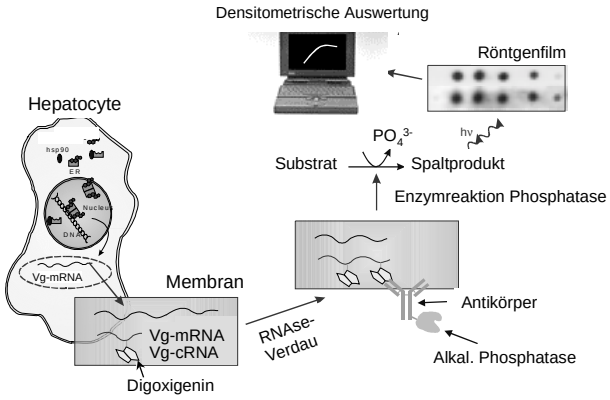


Abb. 2.10. Schema des Nachweises von Vitellogenin in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle über die Vitellogenin-mRNA (Vg-mRNA) im Dot-Blot/RNA-se-Protection-Assay (modifiziert nach Islinger et al. 1999a).

Diagnostics, Mannheim) im Kreislauf gespült. Im dritten Schritt wurde die Durchflussgeschwindigkeit für 15 min auf 7 ml / min erhöht, anschließend die Leber vom Stativ genommen und in eine Petrischale mit 10 ml Isolationsmedium überführt. Nach Entfernen der Gallenblase wurde die Leber mit einer sterilen Rasierklinge angeschnitten und die Hepatocyten mit einem Glasstab vereinzelt. Die entstandene Zellsuspension wurde in einer Filterglocke zunächst über ein 200 µm- und anschließend über ein 70 µm-Nylongazenetz gefiltert. Dabei wurde mit jeweils 5 ml Isolationsmedium nachgespült. Danach wurde das Filtrat gleichmäßig auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Kirchheim) verteilt und für 7 min bei 110 g und 14 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets erneut in insgesamt 25 ml Isolationsmedium resuspendiert. Die Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt und die Zellen schließlich in 100 ml Kulturmedium mit 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Die Zelldichte wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer auf 1 - 2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt, in 24-Well-Platten (Greiner) pipettiert und bei 14 °C kultiviert.

Medien zur Isolation und Kultur von Primärhepatoycten

Präperfusionsmedium: 9,55 g Dulbecco´s PBS (Sigma, Deisenhofen), 2 g $NaHCO_3$ (Sigma), 0,55 g EDTA (Sigma) in 1 L Aqua bidest., pH 7,5. Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter (Schleicher & Schuell, Dassel).

Kulturmedium: 10,9 g Medium M 199 modified (ohne Phenolrot, $NaHCO_3$, L-Glutamin, Sigma), 4,8 g/L Hepes (Na-frei, Sigma), 0,35 g/L $NaHCO_3$ (Sigma), 0,1 g/L L-Glutamin (Sigma) 1 % Streptomycin/Penicillin (10.000 µg/ml / 10.000 E/ml, Sigma) in 1 L Aqua bidest., pH 7,4. Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter (Schleicher & Schuell).

Perfusionsmedium: 14 mg Collagenase H (aus *Chlostridium histolyticum*, Roche Diagnostics, Mannheim) in 10 ml Kulturmedium ohne Antibiotika vorlösen, sterilfiltrieren und mit sterilem Kulturmedium auf 70 ml auffüllen.

Behandlung der Umweltproben und Exposition der Primärhepatocyten

Abwasserproben. Die tiefgefrorenen Abwasserproben wurden im Wasserbad bei 20 °C aufgetaut, mittels 0,2 µm Sterilfilter (Polycarbonat, Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltriert und 4:1 mit 5fach konzentriertem Kulturmedium M199 ohne Phenolrot (Sigma, Deisenhofen) verdünnt. Die Primärhepatocyten wurden mit einer Abwasserendkonzentration von 1:2 in den Wells für 96 h bei 18 °C belastet. Als Lösungsvermittler enthielt das Kulturmedium Dimethylsulfoxid (DMSO; Endkonzentration in den Wells: 0,15 %). Nach 2 Tagen wurde 1 ml des Mediums aus den Wells durch frisches Schadstoffmedium ersetzt.

Sediment-, Schwebstoff-, und XAD-Wasserextrakte. Die NOEC-Konzentrationen des akuten Zelltests (und ggf. die weiteren Verdünnungsstufen) wurden durch direkte Zugabe der in DMSO rückgelösten Extrakte in das Kulturmedium hergestellt. Mit reinem DMSO wurde die DMSO-Endkonzentration in den Wells auf 0,15 % ergänzt. Die Exposition erfolgte im ersten Abschnitt dieser Studie (XAD-Wasser- und Sedimentextrakte) bei 14 °C über 96 Stunden. Aufgrund einer erfolgreichen Testoptimierung von Islinger et al. (1999b) und Pawlowski (1998) wurde im zweiten Abschnitt dieser Studie die Inkubationsdauer von 96 h auf 48 h verkürzt und die Inkubationstemperatur auf 18 °C erhöht (Testvereinfachung bei vergleichbarer Sensitivität).

Porenwässer. Die tiefgefrorenen Abwasserproben wurden im Wasserbad bei 20 °C aufgetaut und die NOEC-Konzentrationen des akuten Zelltests (Verdünnung in Aqua bidest.) im unfiltrierten Zustand, ohne die Zugabe von Dimethylsulfoxid über 48 Stunden analog zu den Abwasserproben exponiert.

Kontrollansätze. Als Kontrolle wurden die Hepatocyten mit reinem Medium und bei den Extrakten und Abwasserproben mit 0,15 % DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) inkubiert. Als Positivkontrolle und interner Standard für die Induktion der Vitellogenin-mRNA wurde 0,1 und 1 nM 17ß-Estradiol verwendet, wodurch das unterschiedliche Reaktionsvermögen der Zellen verschiedener Spendertiere relativiert werden konnte. Bei einer Inkubationszeit von 96 h erfolgte auch bei diesen Ansätzen nach 2 Tagen ein Medienwechsel.

Zellernte. Nach Abschluss der Expositionszeit wurden die Zellen geerntet, entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Isolation der Gesamt-RNA aus den Primärhepatocyten

Zum Schutz vor RNAse-Kontaminationen wurden Handschuhe getragen; alle Arbeitsschritte fanden unter der Sterilwerkbank statt. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Sie basiert auf einer Adsorptionschromatographie der RNA-Moleküle an Silica-Gel-Säulen unter Hochsalzbedingungen. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der RNA durch Aqua bidest. Es handelt sich hierbei um ein schnelles und einfaches Verfahren zur Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.

Das Zellkulturmedium wurde bis auf ca. 250 µl über dem Zellrasen abgezogen und ggf. für die Messung der LDH eingesetzt (Abschnitt 2.6.1), die Zellen wurden mit dem verbleibenden Medium vorsichtig vom Untergrund abgespült, in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Kühlzentrifuge (Biofuge 17 RS, Heraeus, Hanau) bei 15 °C und 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 600 µl Lysepuffer zugefügt (Zelllyse durch die stark denaturierenden Reagenzien Guanidinium-Isothiocyanat (GITC) und ß-Mercaptoethanol, Inaktivierung der zellulären RNAse), und die Zellen wurden mittels einer Pipette resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde in Shredder-Säulen überführt und durch 2 min Zentrifugation bei 14.000 g (Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg) homogenisiert. Zum Homogenat wurden 600 µl 70 % Ethanol in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser zugefügt. Nach Durchmischung wurden 600 µl in Chromatographie-Säulen überführt. Die Säulen wurden bei 10.000 g für 25 s zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Zentrifugation wurde mit dem restlichen Homogenat wiederholt. Jeweils 700 µl RW1-Puffer wurden auf die Säulen gegeben und diese wurde zum Waschen der Silica-Gel-Membran bei 10.000 g für 25 s zentrifugiert. Nach Überführen der Säule auf ein frisches Sammelröhrchen erfolgten ein Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer und 25 sec Zentrifugation bei 10.000 g. Das Eluat wurde verworfen und das Sammelröhrchen wiederverwendet. Nach einem weiteren Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer wurden die Sammelröhrchen bei 20.000 g für 2 min bis zur Trockenheit zentrifugiert. Die Säulen wurden auf frische, sterile Zentrifugenröhrchen gegeben, 20-30 µl RNAse-freies Wasser wurden auf die Membranen pipettiert und die RNA durch 1 min Zentrifugation bei 10.000 g eluiert. 1 µl des Eluats wurde für die RNA-Konzentrationsbestimmung 1:50 in DEPC-Wasser verdünnt; die Proben wurden bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben

Die Konzentration der gelösten Gesamt-RNA und DNA wurde mittels eines Spektralphotometers (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA beziehungsweise 50 µg/ml DNA im Doppelstrang. Zur Abschätzung des Reinheitsgrades der Proben wurde das Verhältnis der Absorption zwischen 260 nm und 280 nm (OD_{260}/ OD_{280}) herangezogen. Reine RNA- und DNA-Lösungen besitzen ein OD_{260}/OD_{280}-Verhältnis von 2,0 bzw. 1,8:1 (Ibelgaufts 1990). Bei Kontamination mit Proteinen oder Phenolen liegt dieses Verhältnis deutlich unter den angegebenen Werten, und eine exakte Quantifizierung der Nucleinsäure-Menge ist dann nur näherungsweise möglich.

Überprüfung der Intaktheit der isolierten RNA

Die Gesamt-RNA einer Zelle besteht typischerweise zu 80 bis 85 % aus ribosomaler RNA. Zur Überprüfung der Intaktheit der Gesamt-RNA wurde daher stellvertretend die Intaktheit der ribosomalen RNA im Agarose-Gel untersucht. Durch ihren hohen Anteil an der Gesamt-RNA und ihrer Größe können die 28 S und 18 S rRNAs als Banden im Agarose-Gel nachgewiesen werden, während die anderen RNA-Arten kaum in Erscheinung treten.

Probenvorbereitung. Die Proben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert und nach folgendem Schema in Zentrifugenröhrchen vorbereitet und verdünnt, so dass bei der Elektrophorese die Gesamt-RNA pro Geltasche 2 µg betrug:

	10 µl	Deionisiertes Formamid
+	3,5 µl	Formaldehyd 37 %
+	2 µl	5 × MOPS
+	x µl	Probe
+	Y µl	DEPC-H_2O
	20 µl	Gesamtvolumen

Die Zentrifugenröhrchen wurden für 15 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Zu jedem Ansatz wurden 4 µl Gel-Loading Buffer und 1 µl 1:10 verdünntes Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) hinzugegeben. 20 µl Lösung wurden in jede Geltasche überführt.

Gelpräparation. Pro Gel wurden 0,4 g Normal Melting Agarose in 100 ml Erlenmeyer-Kolben einge-

wogen und 25 ml DEPC-H_2O mit einer sterilen Glaspipette zugefügt. Durch mehrmaliges kurzes Aufkochen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst und anschließend das verdampfte Wasser ergänzt. Nach Abkühlen auf etwa 65 °C wurden 8 ml 5-fach konzentrierte MOPS und 7 ml Formalin zugesetzt. Nach Aushärten der Gele erfolgte die Elektrophorese der vorbereiteten Proben mit 1 × MOPS als Laufpuffer bei 70 V für 1,5 bis 2 Stunden.

Nachweis der Vitellogenin-mRNA im Dot Blot/-RNAse Protection Assay

Probenimmobilisierung. Die Gesamt-RNA wurde mit DEPC-H_2O auf mindestens 1 µg/µl verdünnt (bis zu 0,025 µg/µl möglich) und 1 µl dieser RNA-Lösung mit drei Replika auf eine Qiabrane Nylon Plus-Membran (Qiagen, Hilden) zum Eintrocknen aufgetropft. Zusätzlich wurde ein Vitellogenin-mRNA-Standard (von Herrn Dipl. Biol. M. Islinger freundlicherweise zur Verfügung gestellt) mit den Konzentrationen 0,12 bis 500 pg/µl in 1:2 Verdünnungsschritten auf die Nylon-Membran aufgetragen. Das Fixieren der aufgetragenen RNA an die Membran erfolgte durch beidseitiges UV-Crosslinking mit jeweils 126 mJ (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg).

Prähybridisierung. Jeweils eine Membran wurde in ein autoklaviertes Glasröhrchen oder steriles 50 ml PE-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und mit 10 ml vorgewärmtem Prähybridisierungspuffer für 2 Stunden bei 68 °C im Hybridisierungsofen (Hybridiser HD-1D, GFL, Wertheim) inkubiert.

Hybridisierung. Nach Dekantieren des Prähybridisierungspuffers wurde dieser durch 10 ml Hybridisierungspuffer ersetzt. 2,5 µl cRNA-Sonde (100 ng Sonde / ml Hybridisierungspuffer, von Herrn Dipl. Biol. Islinger freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden in 100 µl TE Puffer verdünnt und zur Linearisierung 5 min im Heizblock bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurde die verdünnte Sonde in die Zentrifugenröhrchen mit den prähybridisierten Blots überführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C in einem Hybridisierungsofen.

RNAse-Verdau. Die unspezifischen, einzelsträngigen RNA-Bestandteile, an die keine cRNA-Sonde gebunden hatte, wurden mittels Einzelstrang-spezifischer RNAse A (Roche Diagnostics, Mannheim) abgebaut. Dazu wurde nach Dekantieren des Hybridisierungspuffers die Membran zunächst 2 x 5 min in 10 ml 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und anschließend 3 x 10 min bei 68 °C in 10 ml 0,1 x SSC/0,1 % SDS im Hybridisierungsofen bei 68 °C gewaschen. Danach wurde die Nylonmembran in eine Schale überführt und 10 min mit 30 ml Puffer R auf einem Horizontalschüttler (GFL, Burgwedel) mit 70 Upm inkubiert. Nach Abkippen des Puffers wurde dieser durch 30 ml Puffer R + RNAse A (Konzentration 8 µg/µl zum Gebrauch: 1,25 µl/10 ml Puffer R) ersetzt und für weitere 10 min auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die RNAse-haltige Lösung dekantiert und der Blot zweimal mit 30 ml Puffer R für jeweils 10 min gewaschen.

Antikörper-Detektion. Zunächst wurde jede Membran 30 min mit 15 ml 2xSSC/0,1 % SDS und im Anschluss 1 min in 30 ml Maleatpuffer gewaschen. Nach 30 min Inkubation in 30 ml 1% Blocking Reagenz (Roche Diagnostics) erfolgte das Binden des Antikörpers (Anti-DIG-AP, Roche Diagnostics, Mannheim; 3 µl DIG-AP / 30 ml Blocking Puffer) für 30 min. Nach zwei weiteren Waschschritten zu 15 min in Maleatpuffer wurde die Nylonmembran für 1 min in einer 1:1 Mischung aus Lösung 1 + Lösung 2 vorinkubiert. Die Nylonmembran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und 5 min mit 2 ml Chemilumineszenzlösung (1980 µl Lsg. 1 + Lsg. 2 + 20 µl CDP-STAR, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Nach Entfernen der Lösung und einer weiteren Inkubation über 10-15 min wurde die Chemilumineszenz in einer Dunkelkammer durch Auflegen der Membran auf einem Film (Kodak-BioMax ML Light, Sigma, Deisenhofen) mit Belichtungszeiten von 30 Sekunden bis 60 Minuten nachgewiesen.

Auswertung der Blots

Die entwickelten Negative wurden eingescannt und die Intensitäten der Dots mittels der Software E.a.s.y Win 32 (Herolab, Wiesloch) densitometrisch quantifiziert. Nachdem die Rohdaten in Microsoft Excel 7.0 importiert wurden, erfolgte die Auswertung, indem die Intensität der Dots von Kontrollen, Positivkontrollen und Proben mit einer Eichkurve verglichen wurde, die auf Basis der Dots des mitgeführten Vitellogenin-Standards kalibriert wurde. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der berechneten Vitellogeninkonzentrationen wurden graphisch als Absolutwerte (in pg Vitellogenin mRNA pro µg Gesamt-RNA) oder (analog zu TCDD-Äquivalenten von EROD-Analysen, Abschnitt 2.6.6) in Relation der mitgeführten Positivkontrolle 17ß-Estradiol dargestellt.

Reagenzien und Lösungen

DEPC-H_2O: 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat; Sigma, Deisenhofen) in 1 L Aqua bidest. für mehrere Stunden rühren, dann autoklavieren.

Maleatpuffer: 0,1 M Maleinsäure (Roth, Karlsruhe), 0,15 M NaCl in DEPC-Wasser, mit NaOH den pH auf 7,5 einstellen, über Nacht rühren, autoklavieren.

Blockingpuffer: 10 g Blockingreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) mit Maleatpuffer auf 100 ml auffüllen, unter Rühren erhitzen (nicht kochen), autoklavieren.
20 x SSC-Puffer: 3 M NaCl (Baker, Groß Gerau), 0,3 M Natriumcitrat (Baker) in DEPC-Wasser, pH auf 7,0 einstellen, autoklavieren.
Hybridisierungspuffer (10 ml): 2,5 ml 20 x SSC, 5 ml deionisiertes Formamid (Sigma, Deisenhofen), 100 µl 10 % Na-Laurylsarcosinat (Sigma), 20 µl 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Baker), 2 ml 10 % Blockreagenz.
TE-Puffer: 10 mM Tris-(Hydroxymethylaminomethan, Roth) und 1 mM EDTA mit DEPC-Wasser auf 1 L auffüllen, pH 7,4 einstellen, autoklavieren.
Puffer R: 10 mM Tris, 0,3 M NaCl (Merck), 5 mM EDTA (Ethylenediamin-tetraessigsäure Na-Salz, Roth) mit DEPC-Wasser auf 1 L auffüllen, pH 7,5 einstellen, autoklavieren.
Lösung 1: 200 mM Tris, 800 mM NaCl in DEPC-Wasser, pH 9,5 einstellen, autoklavieren.
Lösung 2: 100 mM $MgCl*6H_2O$ (Merck) in DEPC-Wasser, autoklavieren.

2.6.6 Induktion von Cytochrom P450 in Hühnerleberkultur

Die katalytische Aktivität von Cytochrom P4501A in embryonaler Hühnerleberkultur wurde fluorimetrisch als Aktivität des Biotransformationsenzymes Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) quantifiziert (Brunström et al. 1992). Dabei wird die Umsetzung des künstlichen Substrates 7- Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin bestimmt. Dieser Bioassay wurde während eines sechswöchigen Aufenthalts am Department of Environmental Toxicology, Evolutionary Biology Centre, University of Uppsala in Schweden, unter Anleitung von Herrn Dr. Magnus Engwall und Herrn Dr. Björn Brunström durchgeführt.

Durchführung
Abb. 2.11 gibt einen Überblick über das Prinzip dieses Bioassays: Befruchtete Hühnereier (Ova Production AB, Morgongåva, Schweden) wurden acht Tage im Brutschrank bei 37,5 ± 0,5 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % mit 4 Umdrehungen am Tag inkubiert. Die Eier wurden durchleuchtet, um die toten und schlecht entwickelten Embryonen zu identifizieren, die im Assay nicht eingesetzt werden. Die Eier wurden mit einer Pinzette eröffnet und die Embryonen für den Bioassay herauspräpariert. Die Lebern wurde nach Brunström et al. (1995) aus den Embryos isoliert und jeweils 6 Lebern pro Konzentration in ein Glasgefäß überführt, das 3 ml RPMI 1640-Medium (HyClone Europe Company, Cramlington, GB) enthielt (supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA), 2 mM L-Glutamin (Sigma), 5 mM Hepes und 10 % hitzedeaktiviertem Fötalen Kälberserum (56 °C für 30 min, ICN Biomedicals, Costa Mesa, Kanada)).
Proben. Neben den auch in den anderen Bioassays eingesetzten acetonischen Gesamtextrakten wurden im EROD-Assay Extrakte untersucht, die zuvor mittels Silica-Gel (aktiviert bei 500 °C und deaktiviert mit 10 % w/w Wasser) aufgereinigt wurden (Entfernung der polaren Substanzen). Die in Aceton gelösten Extrakte wurden dazu auf eine Säule aufgezogen, mit 225 ml *n*-Hexan und 210 ml Dichlormethan (Fisons, Loughborough, GB) eluiert sowie am Rotationsverdampfer (37-40 °C, 600-800 mbar) und unter Evaporation mit Stickstoff fast bis zur Trockene eingeengt.
Exposition. Die in DMSO rückgelösten Extrakte wurden in RPMI 1640-Medium verdünnt. Als Kontrolle wurde unverdünntes Medium, als Positivkontrolle 1 x 10^{-9} M 2,3,7,8-TCDD (Reinheit 98,2 %, Accustandard Inc., New Heaven, USA) in RPMI 1640-Medium eingesetzt. Die DMSO-Konzentration wurde in allen Ansätzen mit reinem DMSO (Sigma, St. Louis, USA) auf 0,3 % (v/v) eingestellt. Die Ansätze wurden für 48 h bei 37 °C mit 20 Umdrehungen pro Stunde, unter einer Atmosphäre von 95 % Luft, 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75-80 % inkubiert.
EROD-Assay. Nach einer Expositionsdauer von 48 h wurde jede Leber in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen

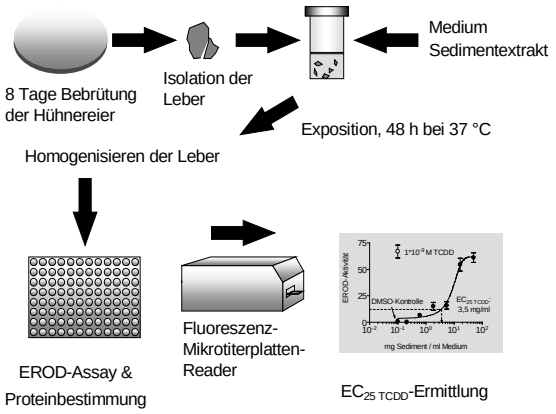


Abb. 2.11. Schema des EROD-Assays zum Nachweis dioxin-ähnlicher Wirksamkeit mittels embryonaler Hühnerleberkultur (ergänzt nach Engwall).

(Eppendorf) mit 1 ml eiskaltem 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,8) überführt und für 1,5 - 2 sec homogenisiert (IKA T8 Homogenizer, IKA, Staufen). Der EROD-Assay wurde nach Brunström & Halldin (1998) in einer an 96-Well-Mikrotiterplatten adaptierten Methode von Brunström et al. (1992) durchgeführt. Eine ausführliche Arbeitsanleitung ist bei Halldin (1996) dargestellt. Ein Reaktionsmix wurde hergestellt aus 225 ml 0,15 mM Tris HCl, pH 7,9, 50 ml 30 mM $MgCl_2$, 50 ml 16 mg/ml BSA (Bovine Albumine Serum, Sigma, St. Louis, USA) und 50 ml 3,6 mM NADPH (Sigma). 20 µl Homogenat wurden in jede Kavität einer auf Eis gekühlten Mikrotiterplatte (White FluoroNunc™, Nalge Nunc International, Dänemark) überführt, in die Standardwells wurde ebenfalls Homogenat pipettiert. Nach Zugabe von 75 µl Reaktionsmix in jedes Well wurde die Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplatteninkubator (iEMS, Labsystems, Schweden) 5 min bei 37 °C mit 100 rpm inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 0,5 µM 7-Ethoxyresorufin (Verdünnung von 20 µl einer tiefgekühlten 1 mM Stammlösung in DMSO mit 40 µl Methanol und 3,94 ml 0,15 mM Tris-HCl, pH 7,6) in die mit Proben gefüllten Kavitäten wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubation von 10 min mit 37 °C und 150 rpm wurde die Reaktion durch die Zugabe von Methanol (Ausfällen der Proteine) gestoppt. Zu den Resorufin-Standardwells wurden 0, 50, 100 und 200 nM Resorufin in Methanol und 20 µl 0,5 µM 7-Ethoxyresorufin pipettiert. Nach Stoppen der Reaktion wurde die Platte für weitere 10 min bei 37 °C (ohne Schütteln) inkubiert, um eine vollständige Präzipation der Proteine zu erreichen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emission von 590 nm im Fluoreszenzreader (SLT FLUOstar P, TECAN, Österreich) gemessen.

Proteinbestimmung. Der Proteingehalt wurde mit der bei Brunström & Halldin (1998) beschriebenen Methode in 96-Well-Mikrotiterplatten bestimmt, bei der die Reaktion von Fluorescamin (Sigma, St. Louis, USA) mit primären Aminogruppen der Proteine zu einem fluoreszierenden Produkt quantifiziert wird. 20 µl des Leberhomogenates wurden in jede Kavität einer Mikrotiterplatte überführt und mit 115 µl 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,8) verdünnt. Als Standards wurden jeweils 3 Replika mit 0, 100, 200, 300 µg/ml BSA in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer eingesetzt. 140 µl Fluorescamin (0,3 mg/ml Acetonitril) wurden zu jedem Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 390 nm und einer Emission von 460 nm im Fluoreszenzreader (SLT FLUOstar P, TECAN, Österreich) gemessen.

Auswertung. Die Fluoreszenzintensitäten der Resorufin- und BSA-Standards wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen, und mittels linearer Regressionen wurden die Gleichungen für die Bestimmung der jeweiligen Konzentrationen ermittelt. Die Normierung der EROD-Aktivität erfolgte auf die Proteinmenge in der Probe und wurde als pM gebildetes Resorufin/min und mg Leber angegeben. Die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Doppelmessungen wurden mittels der Software Prism 2.01 (GraphPad Inc., USA) gegen die entsprechenden Konzentrationen des 2,3,7,8-TCDDs bzw. des Extraktes aufgetragen und in einer sigmoid-logistischen Dosis-Wirkungskurve graphisch dargestellt. Neben dem EC_{50} wurde auch die $EC_{25\ TCDD}$-Äquivalentkonzentration berechnet: die Extraktkonzentration, bei der 25 % der maximalen EROD-Induktion durch die mitgeführte Positivkontrolle erreicht wurde (Engwall et al. 1997b, Engwall et al. 1998a). In dieser Studie wurde der $EC_{25\ TCDD}$ und nicht der oftmals genutzte $EC_{50\ TCDD}$ genutzt, da bei einigen Kontrollsedimenten kein $EC_{50\ TCDD}$ ermittelt werden konnte und zudem bei hohen Extraktkonzentrationen polychlorierte Naphtaline oder andere Substanzen die EROD-Induktion inhibieren und somit zu erniedrigten EROD-Aktivitäten und u-förmigen Dosiswirkungskurven führen können (Engwall 1995).

2.6.7 Fischeitest mit *Danio rerio*

Zum Nachweis toxischer und teratogener Effekte wurden Porenwässer, acetonische Extrakte und auch native Sedimentproben im Fischeitest und verlängerten Early-Life-Stage-Test untersucht. Als Prüforganismus dienen bei diesem Verfahren die Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*). Mit diesem Test

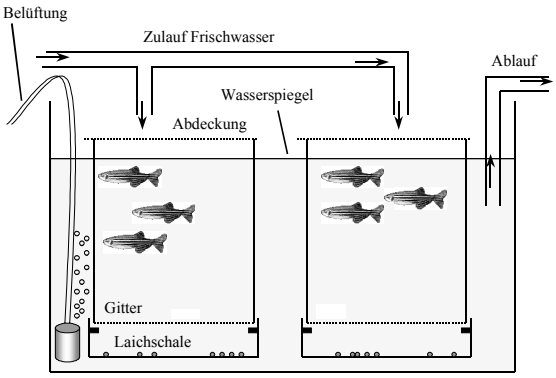


Abb. 2.12. Ablaichanlage mit Laicheinsätzen für die Gewinnung von Fischeiern von *Danio rerio*. Pro Zuchtbecken wurde eine Zuchtgruppe aus 1 Weibchen und 2 Männchen eingesetzt. Zur Laichstimulation wurden Plastikpflanzen eingesetzt. Konstruktion der Anlage: E. Leist.

lassen sich letale sowie subletale Effekte auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen bis 48 h (Embryotoxizitätstest, (Ensenbach 1999) und 144 h (Early-Life-Stage-Test, Ensenbach & Nagel 1995) erfassen.

Fische und Hälterung. Die adulten Zebrabärblinge (handelsübliche Fische) wurden bei 27 ± 1 °C in 150 L Aquarien gehalten, die durch motorbetriebene Innenfilter gereinigt und mit Druckluft belüftet wurden. Aus diesen Becken wurden Zuchtgruppen aus jeweils 4 männlichen und 2 weiblichen Zebrabärblingen zusammengestellt, die in 25 L-Becken gehalten wurden. Alle 2 Wochen wurde ein Drittel des Wassers abgelassen und gegen ein vorgefiltertes und belüftetes Gemisch von entmineralisiertem Wasser und Brauchwasser aus einem universitätseigenen Brunnen ersetzt. Die Tiere wurden mit dem Flockenfutter Tetra Min (Tetra Werke, Melle) und mit Nauplien von *Artemia salina* täglich vormittags und abends gefüttert. Mit Hilfe von Zeitschaltuhren wurde die Beleuchtungsdauer auf 14 h täglich eingestellt. Ein gestaffeltes Ein- bzw. Ausschalten der Lampen machte eine täglich halbstündige Dämmerungsphase am Morgen und Abend möglich. Am Tag vor der Testdurchführung wurden die Fische der Zuchtgruppen mehrmals mit lebenden *Artemia* gefüttert, und kurz vor der abendlichen Dämmerung wurden jeweils 1 weiblicher und 2 männliche Zebrabärblinge in einen Einsatz einer Ablaichanlage (Abb. 2.12) überführt. Die Ablaichanlage bestand aus zwei großen Glasaquarien, in denen jeweils fünf kleine Kunststoffaquarien mit den Maßen 26 x 16 x 16 cm und einem Fassungsvermögen von 6,5 Litern Platz fanden. Die Wände dieser Kunststoffaquarien waren bis auf die Vorderseite mit schwarzem Silikon bestrichen, um die Sicht der Fische in die benachbarten Aquarien zu verhindern. Der Kunststoffboden wurde entfernt und durch ein Edelstahlgitter mit der Maschenweite von 1,25 mm ersetzt, um die Zebrabärblinge am Fressen des eigenen Laichs zu hindern. Unter diesen Kunststoffaquarien befanden sich gläserne Auffangschalen, deren Böden auf der Außenseite ebenfalls mit schwarzem Silikon bestrichen waren, damit die hellen Eier bei der Entnahme besser sichtbar waren. Das Wasser wurde durch eine Bodenheizmatte auf 27-28 °C temperiert und ein Filter (Eheim, Deizisau) sorgte für eine ständige Wasserzirkulation, wobei die Ausströmöffnungen genau über den Kunststoffbecken lagen. In jedem Becken befand sich eine Laichkrautattrappe, z.B. grünes, fädiges Filtermaterial aus Kunststoff. Zu Beginn der Lichtphase am nächsten Morgen wurden nach Beendigung von Balz und Eiablage die Auffangschalen mit den Eiern entnommen und die Befruchtungsrate bestimmt. Ein Fischeitest wurde nur bei einer Befruchtungsrate über 50 % durchgeführt.

Fischeitest mit wässrigen Lösungen. Die Porenwässer wurden aufgetaut und unverdünnt, die acetonischen Extrakte nach Herstellung von Verdünnungsreihen mit rekonstituiertem Verdünnungswasser (ISO 7346/3) mit einer maximalen DMSO-Endkonzentration von 0,25 % im Fischeitest eingesetzt. Das Verdünnungswasser wurde aus jeweils 20 ml 0,02 M Calciumchlorid-2-Hydrat-, 5 mM Magnesium-7-Hydrat-, 7,5 mM Natriumhydrogencarbonat-, 0,37 mM Kaliumchlorid-Lösung und 1920 ml destilliertem Wasser am Vortag des Tests hergestellt und bei 27 °C unter Belüftung mit einem Sprudelstein bis zum Versuchsbeginn inkubiert. Tab. 2.12 zeigt die Wasserwerte des ISO-Verdünnungswassers (Rudolf 2000). Je Konzentration wurden 20 Fischeier einzeln mit jeweils 2 ml Testlösung in den Kavitäten einer 24-Well-Platte (Renner, Darmstadt) exponiert. In die verbleibenden 4 Wells wurde reines Verdünnungswasser und jeweils ein Fischei als Kontrolle überführt. Die Platten wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 27 ± 0,5 °C in einem Brutschrank mit einem Hell/Dunkelrhythmus von jeweils 12 h inkubiert. Nach 48 h wurde die Testlösungen erneuert. Die Untersuchung der Embryonen und Larven sowie die Protokollierung der Effekte erfolgte nach 24, 48, 72 und 96 h mit Hilfe eines Inversmikroskopes (CK 40, Olympus) mit einer 40- oder 63-fachen Vergrößerung. Tab. 2.13 zeigt die zu den jeweiligen Testzeitpunkten untersuchten Parameter und die Kriterien für die Bewertung der Befunde. Die Mortalität wurde in % angegeben und bezieht sich auf alle bei der jeweiligen Konzentration inkubierten Tiere. Im Gegensatz dazu wurden alle anderen Beobachtungen auf die zum Zeitpunkt der Beurteilung noch lebenden Tiere bezogen.

Tab. 2.12. Wasserwerte des ISO-Verdünnungswassers (aus Rudolf 2000).

Parameter	Wert
Temperatur	27 °C
pH-Wert	7,6
Gesamthärte	5 °dH
Leitfähigkeit	709 µS/L
Nitratkonzentration	< 0,0045 mg/L
Nitritkonzentration	< 0,008 mg/L
Ammoniumkonzentration	0,0019 mg/L
Phosphatkonzentration	< 0,05 mg/L
Eisenkonzentration	Nicht nachweisbar
Chemischer Sauerstoffbedarf	4,31 mg/L

Fischeitest mit nativen Sedimenten. Während bei anderen *In vitro*-Biotests die partikulär gebundenen Schadstoffe zunächst durch Extraktion oder Elution in eine wässrige Phase überführt werden müssen, kann beim Fischeitest mit *Danio rerio* auch natives Sediment untersucht werden. Dazu wurden von jedem untersuchten gefriergetrockneten Sediment 1:2-Verdünnungsreihen von 3 g bis zu 0,25 g Sediment in 6 Well-Platten (Renner, Darmstadt) eingewogen und die einzelnen Kavitäten mit ISO-Verdünnungswasser auf jeweils 8 g Gesamtgewicht aufgefüllt. Bei jedem Versuchsansatz wurden als Kontrollen ein Ansatz mit 8 ml ISO-Verdünnungswasser (ohne Sediment) und ein Ansatz mit 3 g Quarzmehl der Siebklasse W4 und 5 ml ISO-Verdünnungswasser (als unkontaminiertes Referenzsediment) untersucht. Pro Sedimentkonzentration bzw. Kontrolle wurden 25 Eier inkubiert und 24, 48, 72 und 144 Stunden nach Expositionsbeginn unter dem Inversmikroskop nach den Kriterien in Tab. 4 beurteilt. Die Entnahme der Eier erfolgte (bei einer starken seitlichen Beleuchtung) mit Hilfe einer Plastikpipette, deren Öffnung mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten war. Für die Beurteilung unter dem Inversmikroskop wurden die Eier bzw. Jungfische kurzfristig in eine Glasschale mit reinem, auf 27°C temperiertem ISO-Verdünnungswasser überführt. Beim Umsetzen der Fische wurde darauf geachtet, möglichst geringe Mengen ISO-Verdünnungswasser dem Inkubationsansatz zu entnehmen bzw. neu zuzugeben.

Tab. 2.13. Untersuchungsparameter und Bewertungskriterien für die Untersuchung von Embryonen und Fischlarven im Fischeitest mit *Danio rerio* (modifiziert nach Ensenbach 1999 und Rudolf 2000).

	24 h	48 h	72 h	96, 144 h
Augenanlage	○	○	○	○
Ohranlage	○	○	○	–
Somiten / Muskelsegmente	○	○	○	–
Schwanz abgelöst	○	●	●	–
Bewegungen	●	–	–	–
Pigmentzellen	–	○	○	○
Herzschlag	–	●	●	●
Blutkreislauf	–	○	○	○
Ödem	–	○	○	○
Schlupf	○	○	○	○
Kiemenbögen	–	–	–	○
Mundspalte offen	–	–	–	○
Wirbelsäulenverkrümmung	–	–	–	○
Gleichgewichtsstörungen	–	–	○	○
Gefüllte Schwimmblase	–	–	–	○
Flossenschlag	–	–	–	○
Öffnungen am Operculum	–	–	–	○
Koagulierter Keim	●	●	●	●

○ = Kriterium wird an diesem Tag beurteilt
– = Kriterium wird an diesem Tag nicht beurteilt
● = Kriterium entscheidet, ob das Tier als lebend eingestuft wird

2.7 Statistik und Bewertungstechniken

2.7.1 Mittelwertvergleiche

Mit Hilfe der Software SigmaStat™, Version 2.0, (Jandel-SPSS, Erkrath) wurde durch Mittelwertvergleiche überprüft, ob sich die empirisch ermittelten Daten statistisch signifikant von den Kontrollen unterschieden. Da bei biologischen Daten nicht *a priori* von einer Normalverteilung und Varianzhomogenität ausgegangen werden kann (Literaturübersicht bei Hollert und Braunbeck 1997), wurden die Daten gemäß Abb. 2.13 analysiert: Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Daten auf signifikantes Abweichen von der Normalverteilung überprüft ($p < 0,05$); auf Varianzhomogenität der Gruppenmittelwerte wurde mit $p < 0,05$ getestet. Erfüllten alle Daten die Anforderungen, wurden die Gruppen mit parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Sobald ein Datum der betreffenden Versuchsreihe entweder den Normalverteilungskriterien oder der homogenen Varianz nicht hinreichend genügte, wurden die Daten mit verteilungsfreien Tests analysiert. Bei allen Tests wurde auf die Nullhypothese: „die beiden Stichprobe entstammten aus der gleichen Grundgesamtheit, d. h. der Mittelwertunterschied ist rein zufällig zustande gekommen“ überprüft. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese: „die beiden Mittelwerte entstammten verschiedenen Grundgesamtheiten; d.h. die Versuchsgruppen unterschieden sich signifikant“ angenommen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde mit *, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit *** gekennzeichnet. Die nachfolgenden Tests wurden im Rahmen der Arbeit verwendet:

Parametrische Tests

t-Test nach Student für den Vergleich von zwei unabhängigen Daten. Mit dem t-Test nach Student wurde überprüft, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind annähernde Normalverteilung und

hohe Varianzhomogenität (Bühl & Zöfel 1995, Precht & Kraft 1992).

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, F-Test), mit nachfolgendem Post hoc-Test bei 3 und mehr unabhängigen Daten. Mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (F-Test) wurde bei 3 oder mehr unabhängigen Datengruppen überprüft, ob sich die einzelnen Gruppen signifikant unterscheiden. Bei einem Unterschied wurde in einem nachfolgenden Post hoc-Test überprüft welche Gruppen sich unterschieden; dabei können die Messgruppen entweder mit einer Kontrolle (Dunnett´s Test) oder paarweise miteinander (Student-Newman-Keuls-Test und Fischer´s Least Significance Difference [LSD]-Test) verglichen werden (Hartung 1991, Ingersoll 1995).

Nichtparametrische Tests

Rangsummentest (U-Test) nach Mann und Withney bei 2 unabhängigen Daten. Der auf dem Willcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierende Rangtest nach Mann und Withney ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungen (Sachs 1992). Die Voraussetzung für den U-Test sind zumindest ordinal skalierte Zahlenwerte (Ränge) und eine ähnliche bis gleiche Verteilungsfunktion (Sachs 1992); selbst wenn keine homomere Verteilung der Daten gewährleistet ist, reagiert der Test hauptsächlich auf Unterschiede der zentralen Tendenz (Bortz et al. 1990).

H-Test nach Kruskal und Wallis mit nachfolgendem Post hoc-Test bei 3 und mehr unabhängigen Daten. Mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis können mehr als drei unabhängige Datengruppen unter vollständiger Ausschöpfung der ordinalen Information der Daten (Ränge) analysiert werden. Dieses verteilungsfreie Analogon zur parametrischen ANOVA ist eine Verallgemeinerung des U-Tests von 2 auf k Datengruppen (Bortz et al. 1990). Bei einem signifikanten Unterschied der Gruppen wurde mit Post hoc-Verfahren überprüft, welche Gruppen sich signifikant unterschieden; dabei wurden die Messgruppen entweder mit einer Kontrolle (Dunn´s Test bei ungleicher Probenzahl; Dunnett´s Test bei gleichem n) oder paarweise (Tukey-Test) miteinander verglichen (Jandel-SPSS 1995, User´s Handbook SigmaStat™, Sachs 1993).

2.7.2 Korrelations- und Regressionsanalysen

Korrelationsanalysen

Um die Stärke der Zusammenhänge zwischen verschiedenen gemessenen Parametern, Endpunkten und Testsystemen zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen mit den Programmen SigmaStat™ und Statistica97™ (StatSoft Inc. Tulsa, USA) durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient r wurde dabei wie folgt interpretiert: $r < 0{,}2$ sehr geringe Korrelation; $0{,}2 < r < 0{,}5$ geringe Korrelation; $0{,}5 < r < 0{,}7$ mittlere Korrelation; $0{,}7 < r < 0{,}9$ hohe Korrelation; $0{,}9 < r < 1$ sehr hohe Korrelation (Bühl & Zöfel 1995). Bei intervallskalierten und normalverteilten Proben wurde die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson, bei ordinalskalierten und nicht normalverteilten Proben die Rangkorrelation nach Spearman verwendet, welche die Ränge der untersuchten Daten miteinander vergleicht (Bühl & Zöfel 1995, Sachs 1993). Letzteres Verfahren gilt zudem als robuster gegenüber Ausreißern (Sachs 1993). Precht und Kraft (1992) sowie Bühl und Zöfel (1995) weisen darauf hin, dass eine Korrelationsanalyse nur dann sinnvoll ist, wenn der Zusammenhang linear ist; für U-förmige Zusammenhänge tendiert r gegen 0.

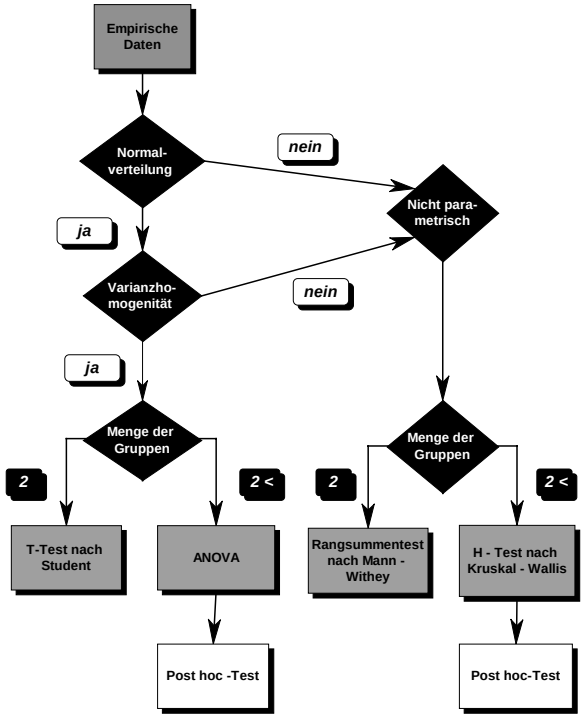


Abb. 2.13. Entscheidungsschema für die Auswahl des geeigneten Mittelwertvergleichs bei der Analyse der erhobenen Daten (modifiziert nach Barile 1994, Bortz et al. 1990, Sachs 1993).

Regressionsanalysen

Mittels Regressionsanalysen wurde die Art des Zusammenhangs zwischen 2 Variablen ermittelt (Hartung 1991). In dieser Studie wurden lineare, potenzielle und polynomische Regressionen mit den Programmen Excel (Version 7.0, Microsoft Inc.), Prism (Version 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) und SigmaPlot (Version 6.0, Jandel-SPSS, Er-

krath) berechnet. Bei linearen Regressionsanalysen wurde die Funktion und das Bestimmtheitsmaß (R^2) – als Maß für die Übereinstimmung der Funktion mit den Messwerten – sowie das 5- und 95%-Konfidenzintervall angegeben

2.7.3 Bewertung

Rangsummenbasierte Klassifikation

Gratzer & Ahlf (1999a) nutzten für eine erste vergleichende Bewertung von Sedimenten aus dem Hamburger Hafen ein Bewertungssystem mit Rangsummen, bei dem die Hemmungen aus einzelnen Biotests vier Toxizitätsklassen zugeordnet und die entsprechenden Klassenpunkte für alle durchgeführten Biotests summiert werden. Aus den Punktesummen wurden Ränge ermittelt. Diese Vorgehensweise wurde in einer leicht modifizierten Form auch in dieser Studie angewandt: Während in der Biotestbatterie von Gratzer & Ahlf (1999a) die Hemmungen direkt verglichen werden konnten, musste beim hier benutzten Ansatz (der akute Biotests und spezifische Biomarker, chemische Analysen und *In situ*-Daten kombiniert) zunächst eine Transformation der Daten in ein einheitliches System durchgeführt werden: Für die vergleichende Bewertung wurden die Befunde aller Untersuchungsparameter der Sedimentbewertungstriade von 12 Standorten in eine Skala mit 0 % für das geringste gemessenen Resultat und 100 % für das höchste transformiert (vgl. DelValls et al. 1998a). Die so erhaltenen Prozentwerte wurden mit Klassengrenzen eines Vielfachen von 20 einer fünfstufigen Güteklassenskala zugeordnet. Da bestimmte Parameter an einzelnen Probestandorten nicht erhoben werden konnten, wurden die einzelnen Werte der Güteklassen eines Standortes nicht im Sinne von Rangsummen addiert, sondern die Mediane der Güteklasse berechnet, um die ermittelten Daten zu einem einzigen Wert zu aggregieren. Ein solches Berechnen des Medians aus ordinal skalierten Daten ist nach Bühl und Zöfel (1995) zulässig.

Cluster- und Hauptkomponentenanalysen

Um innerhalb der Datensätze Ähnlichkeiten der untersuchten Proben zu erkennen wurden Clusteranalysen mit dem Programm Statistica97™ (StatSoft Inc. Tulsa, USA) durchgeführt. Als Datengrundlage wurden die in % der maximalen Ausprägung transformierten Rohdaten eingesetzt. Als Distanzmaß wurde die euklidische Entfernung eingesetzt, die Bildung der Cluster erfolgte nach der Complete Linkage Methode (Ahlf et al. 1991, Gratzer & Ahlf 1999a, Heise et al. 2000, Henschel et al. 1997a). Hauptkomponentenanalysen wurden zur Überprüfung auf Redundanz und zur Datenreduktion für eine vereinfachte Interpretation verwendet (Crane et al. 1997, DelValls et al. 1998a, d). Dazu wurden die transformierten Rohdaten (DelValls et al. 1998a) mit Statistica97™ einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Die Signifikanz der ermittelten Hauptkomponenten wurde graphisch mit dem Scree-Test überprüft. Die Rotation der Hauptkomponenten erfolgte orthogonal nach der Varimax-Methode (Liß 1997).

Fuzzy Logic-Expertensystem

Auf Basis der Befunde aus Rangsummen-basiertem Klassifikationssystem und Clusteranalyse wurde eine allgemeine Klassifikation formuliert (Abschnitt 5), die als Grundlage für ein Fuzzy-Expertensystem diente. Die Berechungen wurden mit dem Programm DataEngine (Version 3.1, MIT GmbH, Aachen) durchgeführt, dass auf Fuzzy-Technologie basiert und mit unscharfen Zahlenmengen operieren kann. Eine Einführung in regelbasierte Fuzzy Logic-Systeme und das Programm DataEngine geben Zimmermann et al. (1995). Ein regelbasiertes Fuzzy-Expertensystem für die Klassifikation von Sedimenten der Elbe wurde von Heise et al. (2000) vorgestellt.

Als Variablen gingen die in Prozent der maximalen Ausprägung transformierten Rohdaten des Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste (SAP), der Index CHE aus 27 chemischen und limnochemischen Parametern (Abschnitt 4.5) sowie der (bei den Berechnungen variierte) Index BIO aus Biotestergebnissen mit verschiedenen Expositionspfaden ein.

In einem regelbasierten System wurden die Ausprägungen der Variablen als linguistische Variablen mittels unscharfer Mengen definiert. Abb. 2.14 zeigt als Beispiel die unscharfe Menge „Testausprägung zwischen 20 und 40 %“. Diese Menge beinhaltet alle Werte zwischen 20 und 40 % mit einer vollständigen Zugehörigkeit (Zugehörigkeitsfunktion von 1), wogegen die Werte zwischen 10 und 20 % sowie 50 % und 40 % (mit einer jeweils ansteigenden Zugehörigkeit von 0 bis 1) teilweise dieser unscharfen Menge angehören. Die in Abb. 2.14 dargestellte Steigung der Zugehörigkeitsfunktionen wurde bei allen regelbasierten Fuzzy-Berechnungen der transformierten Rohdaten verwendet. Die erarbeitete ortsabhängige Klassifikation mit Ausprägungen der Variablen, Summen, Minima und Maxima (Abschnitt 5) wurde mit einem Regeleditor in Prämissen und Konklusionen („Wenn-dann-Regeln“) transformiert, die zur Berechnung der relativen Zugehörigkeit zu vier Güteklassen herangezogen wurden. Die unscharfe Zugehörigkeit zu den Gütefunktionen wurde mittels einer Ausgabedatei ausgegeben, und mit Hilfe einer weiteren Fuzzy-Regelbasis (Unscharfe Berechnung der Klasse mit der höchsten Zugehörigkeit) wurde eine Defuzzyfizierung in scharfe, eindeutige Güteklassen durch-

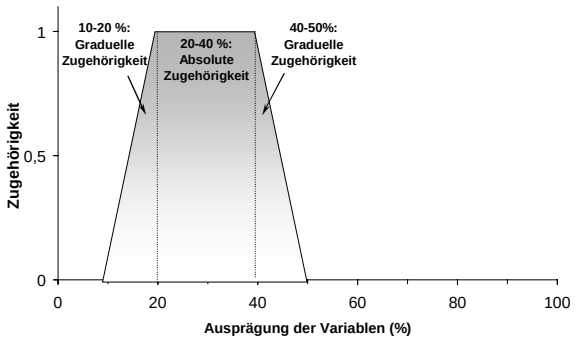


Abb. 2.14. Darstellung der unscharfen Menge aller Testausprägungen zwischen 20 und 40%. Während die Werte von 20-40 % vollständig (Zugehörigkeitsfunktion von 1) zu der Menge gehören, besitzen die Werte von 10-20% und 40-50 % graduelle Zugehörigkeiten zu dieser Menge (Zugehörigkeitsfunktionen zwischen 0 und 1).

geführt. Die Fuzzy-Berechnungen wurden mit folgenden Inferenzoperatoren durchgeführt: Aggregationsoperator: Minimum, Implikationsoperator: Algebraisches Produkt, Akkumulationsoperator: Algebraische Summe (Heise et al. 2000).

Hasse-Diagramm-Technik

Für eine visualisierende Bewertung der Standorte der Sedimenttriade wurde die Hasse-Diagramm-Technik (HDT) eingesetzt, die auf der Theorie der partiellen Mengen beruht und von Halfon & Reggiani (1986) in den Umweltwissenschaften eingeführt wurde. Eine detaillierte Übersicht über verwendete Begriffe und Anwendungen der HDT geben Brüggemann & Steinberg (2000). Mittels der HDT kann eine übersichtliche ordinale Anordnung der untersuchten Probestandorten nach steigender Belastung bezüglich aller untersuchten Parametern dargestellt werden (Brüggemann et al. 1994, Brüggemann & Steinberg 1995, Brüggemann & Steinberg 2000). Im Gegensatz zu Rangsummen-basierten Bewertungssystemen werden die Belastungsmuster der einzelnen Standorte bei den Hasse-Berechnungen berücksichtigt. Die Ergebnisse aller untersuchten Parameter werden zu sogenannten Tupeln (Oberbegriff für ein Paar, ein Tripel, ein Quadrupel von Zahlen, usw.) zusammengefasst und jedem Probenstandort zugeordnet. Ein Tupel kann als der Vektor der ermittelten Parameter eines untersuchten Probenortes aufgefasst werden. Die einzelnen Tupel werden mit einer ≤-Relation angeordnet: Somit ist ein Tupel A ≤ einem Tupel B, wenn alle Elemente von A kleiner oder gleich den entsprechenden Parametern von B sind. Wenn folgende Bedingungen für zwei zu vergleichende Tupel erfüllt sind, sind die Probenstandorte vergleichbar und können durch Linien verbunden werden: (1) Reflexivität: z.B. A ≤ A, (2) Antisymmetrie: wenn A ≤ B und B ≤ A dann muss A = B sein und (3) Transitivität: wenn A ≤ B und B ≤ C dann muss A ≤ C sein. Gilt die ≤-Relation nicht für alle Parameter, sind die Tupel widersprüchlich oder nicht vergleichbar und werden nicht verbunden. Während bei zwei untersuchten Parametern jedes Objekt mit jedem vergleichbar ist (lineare Ordnung), resultiert aus einer größeren Anzahl von Tupeln in der Regel eine Unvergleichbarkeit bei einigen Standorten (partielle Ordnung). Hasse-Diagramme stellen eine Möglichkeit dar, solche partielle Ordnungen zu visualisieren (Abb.2.15).

Für die Anwendung der HDT wurden folgende Konventionen getroffen:

- Das Hasse-Diagramm darf nur in eine Richtung gelesen werden. Standorte, die unter Berücksichtigung aller Testparameter vergleichbar sind, wurden mit Linien verbunden. Das Schädigungspotenzial der Standorte nimmt im Diagramm von unten nach oben zu. Die Verbindung von Standorten, direkt oder indirekt über andere Standorte, zeigt somit an, dass Standorte unter Berücksichtigung aller Testparameter als toxischer klassifiziert wurden.
- Eine vertikale Ausprägung des Hasse-Diagramms in einzelne Ebenen entspricht daher verschiedenen Belastungsklassen.
- Eine horizontale Einteilung verschiedener Standorte auf einem Niveau entspricht einer bezüglich des Rankings identischen Belastungsklasse, wobei die einzelnen Standorte in ihren Toxizitätsmustern nicht vergleichbar sind.
- Standorte, bei denen sich die Tupel aller Test-

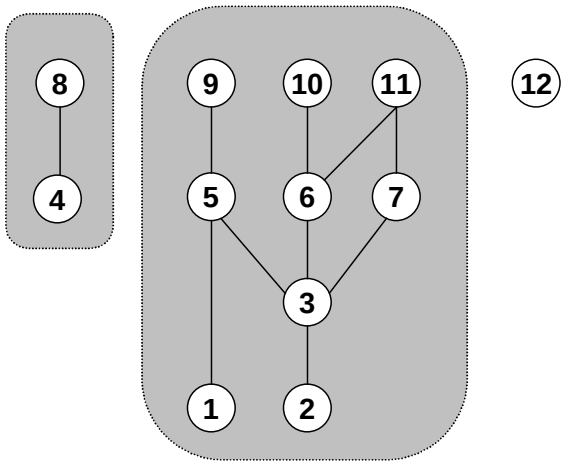


Abb. 2.15. Fiktives Hasse-Diagramm, um bestimmte Begriffsbildungen zu demonstrieren (modifiziert nach Brüggemann & Steinberg 2000). Die Objekte 1, 2, 4 stellen minimale Objekte dar. 8, 9, 10 und 11 sind maximale Objekte, 12 ist ein isoliertes Objekt. 4 und 8 sowie 2, 3, 6 und 10 sind Beispiele für Ketten nach oben hin zunehmender Belastung.

ausprägungen gleichen, stellen sogenannte Äquivalenzklassen dar. Sie besitzen identische Belastungsklassen und Toxizitätsmuster.

- Standorte, die unter Beachtung aller Parameter mit keinem anderen Standort vergleichbar sind (sogenannte isolierte Elemente), dürfen mit keinem weiteren Standort verbunden werden und können in die höchste oder geringste Belastungsstufe eingeordnet werden. In dieser Studie wurden sie aus Konservativitätsgründen in die Klasse mit der höchsten Belastung eingestuft.

Die Berechnungen der Hasse-Diagramme wurden mit dem Programm Hasse for Windows (Version 1.02, GetSynapsed GmbH, München) durchgeführt, das freundlicherweise von Herrn Dr. Brüggemann (IGB, Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden die nicht transformierten Rohdaten als Informationsbasis für die HDT eingesetzt. Eine Reduktion der Informationsbasis wurde durch systematischen Ausschluss verschiedener Fälle durchgeführt. Bei einer Verwendung der Rohdaten werden die Objekte des Hasse-Diagramms aufgrund eines Rankings verrechnet, bei dem auch statistisch nicht signifikante Unterschiede der Merkmalsausprägungen einfließen. Hasse-Diagramme aus Rohdaten können daher sehr komplex und unübersichtlich werden.

Da bei Bewertungsfragen nicht jeder beliebig kleine Unterschied in den Merkmalsausprägungen von Bedeutung sein muss, können zur Vereinfachung der Hasse-Diagramme klassifizierte Daten eingesetzt werden. Für eine Klassifizierung können Klassenbildung (Gratzer & Ahlf 1999a, Liß & Ahlf 1997) oder die Clustermittelpunkte einer Clusteranalyse (Brüggemann et al. 1998, Pudenz et al. 2000) benutzt werden. In dieser Studie wurde dazu eine äquidistante Zweier-Klassifikation (aus der ein Boolean-Hasse-Diagramm resultiert), der p-Algorithmus und eine unscharfen Fuzzy-Clusterung eingesetzt (Brüggemann et al. 1998). Während bei scharfen Clusteranalysen die Werte eindeutig einem Cluster zugeordnet werden müssen und somit die Einordnung von hybriden Objekten (solchen die zwischen mehreren Clustern liegen) oder Ausreißern nicht möglich ist, können bei der Verwendung von Fuzzy-Clusteranalysen Objekte auch mehreren Clustern zugeordnet werden (Friedrich et al. 1996). Um eine unterschiedliche Gewichtung der Daten aufgrund von Maßstabsunterschieden zu vermeiden, wurden die Daten zunächst z-transformiert (Pudenz et al. 2000). Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm ECO-FUCS des Instituts für Ökosystemforschung der Universität Kiel mit der bei Pudenz et al. (2000) dargestellten Methode durchgeführt. Als Schwellenwert (MFZ) für die Fuzzy-Clusterung wurde 0,7 gewählt.

3 Die eingesetzte Biotestbatterie

Die in dieser Studie eingesetzte Biotestbatterie basiert auf einer Biotestkombination aus hierarchisch hintereinandergeschalteten Teststufen von Fischzellkulturen (Hollert & Braunbeck 1997, Braunbeck 1993, 1994), die im Rahmen früherer Forschungsvorhaben unter Förderung des „Projektes Angewandte Ökologie“ der LfU Baden-Württemberg entwickelt wurde. Mit Hilfe dieses *In vitro*-Testsystems wurden in der Vergangenheit Monosubstanzen (öko)toxikologischer Relevanz (Braunbeck et al. 1995b), Deponiesickerwässer (Zahn et al. 1995) und Abwasserproben verschiedener Direkt- und Indirekteinleiter (Braunbeck et al. 1995a, 1997b, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1996) auf ihr toxikologisches Schädigungspotenzial überprüft. Die Biotestbatterie wurde zur Untersuchung partikulär-gebundener Schadstoffe in der Vergangenheit um den Ames-Test als Mutagenitätstest und den Comet-Assay als Genotoxizitätstest erweitert (Hollert & Braunbeck 1997) und für die Untersuchung von Sedimenten der Staustufen Lauffen und Heidelberg am Neckar, einer Neckarflachwasserzone (Braunbeck et al. 1995a) und von Sedimenten und Schwebstoffen eines stark kontaminierten Vorfluters aus den neuen Bundesländern (Hollert & Braunbeck 1997) sowie Hochwasserschwebstoffen eines mittleren Hochwasser am Neckar eingesetzt (Hollert et al. 1996). Da sich die Biotestkombination bei diesen Untersuchungen als sehr aussagekräftig und praktikabel erwies, wurde sie auch in diesem Promotionsprojekt eingesetzt. Um jedoch einer umfassenden Bewertung des Schädigungspotenzials verschiedener Umweltproben näher zu kommen (vgl. Abschnitt 1), wurde die Biotestkombination um akute *In vitro*-Toxizitätstests anderer trophischen Ebenen (etwa Bakterien) und Biotestverfahren zu spezifischeren Schadwirkungen (etwa endokrine und dioxin-ähnliche Wirksamkeit) erweitert. Eine Übersicht über die eingesetzten Verfahren geben Abb. 1.2 und Tab 1.1. In diesem Kapitel sollen kurz Vorzüge und Grenzen der eingesetzten Verfahren vorgestellt werden und beim Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* einige Aspekte der Etablierung des Tests an die Untersuchung von Extrakten dargestellt werden.

Akuter Cytotoxizitätstest. Eine allgemeine Übersicht über Vorzüge und Nachteile von akuten Cytotoxizitätstests mit permanenten Zelllinien geben Braunbeck et al. (1997a,b, 1995b), Segner (1998) sowie Segner & Lenz (1993). Die Befunde der Adaptation des akuten Zelltestes mit RTG-2-Zellen an die Untersuchung verschiedener Kompartimente von Fließgewässern und der Einfluß verschiedener Testparameter wie z.B. DMSO-Konzentration und Expositionsdauer sind bei Hollert & Braunbeck (1997) dargestellt.
Obwohl permanente Fischzelllinien in der Regel zwei bis drei Größenordnungen unempfindlicher reagieren als intakte Fische, konnte in vielen Fällen mit Korrelationskoeffizienten von 0,84 bis 0,97 (Segner 1998) eine gute bis sehr gut Übereinstimmung nachgewiesen werden, so dass sich bei vielen Chemikaliengruppen und auch bei der überwiegenden Mehrheit von Abwasserproben die Testsysteme das gleiche absolute Ranking bezüglich der Toxizität ergab. Während die Ergänzung bzw. Ersetzung des Fischtestes mit der Goldorfe (DIN 38 412) durch den akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen an der etwas geringeren Empfindlichkeit des Zelltests gescheitert ist (Miltenburger 1997), kann er durch die gute Korrelation für die Untersuchung von stärker toxischen Proben wie Sediment- und Wasserextrakten sowie Porenwässern empfohlen werden (Braunbeck et al. 1997b, Castano et al. 1996, 1994, Castano & Tarazona 1995, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a). Um die im Vergleich zum intakten Fisch geringere Biotransformationskapazität der RTG-2-Zellen auszugleichen, wurden in dieser Studie alle Zelltests mit und ohne Supplementierung mit S9-Mix aus mit ß-Naphthoflavon und Phenobarbital behandelten Ratten durchgeführt.

Fischeitest mit *Danio rerio*. Als eine weitere Alternative zu akuten Toxizitätstests mit Fischen werden schon seit längerem frühembryonale Lebensstadien als empfindliches Testsystem herangezogen. Nicht nur für die Untersuchung von Monosubstanzen (Bresch 1991, Ensenbach & Nagel 1995, Fent & Meier 1994, Goodman et al. 1985, Görge & Nagel 1990, Holcombe et al. 1982, Oulmi 1996, Wester-

lund et al. 2000, Wiegand et al. 2000), sondern auch von Wasserproben (Escher 1999, Krieger & Dietrich 1999, Luckenbach et al. 1999) und partikulär gebundenen Schadstoffen (Brack et al. 1998, Engwall 1995, Engwall et al. 1994, Ensenbach 1998, 1999, Murk et al. 1996, Zabel & Peterson 1996) wurden Embryotoxizitätstests erfolgreich eingesetzt. Für zahlreiche Substanzen ist bekannt, dass sie ihre toxische oder teratogene Wirkung nur in einer sensiblen Phase während der frühen Organentwicklung des Fischembryos entfalten. Da diese Differenzierungsprozesse bei Fischen in der Regel noch in der Eihülle stattfinden, können Schadstoffexposition und Beobachtungsperiode auf sehr frühe Entwicklungsstadien der Eier beschränkt werden, bei denen aufgrund der Entwicklung des Zentralen Nervensystems noch kein Schmerzempfinden vermutet werden kann (Nagel & Isberner 1998, Strmac 1999). Nach nationalem und EU-Tierschutzrecht gilt der Fischeitest mit *Danio rerio* über 48 h nicht als Tierversuch (Ensenbach 1999) und wurde aufgrund seiner hervorragenden Korrelation zu *In vivo*-Befunden als Ergänzungs- bzw. Ersatzmethode für den Fischtest nach der DIN 38412 vorgeschlagen (Lange et al. 1995), welcher nach dem Chemikalien- und Abwasserabgabengesetz derzeit noch zwingend für die Beurteilung von Wasserinhaltsstoffen und Abwässern vorgeschrieben ist. Während der Projektlaufzeit befand sich der Fischeitest mit *Danio rerio* auf Betreiben des Umweltbundesamtes in der Normierung durch einen DIN-Arbeitskreis (Nagel & Isberner 1998). Seit Februar 2001 liegt eine DIN-Norm (DIN 38415-6) für diesen Biotest vor.
Aus den oben genannten Gründe wurde der Fischeitest in dieser Studie zur Untersuchung der toxischen und teratogenen Wirkung komplexer Umweltproben eingesetzt, nicht zuletzt da es sich um ein Testsystem handelt, das eine hohe Übertragbarkeit und auch Relevanz für das Freiland erwarten lässt. Ein besonderer Vorteil des Fischeitests ist, dass er im Gegensatz zum Zelltest mit RTG-2-Zellen nicht nur mit wässrigen Umweltproben, sondern auch mit nativen Sedimenten durchgeführt werden kann (Ensenbach 1998, 1999).

Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis.* Der Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* bzw. *Bacillus cereus* stellt ein *In vitro*-Testverfahren dar, bei dem durch die kurze Generationszeit der Bakterien nicht nur akute, sondern auch chronische Toxizität untersucht werden kann (Liß 1997). Dieses Biotestverfahren wurde bereits mehrfach für die Untersuchung von nativen Sedimenten eingesetzt (Ahlf et al. 1997, Fretwurst et al. 1997, Gratzer & Ahlf 1999a, Heise et al. 2000, Henschel et al. 1997a, b, Liß 1997, Liß & Ahlf 1997, Rönnpagel et al. 1998, 1995) und befand sich während der Projektlaufzeit in einer DIN-Validierung (Gratzer & Ahlf 1999a). Der Bakterienkontakttest ist Bestandteil einer Testbatterie, die von Gratzer & Ahlf (1999a) im Rahmen eines UBA-Projektes zur Erarbeitung von Qualitätskriterien für Sedimente validiert wurde. Der Bakterienkontakttest

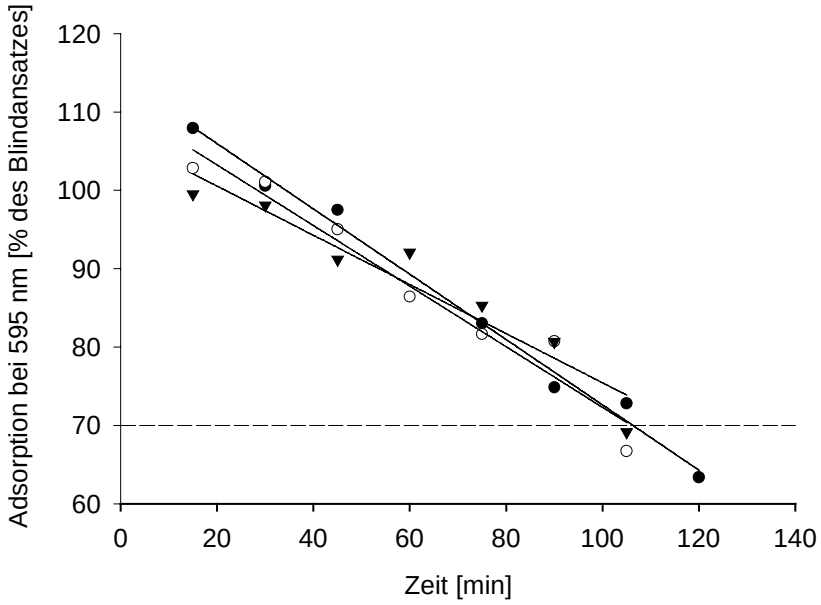


Abb. 3.1. Resazurinumsatz von *Arthrobacter globiformis* in 24-Well Mikrotiterplatten in drei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils 3 Replika; Datengrundlage: Winn (1999).

konnte im Rahmen einer Diplomarbeit am Zoologischen Institut etabliert und auch an einer Reihe von Monosubstanzen validiert werden (Winn et al. 1999).
In diesem Promotionsprojekt sollten die Befunde des *Arthrobacter*-Assays direkt mit den anderen *In vitro*-Bioassays verglichen werden können, die überwiegend mit organischen Extrakten durchgeführt wurden. Daher erschien neben der Testung von nativen Sedimenten (hohe Relevanz der Befunde) auch die Überprüfung acetonischer Extrakte sinnvoll. Der Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis* wurde in der Vergangenheit nur mit nativen Sedimenten, wässrigen Eluaten und Porenwässern durchgeführt (Liß & Ahlf 1997), so dass er zunächst im Rahmen einer Diplomarbeit an die Untersuchung organischer Extrakte adaptiert wurde (Winn et al. 1999).
Als Dauer für die Inkubation mit dem Farbstoff Resazurin (Nachweis für die Dehydrogenase-Aktivität, siehe Abschnitt 2.6.3) werden in DIN-Entwurf 20-60 min angegeben, wobei der Umsatz von etwa 30 % des Resazurins im Kontrollansatz ohne Bakterien als Zeitpunkt für Beendigung der Exposition angegeben wird. Abb. 3.1 zeigt den Verlauf des Resazurinumsatzes aus drei unabhängigen Testansätzen. Die angestrebten 70 % des Resazurinumsatzes wurden bei wässrigen Proben durchschnittlich erst nach 100 bis 110 min erreicht, so dass eine einheitliche Inkubationszeit von 105 min nach Zugabe des Resazurins gewählt wurde. Gegenüber der DIN-Vorschrift bedeutete dies eine mehr als 50%ige Verlängerung. Im Gegensatz dazu wurden 30 Prozent Abnahme des Resazurins bei den Sedimentkontakttests erst nach ein bis zwei Stunden erreicht. Diese geringe Standardisierbarkeit des Biotests erschien in Anbetracht der unterschiedlichen Expositionszeiten problematisch, konnte aber auch bei DIN-Ringtests von verschiedenen Labors bestätigt werden (Gratzer & Ahlf 1999a). Eine Untersuchung der bakterientoxischen Wirkung des Lösungsvermittlers für die organischen Extrakte (DMSO) konnte eine statistisch signifikante Wirkung ab etwa 3 % (v/v) DMSO nachweisen (Winn et al. 1999, Abb. 3.2), so dass die späteren Versuche mit einer Höchstkonzentration von 2 % DMSO im Testansatz durchgeführt wurden.

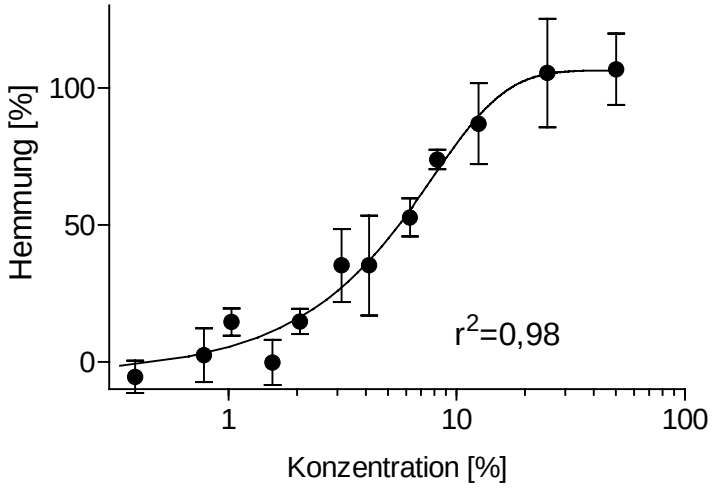


Abb. 3.2. Bakterientoxizität von Dimethylsulfoxid (DMSO) im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis* für wässrige Proben, n = 8; Datengrundlage: Winn (1999).

Ames-Test. Der Ames-Test wurde in der Biotest-Batterie eingesetzt, da für ihn eine große Anzahl von Referenzdaten zum mutagenen Potenzial von Monosubstanzen vorliegen und er als DIN-Gelbdruck (DIN 38415-4) und OECD-Guideline-Entwurf (OECD 1997) vorliegt und daher als gut standardisiert zu bewerten ist. Der Ames-Test wurde oftmals für die Untersuchung von Sedimenten und Schwebstoffen zum Teil in Kombination mit Bioassay-dirigierten Fraktionierungen eingesetzt, so dass eine große Vergleichsdatensammlung zur Verfügung stand (Abe & Urano 1996, Broman et al. 1994, Fernández et al. 1992, Griest et al. 1995, Grifoll et al. 1988, 1990, Hoke et al. 1994, Jarvis et al. 1996, Johnson & Long 1998, Lindstrom-Seppa et al. 1998, Marvin et al. 1995, Marvin et al. 2000a, Metcalfe et al. 1990, Papoulias & Buckler 1996, Papoulias et al. 1996, Sallmolloff et al. 1983, Vahl 1997, Zeiger & Pagano 1984). Zudem ist seine Korrelation zur Kanzerogenität und zu pathologischen Ver-

änderungen bei Organismen im Freiland wiederholt dokumentiert worden (de Maagd 2000, Metcalfe et al. 1990, Zietz & Pfeiffer 2000).

Comet-Assay. Als eukaryontischer Genotoxizitätstest in der Biotest-Batterie wurde der Comet-Assay eingesetzt, ein einfacher und schnell durchführbarer Test, mit dem DNA-Schäden auf dem Niveau der Einzelzelle detektiert werden können (Cotelle & Ferard 1999, Fairbairn et al. 1995, McKelvey-Martin et al. 1993). Nachweisbare Effekte sind Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP (apurinische/apyrimidinische)-Stellen, Cross Links und die Intensität der zellulären Reparatur, ein indirektes Maß für die Bildung von Addukten (Schnurstein 2000, Schnurstein et al. 1999). Der Comet-Assay wurde neben anderen *In vitro*-Genotoxizitätstests (etwa dem Ames- und *umu*-Test sowie der alkalischen Filterelution) in dem BMBF-Verbundprojekt „Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächengewässer“ an Algen, Protozoen, Mollusken, Fischen, Primär- und permanenten Zellkulturen erfolgreich erprobt und validiert (Braunbeck et al. 2000). Im Abschlußbericht dieses Projektes wurde der Comet-Assay als eukaryontischer Genotoxizitätstest für die Untersuchung von Oberflächenwasserproben empfohlen (Grummt 2000). Der Comet-Assay erwies sich auch für die Untersuchung von Abwasserproben (Hollert et al. 1996), von Sedimenten (Brack et al. 1998, Devaux et al. 1998, Hollert et al. 1999c, Kammann et al. 2000, Nehls et al. 1998, Pandrangi et al. 1995, Steinert et al. 1998, Strmac 1999, Zipperle & Deventer 2000) und von Luftstäuben (Cotelle & Ferard 1999, Poli et al. 1999) als geeignet. Ein großer Vorteil des Comet-Assays im Vergleich zu anderen Genotoxizitätstests ist zweifelsohne, das er mit fast jedem eukaryontischen Zelltyp unabhängig vom Zellzyklus durchgeführt werden kann. Dadurch ergibt sich prinzipiell die Möglichkeit, die labornahen *In vitro*-Befunde aus Untersuchungen mit permanenten Zelllinien etwa mit Comet-Ergebnissen aus Organismen zu vergleichen, die direkt im Ökosystem exponiert wurden (Schnurstein 2000, Schnurstein et al. 1999).

Dot-Blot-Assay. Vitellogenin, welches als Vorläuferprotein des Dotters oviparer Vertebraten in der Leber synthetisiert wird, stellt einen anerkannten Endpunkt für den Nachweis östrogener Aktivität (xeno)-östrogener Substanzen dar (Islinger et al. 1999, Pelissero et al. 1991, Sumpter & Jobling 1995, OECD 2001a, b). Unter natürlichen Bedingungen wird Vitellogenin und die dem Protein zugrunde liegende mRNA ausschließlich in weiblichen Organismen synthetisiert, jedoch sind auch männliche Fische nach entsprechender Stimulation in der Lage, dieses Protein zu produzieren (Anderson et al. 1996, Copeland et al. 1986, Tyler et al. 1996).
Im Rahmen der hier eingesetzten Biotestbatterie wurde der Vitellogenin-Nachweis im Dot-Blot/RNA-se-Protection-Assay mit isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle als Screeningmethode zur Ermittlung des endokrin wirksamen Schädigungspotenzials von Wasser- und Abwasserproben, Sedimenten sowie Schwebstoffen eingesetzt (Hollert et al. 1999h, Islinger et al. 1999a, b). Zweifelsohne stellt die Messung der Vitellogenin-Induktion in Primärkulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle einen aufwendigeren Biomarker dar als die artifiziellen, für ein schnelles Screening adaptierten Reporter-Gen-Assays (Islinger et al. 1999a, b). Die Vorteile der Hepatocytenprimärkultur liegen jedoch in der Komplexität des Bewertungssystemes: Die hohe Biotransformationskapazität der Leberzellen erlaubt auch die Untersuchung von östrogen aktiven Stoffwechselmetaboliten wie zum Beispiel Methoxychlor. Somit kann nicht nur die direkte östrogene Aktivität bestimmt, sondern auch eine Metabolisierung von Xenobiotica durch Enzyme der Leber mit einbezogen werden (Islinger et al. 1999a).

Dioxin-ähnliche Wirksamkeit. Zum Nachweis der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit von Umweltproben wurde der EROD-Assay mit embryonalen Hühnerleberkulturen in die Biotestbatterie integriert. Organkulturen von Lebern und Primärhepatocyten wurden oftmals zur Bewertung des dioxin-ähnlichen Potenzials von Monosubstanzen und Umweltproben herangezogen (Bosveld et al. 1997, Brunstrom & Halldin 1998, Kennedy et al. 1996, Machala et al. 1996, Matlova et al. 1995). In Skandi-

navien wurde der EROD-Assay mehrfach erfolgreich für ein Risk-Assessment von Sedimenten und Schwebstoffen eingesetzt (Brunström et al. 1995, Engwall et al. 1998a, 1997a,b 1996, 1994, Norrgren et al. 1998). Ähnlich wie bei der endokrinen Wirksamkeit wurde auch hier ein komplexes biologisches Testsystem (Organkultur intakter embryonaler Hühnerlebern) mit umfassenden metabolischen Fähigkeiten gegenüber künstlichen Zellkultursystemen mit Reporter-Gen-Assays (Hilscherova et al. 2000, Kannan et al. 2000, 1999, Murk et al. 1996, Richter et al. 1997) bzw. EROD-Assays an permanenten Fischzelllinien mit einem weniger komplexen Metabolismus (Brack et al. 2000, Lee et al. 1993, Villeneuve et al. 1997) bevorzugt.

4 Integrierte Sedimentuntersuchungen im Einzugsgebiet des Neckars

4.1 Das Konzept integrierter Sedimentuntersuchungen und bisherige Anwendungen

Durch die Komplexität und Dynamik von aquatischen Ökosystemen kann der umfassende Beweis für eine nachteilige Umwelt- und Sedimentqualität (Weight-Of-Evidence-Approach) nur durch multiple Qualitätsabschätzungen erbracht werden (Suter 1997). Da es kein direktes allgemeingültiges Verfahren zur Beurteilung der Umweltqualität gibt, werden oftmals integrative Umweltuntersuchungen durchgeführt. Integrierte Sedimentbewertungen stellen ein Konzept dar, mit dem die komplexen Mischungen von Umweltchemikalien in Sedimenten unter Sicherstellung der ökologischen Relevanz untersucht und bewertet werden können (Übersichten bei Ahlf 1995, Ahlf et al. 1991, Chapman 2000, Chapman et al. 1992). Zu „integrierenden Beurteilungen“ kommt es nach Chapman et al. (1992) auf dem Weg von Untersuchungen, die verschiedene Messungen der Umweltqualität zum Zweck einer umfassenden Beurteilung des Systemzustandes kombinieren. Diese Messungen bestehen mindestens aus drei der folgenden fünf Komponenten (Ahlf 1995): (1) chemische Sedimentanalysen, (2) Sedimenttoxizitätstests, (3) Geweberückstandsanalysen, (4) pathologische Untersuchungen und (5) biozönotische Untersuchungen (Tab. 4.1). Obwohl jede einzelne dieser fünf Komponenten wichtige Informationen zum Sedimentzustand bietet, gelangt keine von ihnen zu umfassenden Aussagen (Tab. 4.1): mittels chemischer Analytik kann die Anwesenheit und Konzentration von Schadstoffen im Sediment erfasst werden, sie erlaubt aber keine Aussage über die Bioverfügbarkeit und Wirkung der Substanzen. Sedimenttoxizitätstests im Labor geben zwar Aufschluss über die Toxizität an den getesteten Organismen und Testsystemen, doch ist die Extrapolation der Daten auf Organismen im Freiland

Tab. 4.1. Komponenten für integrierte Umweltuntersuchungen und daraus abzuleitende Informationen, nach Chapman et al. (1992).

Komponente	Information	
	Vorhanden	**Fehlend**
Sediment-Chemie	• Gegenwart und Konzentration analysierter Schadstoffe	• Bioverfügbarkeit der Stoffe • Gegenwart und Konzentration nicht analysierter Schadstoffe
Sediment-Biotests	• Labor-Antworten durch Organismen bzw. *In vitro*-Testverfahren unter Testbedingungen	• Antworten bei nicht durchgeführten Testverfahren und nicht eingesetzten Organismen • Antworten im Freiland
Gewebe-Chemie	• Gegenwart und Konzentration analysierter Schadstoffe in Organismen und Geweben • Bioverfügbarkeit	• Effekte der nachgewiesenen Stoffen im Gewebe • Gegenwart chemisch transformierter Chemikalien • Gegenwart und Konzentration nicht untersuchter Schadstoffe in Organismen und Geweben
Pathologie	• Gegenwart und Stärke untersuchter Effekte in Organismen und Geweben	• Ökologische Effekte pathologischer Resultate • Gegenwart und Stärke nicht untersuchter Effekte in Organismen und Geweben
Struktur der Biozönose	• Gegenwart und Anzahl der Taxa, Abundanzen	• Kausalität (z. B. natürliche versus anthropogene Gründe) • Relevanz auf dem Niveau des Ökosystems

problematisch (Zimmer & Ahlf 1994). Im Idealfall werden integrierte Sedimentbewertungen mit allen fünf Komponenten durchgeführt, um ein Bild von der ökologischen Signifikanz der kontaminierten Sedimente zu erhalten. Dies ist anzuraten, da kontaminierte Sedimente nicht nur die sedimentbewohnenden, sondern (über Wechselwirkungen mit der freien Wassersäule) auch Organismen des freien Wassers schädigen können (Chapman et al. 1992). Integrierte Sedimentbewertungen mit allen fünf Komponenten wurden aufgrund der hohen Kosten und des hohen Aufwandes nur selten durchgeführt (Übersichten bei Chapman 1992, Chapman et al. 1992, Ginn & Pastorok 1992, Pascoe et al. 1994, Pascoe & DalSoglio 1994, Stebbing et al. 1992). Aber auch aus inhaltlichen Gründen sind solche komplexe Studien nicht immer erforderlich, da Fragestellung und Untersuchungsziel die Anzahl der eingesetzten Komponenten bestimmen. Soll beispielsweise geklärt werden, ob ein bestimmtes Sediment kontaminiert und toxisch ist und ob Lebensgemeinschaften im Sediment Schadeffekte zeigen, so genügt ein vereinfachter, kostengünstigerer 3-Komponenten-Ansatz der integrierten Bewertung (Ahlf 1995). Nach Chapman et al. (1992) sollte in diesem Falle eine sogenannte Sedimentbewertungstriade aus den Komponenten Sedimentchemie, Sedimenttoxizität in biologischen Tests und der Messung von Feldeffekten der benthischen Lebensgemeinschaft (z.B. Pathologie oder Struktur der Biozönose) eingesetzt werden (Abb. 4.1).
Das methodische Prinzip der Sedimenttriade basiert auf verschiedenen Messungen zu drei Komponenten:

- Chemische Konzentrationen von organischen und anorganischen Schadstoffen im Sediment, quantifiziert mit der niedrigst möglichen Nachweisgrenze.
- Ermittlung und Quantifizierung der Toxizität mit Hilfe von Bioassays. Nach Chapman et al. (1992) basiert eine ideale integrierte Bewertung auf einer Biotestbatterie mit einer Vielzahl von Endpunkten und Organismen bzw. Testsystemen verschiedener hierarchischer Stufen biologischer Organisation. Neben akuten Effekten können als Messungen auch cytotoxische, chronische, subletale, gentoxische und mutagene Effekte untersucht werden (Chapman 1990, Chapman et al. 1992). Die Biotests sollten dabei möglichst mit einer direkten Exposition gegenüber dem nativen Sediment oder mit den Expositionspfaden Eluaten, Extrakten und Porenwässern durchgeführt werden (Chapman et al. 1992).
- Erfassung des *In situ*-Zustandes. Hier werden oftmals Struktur und Funktion der benthischen Infauna-Biozönosen herangezogen, weil die Organismen relativ ortspezifisch und ortsständig sind. Als häufige Parameter werden die Anwesenheit verschiedener Taxa und deren Abundanzen, Dominanzverhältnisse sowie Diversität verwendet.

Die ermittelten Befunde aus den Komponenten Sedimentchemie, Biotests und Bestandsaufnahme im Freiland werden für die Sedimenttriade auf einer quantitativen Basis verglichen. Eine besondere Bedeutung haben hierbei Referenzsedimente, die möglichst anthropogen nicht belastete Sedimente mit einer vergleichbaren hydrologischen und ökomorphologischen Struktur (wie die untersuchten kontaminierten Standorte) darstellen sollten. Die Auswahl der Referenzsedimente besitzt einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie und sollte daher mit großer Sorgfalt und Expertenwissen durchgeführt werden. Chapman et al. (1992) verweisen darauf, dass bei umfassenden Sedimenttriaden generell die Standorte mit der geringsten Kontamination als Referenzen bestimmt werden. Zur Quantifizierung der Belastung werden in der Regel „Ratio-to-Reference“(RTR)-Werte ermittelt, die sich aus der Division der Einzelparameter durch die entsprechenden Referenzwerte ergeben. Die Auswertungen können unter der Verwendung von Expertenwissen zu deskriptiven und numerischen Kriterien der Sedimentqualität führen und dienen folgenden Zwecken (nach Chapman et al. 1992) :

- Identifizierung und Differenzierung durch Schadstoffe kontaminierter Probennahmestandorte im Vergleich zu Referenzarealen

- Erfassung des Ausmaßes der schadstoffinduzierten Beeinträchtigung des Sedimentes mit Hilfe eines nicht-numerischen, die Vielzahl der Kontaminanten berücksichtigenden Verfahrens. Vor allem Standorte, die weder eindeutig kontaminiert noch eindeutig unkontaminiert sind (sog. Grauzonen), sollten so differenziert werden
- Ermittlung der Schadstoffkonzentrationen im Sinne von numerischen Sedimentqualitätskriterien (SQC), die entweder immer mit Effekten verbunden sind oder niemals Effekte bewirken
- Bewertung und Prioritätenbildung der untersuchten Standorte und ihrer Umweltsignifikanz im Hinblick auf eine Sanierung
- Beschreibung ökologischer Beziehungen zwischen Sedimenteigenschaften und Organismen
- Voraussage, an welcher Stelle im Ökosystem Sediment eine toxizitätsabhängige Beeinträchtigung auftreten wird

Die Formulierung möglicher Schlussfolgerungen aus den Befunden wird durch die *A priori*-Struktur des Untersuchungskonzeptes vorgegeben und ist für die häufig angewandte Form der Sedimenttriade mit den Komponenten Sedimentchemie, Sedimenttoxizität und Biozönosestruktur in Tab. 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2. *A priori* Entscheidungsmatrix mit Schlussfolgerungen aus positiven (●) und negativen (○) Befunden der verschiedenen Untersuchungskomponenten einer Sedimenttriade in Relation zu Kontrollen und Referenzen (modifiziert nach Chapman 1990, Chapman et al 1992 , 1996).

Triade-Komponenten			**Mögliche Schlussfolgerungen**
Chemie	**Biotest**	***In situ*-Effekt**	
●	●	●	Starke Beweislast für eine kontaminationsbedingte Herabsetzung der Sedimentqualität
○	○	○	Starker Beweis für keine Herabsetzung der Sedimentqualität
●	○	○	Chemikalien sind nicht bioverfügbar oder werden detoxifiziert
○	●	○	Ungemessene Schadstoffe oder Bedingungen liegen vor, die eine potenzielle Qualitätsminderung anzeigen
○	○	●	Die Änderungen *in situ* wurden nicht von toxischen Substanzen hervorgerufen
●	●	○	Toxische Substanzen belasten das System
○	●	●	Nicht analysierte Schadstoffe vermindern die Sedimentqualität
●	○	●	Kontaminanten sind im Biotest nicht bioverfügbar oder die Änderung *in situ* erfolgt nicht aufgrund toxischer Stoffe

Bisherige Anwendungen

Integrierte Sedimentbewertungen wurden insbesondere im angelsächsischen Raum (Canfield et al. 1994, Carr et al. 1996a, 2000, Chapman 1990, Chapman et al. 1996, Green & Montagna 1996, Hall et al. 1998, Leppanen et al. 1998, Long 2000a, b, Pascoe et al. 1994, Wildhaber & Schmitt 1998), in Russland (Leslie et al. 1999), vor der Insel Hong Kong (Shin & Fong 1999), in der Tschechischen Republik (Machala et al. 1998, Staffová et al. 1998), am Golf von Cadíz (DelValls et al. 1998c) sowie im Bereich der Nordsee (Chapman 1992, Karbe et al. 1992, 1994), am Rhein (Hendricks 1994) und an der Elbe (Karbe et al. 1992, 1994) durchgeführt. Tab. 4.3 gibt eine exemplarische Übersicht über durchgeführte integrierte Sedimentuntersuchungen und den dabei untersuchten Parametern. Bei den eingesetzten Sedimenttoxizitätstest ist die Dominanz von akuten und chronischen Toxizitätstests offensichtlich, wogegen Untersuchungen mit spezifischen Endpunkten (wie Genotoxizität, Mutagenität, endokrine und dioxin-ähnliche Wirksamkeit) eher die Ausnahme bilden. Während in frühen Studien die Befunde der einzelnen untersuchten Triade-Komponenten bis auf jeweils einen Indexwert reduziert und in Form von dreiseitigen Graphiken präsentiert wurden (Chapman 1990, Chapman et al.

1992), weist Chapman (2000) darauf hin, dass diese Datenreduktion zu einem substanziellen Informationsverlust führt. In der jüngsten Zeit wurden daher verschiedene multivariate Methoden für die Bewertung der einzelnen und der kombinierten Sedimentqualitätskriterien eingesetzt (Chapman 1996, Chapman et al. 1997, DelValls et al. 1998b, d, Paine et al. 1996, Shin & Fong 1999). DelValls et al. (1998c) haben vor dem Hintergrund einer einfachen Interpretation auch durch Nichtwissenschaftler eine Bewertungsmethode vorgestellt, bei der die Belastung nicht nur auf den Referenzstandort sondern auch auf den am höchsten belasteten Standort bezogen wird.

Tab. 4.3. Literaturübersicht über bisherige Anwendungen der Sedimentbewertungstriade und der jeweils untersuchten Parameter.

Sedimentchemie	Sedimentbiotest	*In situ*-Aufnahme	Zitat, Ort, Bemerkungen
Schwermetalle, PAHs, PCBs, Phtalate, Chorbenzene, PCDD/Fs, Organochlorpestizide, Tributylzinn	Akute und chronische Toxizität bei verschiedenen Spezies (z.B. *Rhepoxynius abronius* (C), *Neanthes* sp. (P)), *In vitro*-Bioassays, P450-Induktion. Einsatz unterschiedlicher Expositionspfade	Bestimmung des Makrozoobenthos aus Sedimentproben: Taxazahl, Abundanzen, Dominanzverhältnisse	Review bei Ginn & Pastorok (1992): Puget Sound, Washington State, USA. Bioakkumulation organischer und anorganischer Schadstoffe in Geweben, Beispiel für einen 5-Komponentenansatz
Schwermetalle in Sedimenten und Porenwässern, Sequentielle Extraktion für Spezifizierung der Bindung, SEM, AVS, Organochlorpestizide, PAHs, PCBs, Metallbioakkumulation bei *Hyalella azteca* (C)	Akute Toxizität, an Porenwasser und z. T. Gesamtsediment: *Daphnia magna* (C), *Hyalella azteca* (C), *Chironomus riparius* (D), *Oncorhynchus mykiss* (V), *Vibrio fischeri* (B) Exposition von juvenilen und adulten Regenbogenforellen über Wasser und Futter. Lipidperoxidation, Histologie	Bestimmung des Makrozoobenthos aus Sedimentproben, Taxanzahl, Abundanzen, Dominanzverhältnisse Untersuchungen von Mentum- und ggf. Liguladeformationen bei Chironomiden. Zunahme der Taxa von Chironomiden bei belasteten Standorten	Besser et al. (1996), Brumbaugh et al. (1994), Canfield et al. (1994), Farag et al. (1994), Ingersoll et al. (1994), Kemble et al. (1994), Übersicht bei Pascoe et al. (1994). Oberer Clark Fork River, Montana, USA
Korngröße, Schwermetalle, AVS, SEM für Zn, Cu und Ni, TOC, Wassergehalt	Festphasentest mit *Grandidierella japonica* (C), Porenwassertoxizität als Fertilitäts- und Embryotoxizitätstest mit *Arbacia punctulata* (E)	Gesamtartenzahl, Abundanzen, Diversität und Eveness	Carr et al. (1996b). Galveston und West Bay am Golf von Mexiko, Texas, USA
TOC, AVS, SEM, Schwermetalle, PAHs, PCBs, Organozinnverbindungen, PCDDs/ PCDFs, Organochlorpestizide, Ammonium	Biotestbatterie zur akuten und chronischen Toxizität mit 13 Parametern (Fische, Zooplankton, benthischen Invertebraten, Phytoplankton, Makrophpyten und Mikroorganismen) u.a. Embryotoxizität an *Pimephales promelas* (V), Expositionspfade: Gesamtsediment, Porenwasser und Eluat	Bestimmung bis auf Familien- oder möglichst Artniveau, Berechnung der Diversität, Mean-tolerance-to-pollution-Index nach Lenat	Wildhaber & Schmitt (1998). Indiana River, Saginaw River und Buffalo River, Great Lakes, USA
EPA-Metalle, 15 PAHs, Chorbenzene, Summe Phenole, AVS, TOC, Summe Cyanide, Korngröße	Akute und teilweise chronische Toxizität bei *Rhepoxynius abronius* (C), *Neanthes arenaceodentata* (P), *Mytilus edulis* (B)	Bestimmung des Makrozoobenthos aus Sedimentproben: Taxazahl, Abundanzen, Dominanzverhältnisse	Chapman et al. (1996). Küste vor Victoria, Kanada
Schwermetalle	Akute Toxizität *Melita longidactyla* (C) und *Tapes philippinarum* (B)	Makrozoobenthos, Abundanzen	Shin & Fong (1999). Küste Hong Kongs
Schwermetalle Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Physiologische Besonderheiten an *Hydropsyche pellucidula* (T): Kiemenschäden und Analpapillenverfärbung	Diversität des Makrozoobenthos	Leslie et al. (1999). Fluss Chusovaya, Südliches Ural, Russland. Bioakkumulation von Schwermetallen in *Hydropsyche pellucidula*

Fortsetzung Tab. 4.3

Schwermetalle, 16 PAHs, 7 PCBs, Organochlorpestizide, EOX, Mineralöl, Nährstoffe	Akute Toxizität mit *Vibrio fischeri* (B), *Brachionus calyciflorus* (R), *Thamnochephalus platyurus* (C), chronische Toxizität mit *Daphnia magna* (C), *Chironomus riparius* (D)	An Sedimentproben: Abundanzen und Diversität von Chironomiden, Oligochaeten und Bivalviern	De Jonge et al. (1999). Überflutungsflächen am Rheinzufluss Waal, Niederlande,Schwermetallbioakkumulation in Tubifex.
nicht spezifiziert	nicht spezifiziert	Biotic sediment index BSI, Mentumdeformationen bei Chironomiden *in situ*	Heylen & dePauw (1999). Nicht beschiffbare Wasserläufe in Flandern, Belgien
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, Organochlorpestizide, Alkylphenole	Cytotoxizität, endokrine und dioxinähnliche Wirkung mit fraktionierten organischen Sedimentextrakten an transfizierten permanenten Zellinien H4IIIE-luc (aus Rattenleber) und MCF7-luc (humane Brustkrebs-Karzinom-Zellen)	nicht spezifiziert	Machala et al. (1998), Staffová et al. (1998). Region Zlin, Tschechische Republik
Schwermetalle, Korngrößenverteilung, Organischer Kohlenstoff, Lineare Alkylbenzensulfonate (LAS)	Akute und chronische Toxizität, Gesamtsediment: *Mikrodeutopus gryllotalpa* (C), *Ruditapes phillipinarum* (B), Eluat: *Crassostrea angulata* (B), *Sparus aurata*-Larven (V), Porenwasser: *Brachionus plicatilis* (R) *Vibrio fischeri* (B)	Aufnahme des Makrozoobenthos, Abundanz, Biomasse, Diversität, Eveness, Dominanzverhältnisse, Verteilung der taxonomischen Hauptgruppen	DelValls et al. (1998 b, c, d). Golf von Cadíz, Spanien
Quecksilber in verschiedenen Bindungsformen, Bioakkumulation von Schwermetallen in Fischen, Bioakkumulation von PCBs in *Mytilus edulis* und *Dreissena polymorpha*	Akute und chronische Toxizität mit Eluaten an *Daphnia magna* (C), *Gammerus pulex* (C), *Hydra littoralis* (Cn), Wasserproben: P450- und EROD-Induktion bei *Leuciscus idus* und *Limanda limanda (V),* DNA-Adukte bei *Limanda limanda,* Batterie von bakteriellen Genotoxizitätstests	Makrozoobenthos, Artenverteilung, Diversität, Saprobienindex, Erarbeitung einer Klassifikation für Chironomiden	Übersichten bei Karbe et al. (1992, 1994). Elbe und Nordsee, Biotox-Programm I und II
Schwermetalle As, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn, Summe Kohlenwasserstoffe, PAHs	Akute und chronische Toxizität bei verschiedenen Spezies (z.B. *Rhepoxynius abonius (C), Neanthes arenaceodentata* (P), *Crassostrea gigas, Mya arenaria* (B), *Vibrio fischeri (*B), Biomarker: EROD-Induktion und Stoffwechselenzyme, Histologie, Teratogenität, Metallothioneine bei *Limanda limanda* (V)	Makrozoobenthos und Meiofauna: Biomasse, Abundanzen, Diversität, Eveness	Chapman (1992), Stebbing et al. (1992) Bremerhafen–Workshop der ICES/IOC. Zwei Transekte in der Nordsee: Bohrinsel und von der Mündung der Elbe bis in die Deutsche Bucht, Nordsee

Legende: B=Bakterium, Cn=Cnidaria, R=Rotatoria, C=Crustacea, D=Diptera, T=Trichoptera, P=Polychaeta, E=Echinodermata, V=Vertebrata

4.2 Ausgangspunkt und untersuchte Fragestellungen

Während insbesondere in angelsächsischen Ländern, aber auch in der Bundesrepublik Deutschland im Bereich der Nordsee, der Elbe und des Unterlauf des Rheins integrierte Sedimentbewertungen durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 4.1), existieren bisher noch keine multiplen Qualitätsabschätzungen für süddeutsche Fließgewässer. Die bisherigen Triadestudien untersuchten überwiegend marine Ökosysteme und das Potamal großer Fließgewässer, wogegen die Untersuchung kleiner Fließgewässer, speziell im Oberlauf, bisher vernachlässigt wurde. Während sich bei großen Einzugsgebieten ein Risk Assessment durch einen großen Anteil diffuser Einträge oftmals als schwierig erweist, können bei kleinen Einzugsgebieten durch die *a priori* leichtere Identifizierung von Punktquellen und ihrer Beseitigung häufig höhere Erfolge bezüglich einer Verbesserung der Gewässerqualität erzielt werden. Im

Sinne einer Toxicity Reduction Evaluation (TRE) besteht somit ein großer Forschungs- und Handlungsbedarf bei der Bewertung von Fließgewässern in Abhängigkeit von Ihrer Größe.
Mit dieser Studie sollte nicht nur eine integrierte Untersuchung ausgewählter baden-württembergischer Fließgewässer durchgeführt werden, sondern durch die Untersuchung von Fließgewässern mit unterschiedlich großen Einzugsgebieten und geologischen Situationen auch ein Beitrag zur Erarbeitung eines allgemeinen fließgewässertypologischen Untersuchungs- und Bewertungskonzeptes für aquatische Systeme geleistet werden. Folgende Fragestellungen werden im Rahmen dieser integrierten Sedimentuntersuchungen im Einzugsgebiet des Neckars untersucht:

Chemische Analytik

- Sind die Konzentrationen organischer und anorganischer Schadstoffe in Wasser und Sediment im Vergleich zu Referenzstandorten erhöht?

Biotests

- Eignet sich die erarbeitete Biotestbatterie (Abschnitt 3) für die Erfassung der toxikologischen, mutagenen gentoxischen, dioxin-ähnlichen und endokrinen Belastung von Fließgewässern?
- Wie verteilt sich die ökotoxikologische Belastung auf die Kompartimente Sediment und Wasser?
- Wie verteilt sich das toxikologische Schädigungspotential von Sedimenten auf verschiedene Expositionsphasen? Korrelieren die Biotestbefunde der Expositionspfade Festphase und organischer Extrakt? Lässt sich die bioverfügbare Toxizität von nativen Sedimenten mittels Extrakten abschätzen?

In situ-Aufnahmen

- Sind die Makrozoobenthos-Biozönosen belasteter Fließgewässerabschnitte im Vergleich zu Referenzstandorten in ihrer Struktur geschädigt?
- Welche Makrozoobenthosindices eignen sich für die Untersuchung und Bewertung des Sedimentzustandes bei verschiedenen Fließgewässertypen?

Synthese der Einzelkomponenten

- Wie korrelieren die Befunde der einzelnen Untersuchungskomponenten?
- Welche Schlussfolgerungen für die untersuchten Standorte erlaubt die *A priori*-Entscheidungsmatrix ?
- Welche statistischen Methoden eignen sich für die Bewertung der Befunde?

Weiterführende Fragestellungen

- Eignet sich das Konzept für die Untersuchung von Fließgewässern mit kleinen Einzugsgebieten?
- Welche Untersuchungsparameter sollte eine Triade für die Bewertung unterschiedlich großer Fließgewässer enthalten?
- Bringt eine Erweiterung des Konzepts der Sedimentbewertungstriade um spezifische Biomarker einen signifikanten Erkenntnisgewinn gegenüber konventionellen Triaden ?

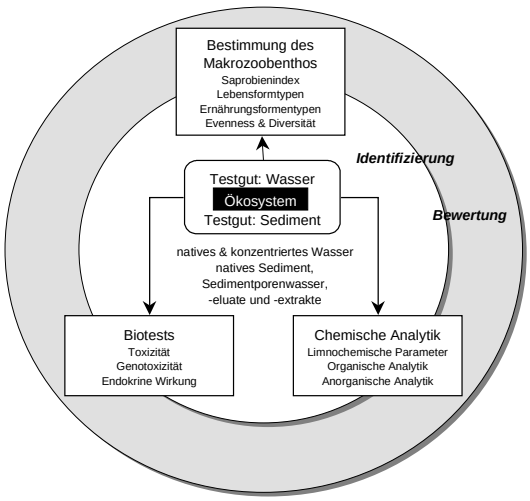


Abb. 4.1. Schema für eine integrierte Bewertung von aquatischen Ökosystemen durch die kombinierte Untersuchung von Sediment und Wasser mit *In vitro*-Biotests, chemischer Analytik und Untersuchung des Makrozoobenthos.

4.3 Die Struktur der eingesetzten Triade

Während bei den meisten Sedimenttriaden ausschließlich der Zustand des Sedimentes Untersuchungsgegenstand ist, wurde in dieser Studie zusätzlich das Kompartiment Wasser mitberücksichtigt: Die integrierte Untersuchung beinhaltete die Komponenten Sediment- und Wasserchemie, Sediment- und Wassertoxizität in biologischen Tests sowie die Erfassung der Struktur der benthischen Biozönosen (Abb. 4.1). Die Biotests zur toxischen, mutagenen, gentoxischen, endokrinen und dioxin-ähnlicher Wirksamkeit wurden mit verschiedenen Expositionspfaden durchgeführt, um nähere Informationen über die Art des Schädigungspotenzials zu erhalten (vgl. Abschnitt 3). Tab. 4.4 gibt einen detaillierten Überblick über die untersuchten Parameter.

Tab. 4.4. Überblick über die Parameter, die bei einer integrierten Sedimentbewertung untersucht wurden.

Chemie und Gewässerzustand	Biotests	Makrozoobenthos
Gewässerzustand:	***Gesamtsediment:***	Saprobienindex
Wasserstand, Bachbreite	Bakterientoxizität mit *Arthrobacter globiformis* und *Bacillus cereus*	Kopplungsanalyse nach Buck
Fließgeschwindigkeit	Embryotoxizität mit *Danio rerio*	Sauerstoffmindestversorgung
Sichttiefe		Karlsruher Methode
Geruch, Färbung	***Porenwasser:***	Rhithron-Ernährungstypen-Index
Korngrößenverteilung des Sedimentes	Bakterientoxizität mit *Arthrobacter globiformis*	Diversität
	Mutagenität, Ames-Test	Evenness
Limnochemie:	Cytotoxizität, RTG-2-Zellen	Säurestufen
Wassertemperatur, Leitfähigkeit	Embryotoxizität mit *Danio rerio*	Ökotoxikologischer Index
Sauerstoffsättigung, Sauerstoffgehalt	Genotoxizität (Comet-Assay)	
pH-Wert (W), Redoxpotential (W, S)	Endokrine Wirksamkeit (Dot-Blot)	
Gesamthärte, Carbonathärte		
Ammonium, Nitrit, Nitrat	***Sedimenteluat:***	
Sulfat	Cytotoxizität, RTG-2-Zellen	
Ortho-Phosphat	Genotoxizität (Comet-Assay)	
Chlorid		
	Sedimentextrakt:	
Summenparameter:	Bakterientoxizität mit *Arthrobacter globiformis*	
SAK_{254} (W)	Bakterientoxizität mit *Vibrio fischeri*	
$KMnO_4$-Verbrauch (W)	Mutagenität, Ames-Test	
Trübung	Cytotoxizität, RTG-2-Zellen	
AOX (W, S)	Embryotoxizität mit *Danio rerio*	
BSB_5 (W)	Genotoxizität (Comet-Assay)	
Gesamtkohlenstoff (S)	Endokrine Wirksamkeit (Dot-Blot)	
TOC (S)	EROD-Induktion (Hühnerleberkulturen)	
Gesamtschwefel (S)		
	XAD-Wasserextrakt:	
Chemische Analytik:	Bakterientoxizität mit *Arthrobacter globiformis*	
Metalle As, Pb, Cd, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Zn (S)	Mutagenität, Ames-Test	
Schwermetalle Pb, Cd, Cr, Cu, Ni (PW)	Cytotoxizität, RTG-2-Zellen	
PAHs (W, S)	Genotoxizität (Comet-Assay)	
PCBs (W, S)	Endokrine Wirksamkeit (Dot-Blot)	
PCDD/Fs (S)		
Endokrin wirksame Xenobiotica (W, S)		
Pestizide (W, S)		
Pthalate (W, S)		

Legende: PW=Porenwasser, W=Wasser, S=Sediment

4.4 Die Probennahmestandorte der Sedimentbewertungstriade

Die integrierte Bewertung wurde an 12 ausgewählten Stellen unterschiedlicher Belastung im Einzugsgebiet des Neckars durchgeführt, welche in vorhergehenden Untersuchungen aufgefallen waren. Abb. 4.2 zeigt die Lage der Untersuchungsstandorte im Einzugsgebiet des Neckars. Die Auswahl der Probestandorte erfolgte so, dass stark kontaminierte Fließgewässerabschnitte (etwa nach Kläranlageneinleitungen) möglichst mit Referenzstandorten verglichen werden konnten. Weiterhin sollten mit der Auswahl der Gewässer Einzugsgebiete unterschiedlicher Größen sowie verschiedene geologische und ökomorphologische Situationen erfasst werden. Der Forellenbach bei Heidelberg, als Beispiel eines Mittelgebirgsfließgewässers mit kleinem Einzugsgebiet im Buntsandstein, wurde mit fünf Standorten beprobt. Hier ergab sich die Möglichkeit, einen stark kontaminierten Gewässerabschnitt (nach Einleitung einer Kläranlage mit einem hohen Anteil an Klinikabwässern) mit einer Referenzstelle und zwei Standorten nach Zusammenfluss der beiden Quellbäche zu vergleichen. Der Mühlbach bei Heidelberg, als weiteres Fließgewässer mit kleinem Einzugsgebiet, wurde am Oberlauf (Buntsandstein) und nach Durchfluss durch verdoltes und landwirtschaftlich intensiv genutztes Gebiet (alluviale Sedimente, Handschuhsheimer Feld) beprobt. Die lößgeprägten Fließgewässer des Kraichgaus wurden durch die Elsenz bei Eppingen vor und nach einer Kläranlage und durch den Hilsbach (nahe der Stadt Eppingen) als landwirtschaftlich geprägte Referenz repräsentiert. Die Elsenz vertritt in dieser Studie mit einer Größe von 542 km² die mittleren Einzugsgebiete (Barsch et al. 1989a). Am staugeregelten Neckar mit seinem großen Einzugsgebiet (14.000 km², Barsch et al. 1994a, Borchert 1983, Huttenlocher 1972) wurde eine Flachwasserzone bei Eberbach untersucht, an der ein Sedimentationsbereich mit einem Standort am Einstrom (Referenz) verglichen werden konnte.

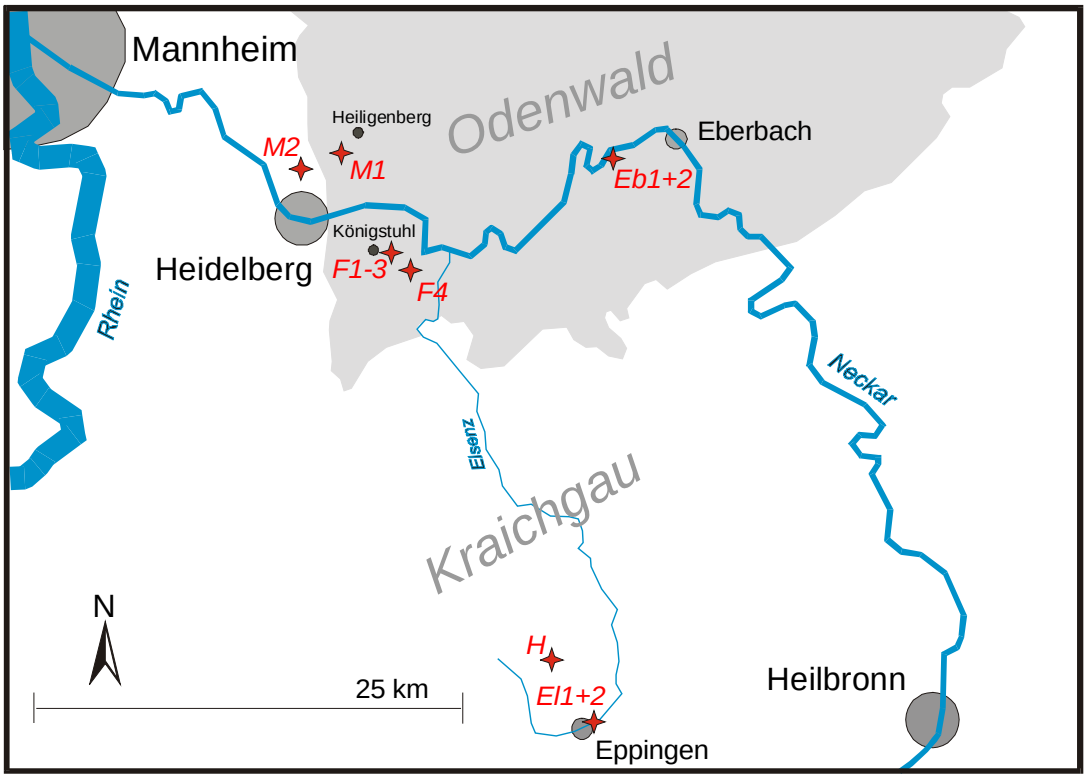


Abb. 4.2. Lage der Probennahmestandorte der Sedimentbewertungstriade, El = Elsenz, H = Hilsbach, Eb = Flachwasserzone Eberbach, F = Forellenbach, M = Mühlbach bei Heidelberg ✦ = Probennahmestandorte (modifiziert nach Winn 2000).

4.4.1 Fließgewässer mit einem kleinen Einzugsgebiet

Die in dieser Studie untersuchten Fließgewässer mit kleinen Einzugsgebieten befinden sich alle im Buntsandstein-Odenwald und sind aufgrund ihrer Höhenlage und höhenzonalen Erstreckung dem montanen bis submontanen Bergbachtyp zuzurechnen (Braukmann 1987). Die naturnahen Abschnitte dieses Gewässertyps zeichnen sich durch gestreckte Bachläufe in Kerbtälern aus. Die Bachsohlen sind oft blockreich und können Kiesbänke aufweisen. Ein häufig unausgeglichenes, starkes Gefälle bedingt streckenweise Schnellen oder kleine Wasserfälle, allgemein hohe Fließgeschwindigkeiten und ein vegetationsarmes Bachbett. Im Buntsandstein-Odenwald gehören die Bäche überwiegend dem geochemischen Grundtyp des gering gepufferten Silikat-Bergbachs an. Der Buntsandstein besteht aus geschichteten, meist tonverkitteten mittel- bis feinkörnigen Sanden, denen nur wenig gröberes Kies- und Feingeröllmaterial, meist in Form quarzitischer Kiesel, beigemischt ist. An Unterläufen kann es durch Anschnitt von Löß- und lößlehmreichen Schichten zu einem Übergang zum Carbonattyp kommen (Bostelmann et al. 1994). Eine detailliertere Beschreibung dieser Einzugsgebiete und eine ökomorphologische Charakterisierung der untersuchten Fließgewässerstandorte mit kleinen Einzugsgebieten gibt Siebert (1999).

Forellenbach bei Heidelberg

Der Forellenbach (Abb. 4.3) entspringt aus mehreren Quellsümpfen im Südosten des Königstuhls bei Heidelberg in 430 m Höhe über NN, etwa 200 m südlich der Fachklinik Königsstuhl, einer Rehabilitationsklinik der Landesversicherungsanstalt Baden. Nachdem er 1 km in östliche Richtung geflossen ist, beschreibt er einen Bogen in Richtung Südwesten zur Ortschaft Waldhilsbach. Dort fließt der

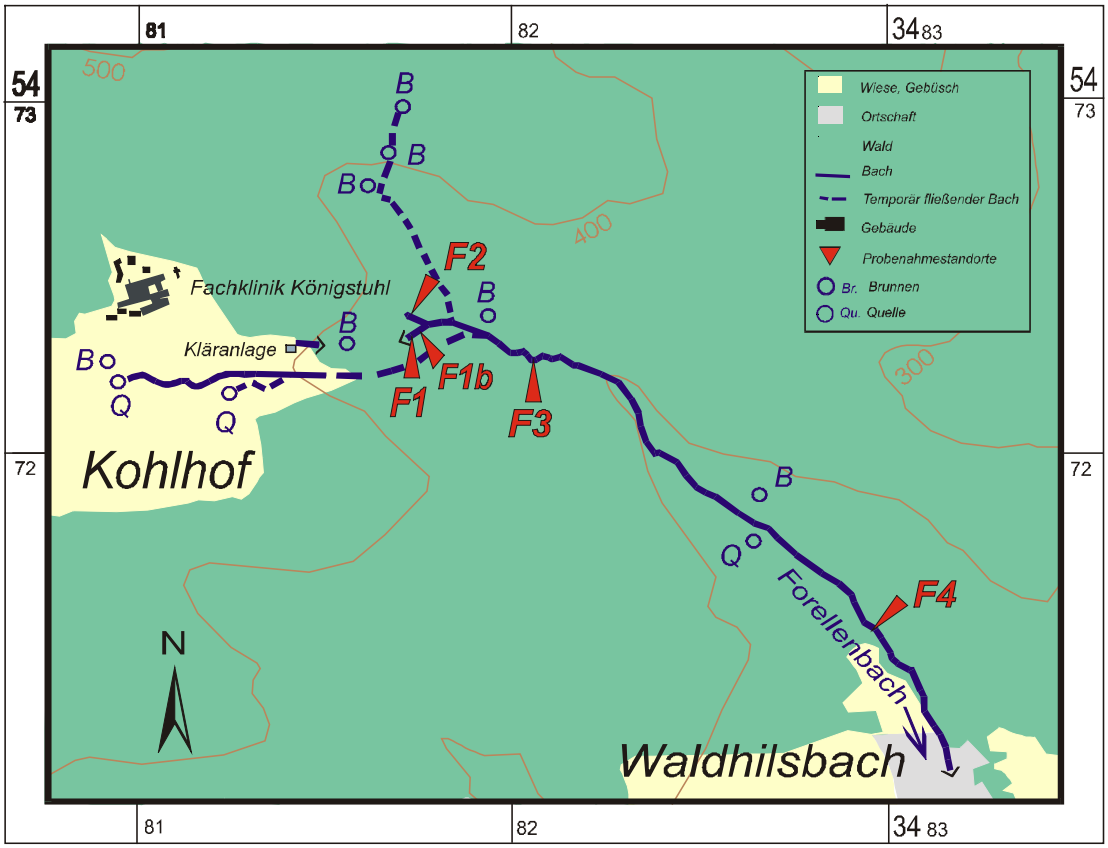


Abb. 4.3. Die bei einer integrierten Sedimenttriade untersuchten Standorte des Forellenbachs, am Südosthang des Königstuhls bei Heidelberg (nach Winn 2000).

Forellenbach weitgehend verdolt, bis er östlich der Ortschaft als Hilsbach wieder in naturnahem Zustand verläuft und nach 1-1,5 km auf einer Höhe von 120 m über NN in die Elsenz mündet. Die Höhendifferenz, die der Forellenbach in seinem Verlauf zurücklegt, beträgt 310 m. Es handelt sich im Oberlauf um einen Bergbach der submontanen Stufe (Braukmann 1987). Bis etwa auf die Höhe der Ortschaft Waldhilsbach durchfließt der Forellenbach zunächst Schichten des Oberen Buntsandsteins, die von Geröllen des Mittleren Buntsandsteins überdeckt werden. Bei Waldhilsbach wechselt der geologische Untergrund zwischen quartären Lehm- und Lößlehm-Ablagerungen und Schichten des Oberen und Mittleren Buntsandsteins. Geochemisch zählt der Forellenbach somit zu dem Grundtyp des gering gepufferten Silikatbergbaches (Bostelmann et al. 1994). Das Niederschlagsmittel am südöstlichen Königstuhl liegt bei 850 - 950 mm/Jahr, die mittlere Jahrestemperatur beträgt 8 – 9 °C. Als Hauptwindrichtung dominieren hier zu 35 % Süd-Südostwinde, aber auch West-Nordwestwinde (26 %) und Nordostwinde (25 %) kommen verhältnismäßig häufig vor (Eichler et al. 1995). Der Forellenbach hat eine Gesamtlänge von 5,3 km, die maximale Bachbettbreite beträgt 2 m und die maximale Tiefe 40 cm. Im Jahr 1999 wurden die Quellbereiche am Königstuhl als Wasserschutzgebiet ausgewiesen. Die Kläranlage Kohlhof ist seit 1999 (ein Jahr nach der Sedimenttriade) stillgelegt, und das anfallende Abwasser wird mit Hilfe einer Freispiegelleitung zunächst in den Sammelkanal Süd geleitet und dann im Klärwerk des Abwasserzweckverbandes Heidelberg gereinigt (Heidelberg 1999). Abb. 4.3 zeigt die Lage aller Probestandorte. Die Standorte Forellenbach 1, 1b, 2 und 3 befanden sich am südlichen Zulauf des oberen Forellenbachs, westlich der Fachklinik Königstuhl. Der Standort Forellenbach 1 (3481 762 E, 5472 377 N) befand sich unterhalb des Austritts eines Abflussrohres einer Kläranlage, die durch Klinikabwässer geprägt wurde, auf 338 m über NN. Der Standort Forellenbach 1b (3481 800 E, 5472 400 N) lag etwa 30 m weiter stromabwärts in einer Höhe von 333 m über NN. Sein Sediment stimmte in der Korngrößenverteilung gut mit dem der Referenzstelle Forellenbach 2 (3481 785 E 5472 425 N) überein, die sich am nördlichen Zulauf des Forellenbachs befand, der aus einem Brunnenüberlauf der Stadtwerke gespeist wird. Der Standort Forellenbach 3 (3481 960 E 5472 350 N) war in einer Höhe von 323 m über NN etwa 200 m unterhalb des Zusammenflusses der beiden Fließgewässerabschnitte lokalisiert. Etwa 1,1 km südöstlich von Forellenbach 3 lag der Standort Forellenbach 4 (3482 950 E, 5471 595 N) auf 235 m Höhe über NN.

Mühlbach

Der Mühlbach entspringt nordöstlich des Heidelberger Stadtteils Handschuhsheim zwischen dem Weißen Stein und dem Hohen Nistler etwa 420 m über NN (Becker 1992). Zunächst in süd-südwestliche Richtung verlaufend, beschreibt er nach etwa 4 km eine Biegung nach Westen. Handschuhsheim durchfließt der Bach größtenteils unter einer Verdolung. Im Handschuhsheimer Feld verläuft er nach Nordwesten, und südlich von Dossenheim endet die Verdolung. Die Länge des Forellenbachs auf der Heidelberger Gemarkung beträgt 7 km. Etwa 1,5 km nach Ende der Verdolung trifft der Mühlbach mit dem von Norden kommenden Dossenheimer Mühlbach zusammen und entwässert in einer Höhe von 105 m über NN als Humpelsgraben in den Neckar (Becker 1992). Der obere Mühlbach durchfließt Schichten des Mittleren Buntsandsteins, im weiteren Verlauf werden hauptsächlich Löß und Lößlehme angeschnitten. Als geochemischer Grundtyp ist er daher den Silikat-Bergbächen mit Übergang zu Karbonat-Bächen zuzuordnen. Der mittlere Jahresniederschlag liegt in der Ebene bei 650 mm und im submontanen Bereich am Berg bei 900 bis 1000 mm, als Windhauptrichtungen dominieren im Jahresmittel N/NE (29%) und W (25%) (Eichler et al. 1995). Fließgeschwindigkeit und Fließverhalten des Mühlbachs sind stark von Gefälle und Verbauung geprägt. Während der mäandrierende obere Mühlbach schnell und turbulent fließt, bewegt sich das Wasser in den ausgebauten Teilabschnitten gleichmäßig schnell und in der Handschuhsheimer Ebene gleichmäßig langsam. Das Bachbett ist im Unterlauf bis zu 2 m breit, die maximale Tiefe beträgt 40 cm. Die Wasserführung ist im wesentlichen permanent, nur an der Spechelsgrundquelle kann es bei geringem Wasserstand zu einer lokalen Versickerung des Mühlbaches kommen (Becker 1992). Abb. 4.4 zeigt den Verlauf des Mühlbaches und

die Lage der untersuchten Standorte. Der Referenzstandort Mühlbach 1 befand sich am Oberlauf im Bereich der Hirschwiese (3479 335 E, 5478 570 N) in 331 mm über NN, der durch intensive Landwirtschaft geprägte Standort Mühlbach 2 am Unterlauf in 108 m über NN (3475 850 E, 5478 275 N).

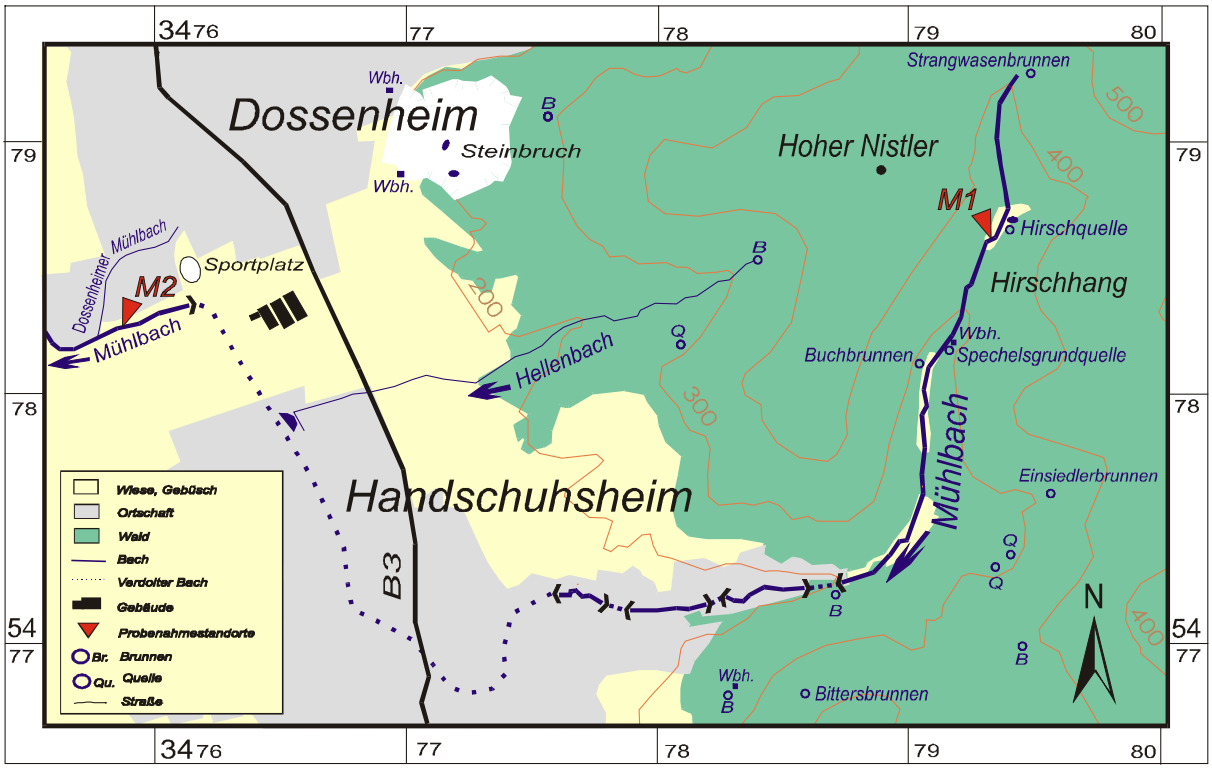


Abb. 4.4. Mühlbach bei Heidelberg (nach Winn 2000). Lage der bei einer Sedimenttriade untersuchte Standorte Mühlbach 1 (M1) und Mühlbach 2 (M2); nach Winn (2000).

4.4.2 Einzugsgebiete mittlerer Größe: Elsenz

Das Einzugsgebiet der Elsenz umfasst etwa 4 % des gesamten Neckareinzugsgebietes und liegt am nordwestlichen Rand des südwestdeutschen Schichtstufenlandes. Es entwässert zum überwiegenden Teil den nördlichen Kraichgau, an den sich die Naturräume des Sandsteinodenwalds (N), des Baulands und Neckarbeckens (E und SE), des Strom- und Heuchelbergs (S) und der Hardtebenen (W) anschließen (Schulte 1995). Die Elsenz besitzt eine Länge von insgesamt 52 Fließkilometer, entspringt etwa 7 km nordwestlich der Ortschaft Eppingen, verläuft nach einem ausgedehnten Bogen nach Südwesten in nördlicher Richtung und mündet bei Neckargemünd in den Neckar. Die Höhendifferenz von der Quelle zur Mündung in den Neckar beträgt 105 m und die mittlere durchschnittliche Jahresabflussrate 4,4 m³/s. Bei Hochwasser kann die Abflussrate auf bis zu 150 m³/s steigen, was zu starken Erosionsereignissen führen kann (Assmann 1998, Barsch et al. 1994a, Schulte 1995). Die wichtigsten Zuflüsse wie der Rotenbach, der Rohrbach, der Zittrichgraben, der Himmelreichsbach und der Hellbach münden unterhalb der Stadt Eppingen in die Elsenz (Assmann 1998). Der in dieser Studie beprobte Oberlauf durchschneidet Schichten des Keupers, der Mittellauf um Sinsheim abwechselnd Muschelkalk- und Keuperschichten, und der Unterlauf ab dem Ort Bammental durchfließt die Buntsandsteinschichten und pleistozänen Schuttdecken des kleinen Odenwalds (Barsch et al. 1986). Durch die hohe naturräumliche Gunst und die fruchtbaren Lößböden wird im Elsenzeinzugsgebiet seit dem Neolithikum eine intensive Landwirtschaft betrieben (Barsch et al. 1989b, Schulte 1995). Als wichtigste land-

wirtschaftliche Produkte werden Getreide und Zuckerrüben, aber auch Sonderkulturen wie Obst und Wein angebaut. Die Stadt Eppingen ist außerdem Handelszentrum für Kartoffeln, Zwiebeln und Äpfel (Assmann 1998). Die Obere Elsenz liegt im Regenschatten des Pfälzer Waldes; der mittlere Jahresniederschlag beträgt 778 mm und entfällt zu 414 mm auf das Sommer- und mit 364 mm auf das Winterhalbjahr. Da die natürlichen Niederschläge für die Bedürfnisse der intensiven Landwirtschaft, die 68,4 % der Gesamtfläche des Elsenz-Einzugsgebietes einnimmt (Schulte 1995), nicht ausreichen, müssen die Kulturflächen künstlich bewässert werden. Bis Mitte der achtziger Jahre kam es im Bereich der Elsenz zu starken Verschmutzungen, da viele Haushalte und Industrieansiedlungen entweder an keine Kläranlagen oder solche mit unzureichender Klärkapazität angeschlossen waren. Besonders problematisch waren eine Gerberei am Schwarzbach, die erhöhte Chrom-Werte bewirkte, sowie die für den hohen Cadmiumgehalt der Elsenz verantwortlichen Galvanik-Betriebe in und unterhalb von Sinsheim (Müller et al. 1993). Zum Teil spiegeln sich die historischen Einleitungen auch heute noch in erhöhten Konzentrationen von Schadstoffen in Altsedimenten wider. Mittlerweile werden alle Abwässer im Elsenzeinzugsgebiet von 12 Kläranlagen mechanisch und biologisch gereinigt. Barsch et al. (1989b) konnten für die Elsenz bei Eppingen einen Schmutzwasseranteil von 28 % ermitteln. Bei einem Abfluss von weniger als 1,8 m³ am Pegel Hollmuth (Mittlerer Niedrigwasserabfluss = 1,45 m³/s) beträgt der Schmutzwasseranteil des gesamten Elsenzabflusses über 50 %, d.h. über die Hälfte des Elsenzwassers stammt aus Kläranlagen! Dementsprechend besitzt im Einzugsgebiet der Elsenz die Effizienz der Kläranlagen eine entscheidende Bedeutung für die Gewässerqualität: Die Kläranlage Eppingen, die zwischen den Probennahmestandorten Elsenz 1 und 2 liegt, wies auch in den

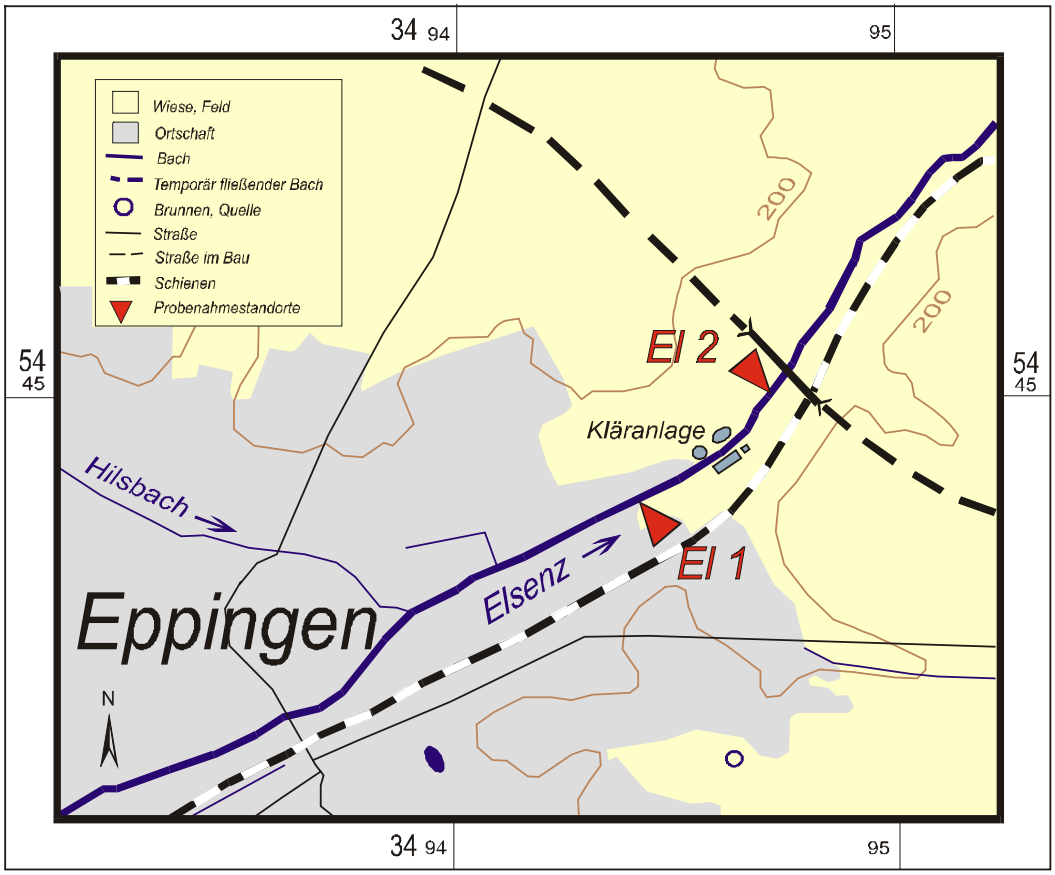


Abb. 4.5. An der Elsenz wurde ein Standort oberhalb (El1)- und unterhalb einer Kläranlage (El2) mit Hilfe einer Sedimenttriade untersucht (nach Winn 2000).

achtziger Jahren wegen einer zu kleinen Vorklärungsanlage schwerwiegende technische Mängel auf (Kryzer 1991) und gilt heute als zu klein dimensioniert (Mündliche Aussage von Herrn Schuhkraft, Geographisches Institut Heidelberg). Die Kläranlage Hilsbach oberhalb des Probennahmestandortes Hilsbach ist durch eine zusätzliche Reinigungsstufe für Nährstoffeinträge wie PO_4^{3-} und NO_3^- verhältnismäßig gut ausgestattet (Kryzer 1991). Abb. 4.5 zeigt die Lage der Probestandorte Elsenz 1 und Elsenz 2, die 200 m oberhalb und 150 m unterhalb der Kläranlage Eppingen lagen. Ein detailliertere Beschreibung der ökomorphologischen Fließgewässersituation beider untersuchter Standorte gibt eine im Rahmen dieser Studie angefertigte Diplomarbeit (Karaus 1999). Die untersuchte Kläranlage befindet sich am nordwestlichen Rand der Ortschaft Eppingen. Die Höhe über NN beträgt für beide Probennahmestandorte etwa 190 m. An dem kleinen Elsenz-Zufluss Hilsbach lag der Referenzstandort Hilsbach, etwa 200 m südlich der Mettelmühle in der Nähe eines Campingplatzes auf einer Höhe von 218 m über NN (Abb. 4.6). Der Hilsbach entspringt nordwestlich der Ortschaft Hilsbach, verläuft nach Südosten durch die Stadt Eppingen und mündet dort etwa 700 m oberhalb der Kläranlage Eppingen in die Elsenz. Neben einer Reihe von landwirtschaftlichen Entwässerungsgräben erhält der Hilsbach zwei kleinere Zuflüsse, den Bruchgraben und den Nesselbach.

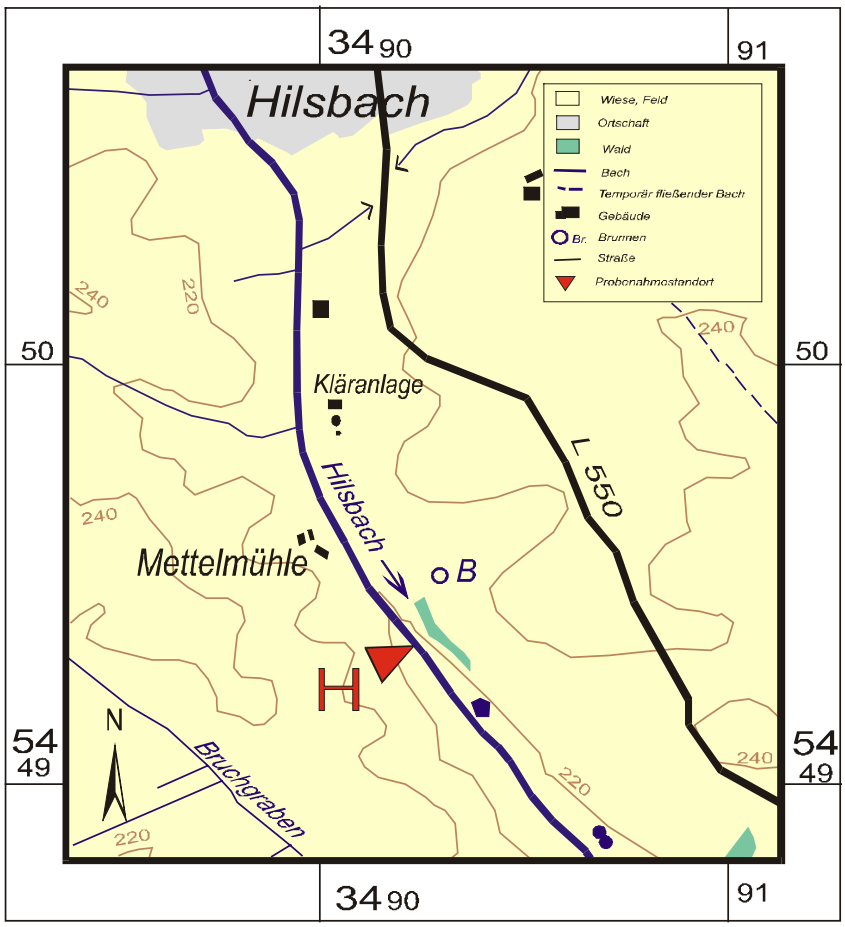


Abb. 4.6. Der Standort Hilsbach, Referenzstandort bei den integrierten Sedimentuntersuchungen für Elsenz 1 und 2 (nach Winn 2000).

4.4.3 Einzugsgebiete großer Größe: eine Flachwasserzone des Neckars bei Eberbach

Bei der untersuchten Flachwasserzone handelt es sich um eine 0,32 ha große Wasserfläche in einer Neckarschleife zwischen den Ortschaften Hirschhorn und Pleutersbach. Sie befindet sich zwischen den Flusskilometern 56,6 und 56,7 an einem Gleithang am linken Neckarufer im Gewann „Im Breitenfeld“. Der im Bereich der Flachwasserzone anstehende geologische Untergrund gehört zum Kleinen Odenwald und besteht aus fein- bis mittelkörnigen Buntsandsteinschichten, die einen hohen Feldspatanteil aufweisen und deren rötliche Färbung auf Eisenoxide zurückgeht. Während die Böden im Odenwald meist aus nährstoffarmen Gemischen aus Quarzsand, Tonmineralien und Karbonaten bestehen, sind die Talauenböden des Neckars oft aus fruchtbarem, schluffigen Lehm gebildet, so dass intensive Landwirtschaft betrieben werden kann. Im Untersuchungsjahr 1998 wurde im angrenzenden Birnbaumäcker Mais angebaut.
Die Flachwasserzone wurde 1991 im Rahmen einer teilweisen Renaturierung der alten Flußauen des Neckars insbesondere als Refugium und Laichgebiet für Fische angelegt (Braunbeck et al. 1995a). Die Zerstörung der Flußauenlandschaften am Neckar ist so weit fortgeschritten, dass der autochthone Fischbestand nur noch durch Besatzmaßnahmen gesichert werden kann. Bei einer Aufnahme von Zooplankton, Makroinvertebraten, Fischfauna und verschiedener limnochemischer Parameter im Rahmen einer Effizienzkontrolle durch Geier im Jahr 1994 ergaben sich außerordentlich geringe Artenspektren

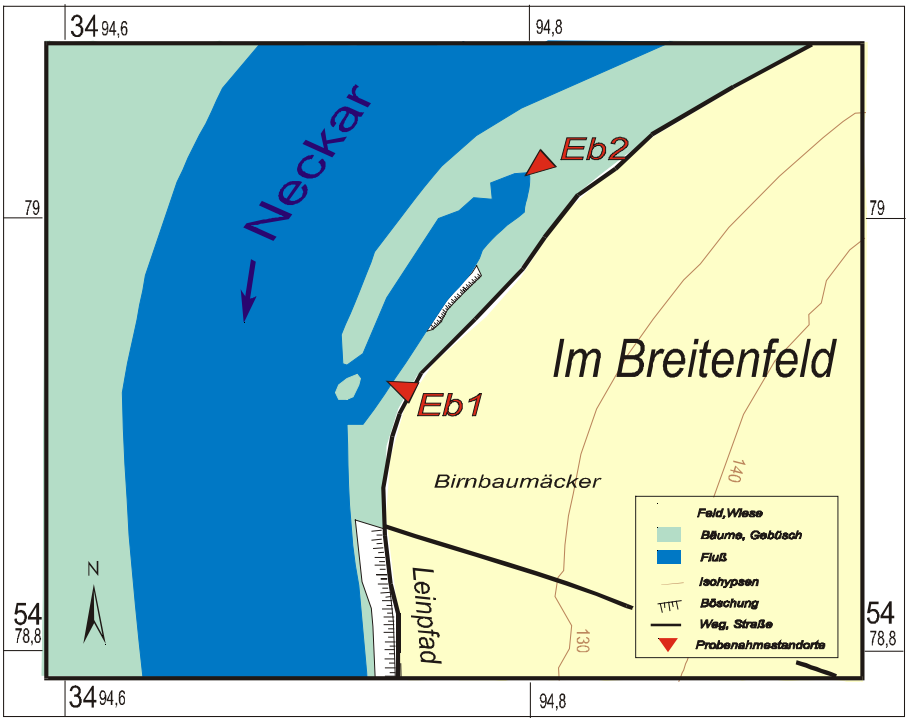


Abb. 4.7. Lage der Triadestandorte Eberbach 1 (Eb 1) und Eberbach 2 (Eb 2) an einer Flachwasserzone am Neckar bei Eberbach. Während bei ausbleibendem Schiffsverkehr innerhalb der Flachwasserzone nur eine minimale Strömung herrscht, resultieren aus der Wasserbewegung bei Schiffsverkehr (Ø alle 20 min) Strömungsverhältnisse mit Wasserstandsschwankungen von bis zu 20 cm. Besonders im hinteren Drittel der Flachwasserzone kommt es aufgrund der verminderten Fließgeschwindigkeit zu einer erhöhten Sedimentation von Schwebstoffen, die sich in einer Schlammschicht von bis zu 40 cm Mächtigkeit manifestiert (Geier 1994). Andererseits entsteht beim Herannahen eines Schiffes ein starker Sog aus der Flachwasserzone heraus, so dass der hintere Bereich der Flachwasserzone in Intervallen von etwa 15 min für kurze Zeit trockenfällt. Kartengrundlage: nach Winn (2000).

und einseitige Dominanzstrukturen, die mit schlechten abiotischen Lebensbedingungen (etwa Ammoniumkonzentrationen bis 13 mg/L und Nitritkonzentrationen bis 3,8 mg/L) korreliert werden konnten (Geier 1994). Das Artenspektrum an Fischen in der Flachwasserzone am Neckar bei Eberbach umfasste insgesamt 12 Arten, wobei jedoch ca. 78 % der Individuen auf den ausgesprochen anspruchslosen und robusten Döbel (*Leuciscus cephalus*) entfielen. Gründling (*Gobio gobio*) und Rotauge (*Rutilus rutilus*) als die beiden nächsthäufigsten Arten umfassten nur etwa ca. 5 % der nachgewiesenen Individuen (Gesamtzahl: 557). In analoger Weise war die Makroinvertebratenfauna der Flachwasserzone bei Eberbach durch eine ausgesprochene Artenarmut geprägt. Das Artenspektrum der Makroinvertebraten wurde in erster Linie von *Corbicula fluminea* (Bilvalvia), *Asellus aquaticus* (Crustacea) und Vertretern der Chironomini-, bzw. Chironomus-plumosus-Gruppe dominiert. Die limnochemischen Befunde ließen für die Flachwasserzone eine starke Eutrophierung erkennen, die aus einer Erosion von angrenzenden landwirtschaftlichen Flächen und der latent vorhandenen Belastung des Neckar resultierte (Geier 1994). Die Artenfehlbeträge und das Fehlen empfindlicher Arten bei dieser Effizienzkontrolle konnten mit einer erhöhten partikelgebundenen Cytotoxizität korreliert werden (Braunbeck et al. 1995a, Hollert et al. 1999a). Das acetonische Extrakt erwies sich dabei mit 250 mg/ml als 600 % toxischer als das wässrige Eluat, so dass der überwiegende Teil der zellschädigenden Wirkung für die lipophilen, wasserunlöslichen Substanzen detektiert werden konnte. Die hohe Cytotoxizität des Porenwassers (60 % Schädigung der RTG-2-Zellen bei einer 1:1-Verdünnung) konnte über temporäres Trockenfallen der hinteren Abschnitte der Flachwasserzone mit einer Anreicherung leicht austauschbarer Metallbindungsformen oder mit einer Freisetzung von Ammonium aus dem Porenwasser erklärt werden (Hollert et al. 1999a). Aufgrund der vorhergehenden Befunde wurde die Flachwasserzone im Rahmen dieser Studie mit zwei Probennahmestandorten mit einer Sedimentbewertungstriade untersucht. Es sollte der hintere, durch Wasserstandsschwankungen temporär trockenfallende Bereich der Flachwasserzone (Abb. 4.7, Eb 2, 3494 800 E, 5479 019 N) mit einem Abschnitt vergleichbarer Sediment-Korngrößenverteilung nahe des Übergangs der Flachwasserzone zum Neckar (Eb1, 3494 736 E, 5479 019 N) verglichen werden, um Aussagen zur Art des ökotoxikologischen Schädigungspotentials und den ökologischen Veränderungen seit der Effizienzkontrolle 1994 an der Flachwasserzone machen zu können. Eine ausführliche Beschreibung der ökomorphologischen Situation der beiden untersuchten Standorte gibt Karaus (1999).

4.5 Ergebnisse und Diskussion: Chemische Analysen

Zusammenfassung. *Im Rahmen einer integrierten Untersuchung von 12 Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars wurden limnochemische Untersuchungen sowie chemische Analysen des Oberflächenwassers und der Sedimente durchgeführt.*

- *Nitrit, Nitrat, Ammonium und Ortho-Phosphat dominierten vor allem bei den Standorten nach Kläranlageneinleitungen (LAWA-Güteklassen III oder IV). In einer Flachwasserzone des Neckars bei Eberbach konnten hohe Ammoniumkonzentrationen in Kombination mit pH-Werten von 7,5 bis 8 und hohen Temperaturen gemessen werden, so dass eine Verschiebung des Ammonium/Ammoniak-Gleichgewichtes in Richtung des stark fischtoxischen Ammoniak angenommen werden kann. Während die meisten Oberflächenwässer den AOX-Grenzwert für freifließende Gewässer von 30 µg/L unterschreiten, konnte für den Forellenbach nach einer Kläranlageneinleitung eine kritische bis starke Belastung (120 µg/L) festgestellt werden.*
- *Eine Analyse des Oberflächenwassers auf endokrine Schadstoffe ergab 18 ng/L Octylphenol, 48 ng/L Nonylphenol und 87 ng/L Bisphenol A in dieser Probe. Das Steroidhormon Estron konnte insbesondere nach den Kläranlageneinleitungen (2,5 und 10,8 ng/L) nachgewiesen werden. Auch Atrazin ließ sich in der Hälfte der untersuchten Wasserproben insbesondere an stark landwirtschaftlich geprägten Standorten des Elsenz-Einzugsgebietes und der Neckarflachwasserzone in Konzentrationen von 7-55 ng/L nachweisen.*
- *Für fast alle Sedimentproben konnte nach einem HNO_3-Aufschluss eine verhältnismäßig geringe Belastung (Güteklassen von I bis II nach LAWA 1998) mit Chrom, Cadmium, Blei, Nickel, Mangan und Lithium nachgewiesen werden. Ähnlich wie nach dem HNO_3-Aufschluß konnten auch für die Porenwässer durchweg hohe Kupferkonzentrationen (bis 80 µg/L) nachgewiesen werden, die bei einer direkten Exposition von Fischen bereits zu einer Reihe von toxischen Effekten führen würden. Am Forellenbach fiel weiterhin die hohe Belastung der Porenwässer (Güteklassen IV-V für Nickel, Blei, Kupfer, Cadmium) und Fb4 (Güteklassen III-IV für Nickel, Blei, Kupfer) auf. Gravierend erhöhte sich die Summe der PAHs im Verlauf des Mühlbachs von 0,2 (Güteklasse I) auf 12,5 mg/kg (Güteklasse IV). Bei zwei Sedimentproben konnten mit 0,055 und 0,068 mg/kg Trockengewicht hohe Konzentrationen an PCB 138 und 153 nachgewiesen werden, so dass die Proben nach dem Klassifikationsverfahren der ARGE-Elbe für diese Stoffe in die schlechteste Güteklasse IV eingeteilt wurden.*
- *Bei einer Analyse endokrin wirkender Verbindungen wurden in den untersuchten Sedimentextrakten der Triade Phthalate, Alkylphenole, PCBs und Bisphenol A nachgewiesen. Dibutylphthalat als dominierende Substanz konnte in allen Sedimenten in Konzentrationen bis zu 2,4 mg/kg nachgewiesen werden. In einer Probe nach einer Kläranlageneinleitung konnten weiterhin deutlich erhöhte Konzentrationen von Nonylphenol (5 mg/kg), Octylphenol und Bisphenol A bestimmt werden.*

4.5.1 Physikalisch-limnochemische Parameter

Die physikalisch-limnochemischen Parameter der untersuchten Oberflächengewässer sind in Tab. 4.5 dargestellt und gemäß der Richtlinien der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA 1998) klassifiziert. **Wasserfärbung** und **-geruch** waren nur an den beiden Elsenz-Standorten (El1, El2) und am Standort Forellenbach 1 (Fb1) auffällig. Eine erhöhte **elektrischen Leitfähigkeit** konnte für die Standorte Elsenz 1, 2 und Hilsbach (Hil) mit 900-1200 µS/cm und die Flachwasserzone des Neckars bei Eberbach (Eb1, Eb2; 850-880 µS/cm) nachgewiesen werden. Bei den beiden Standorte nach Kläranlageneinleitungen (Eb2, Fb1) erhöhte sich die Leitfähigkeit jeweils signifikant gegenüber den Referenzen, ansonsten konnten erhöhte Leitfähigkeiten mit löß- und karbonatreichen Einzugsgebieten erklärt werden. Bei den **Wassertemperaturen** wurden an allen Standorten die Zielvorgaben des Landes Baden-Württemberg für frei fließende Gewässer im Neckareinzugsgebiet und den gestauten Neckar eingehalten (LAWA 1998). Der niedrige **Sauerstoffgehalt** der beiden Standorte in der Neckarflachwasserzone wurde mit 4,9 mg/L (Eb1) und 4,1 mg/L (Eb2) jeweils in die Klasse III (erhöhte Belastung) eingeordnet (LAWA 1998). Die geringen Sauerstoffkonzentrationen resultierten aus den hohen Wassertemperaturen und am Standort Eberbach 2 vermutlich aus einer Sauerstoffzehrung in Kombination mit dem höheren TOC und BSB durch permanente Sedimentresuspension. Die **pH-Werte** können, abgesehen von den Standorten Fb1 und Fb2, durch die Pufferkapazitäten der anstehenden Substrate erklärt werden. Die für Buntsandsteingewässer hohen pH-Werte im Oberlauf des Forellenbachs (8 und 9) sind durch den hohen Anteil von Abwasser (Fb1) und durch die Kalkung des Wassers in dem Wasserbehälter oberhalb des Standortes Fb2 zu erklären. Am Regenerationsstandort des Forellenbachs konnte mit 6,1 wieder ein charakteristischer pH-Wert für Fließgewässer im Buntsandstein ermittelt werden (Braukmann & Vobis 1998).
Tab. 4.5. gibt einen Überblick über die **Redoxpotentiale** des Wassers und Abb. 4.8 über den *In situ*-Redoxzustand der Sedimente. Für alle Wasserproben konnten positive Redoxpotentiale ermittelt werden; diese Befunde korrelieren gut mit den Sauerstoffkonzentrationen. Die Redoxprofile der untersuchten Sedimente (unterschiedliche Tiefen, je nach Elektrodendurchlässigkeit des Sedimentes) ergaben ein differenzierteres Bild: Während bei fast allen Sedimenten positive Redoxspannungen nachgewiesen werden konnten, sanken sie bei den Standorten El1 und Eb2 schon in geringer Tiefe in den

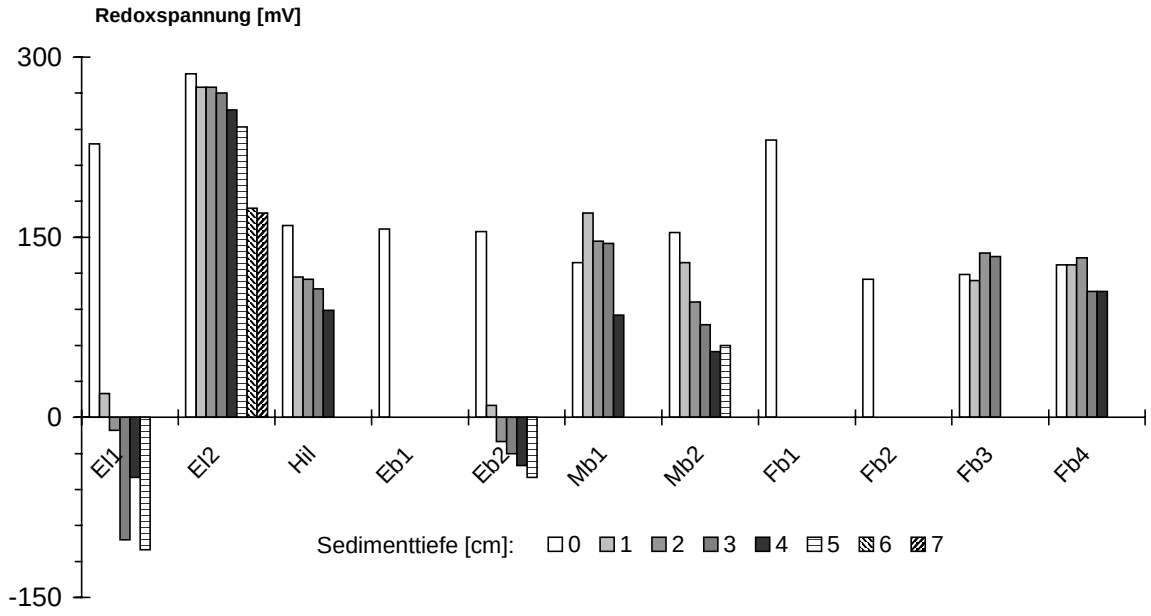


Abb. 4.8. Vertikale Profile der Redox-Spannungen der Fließgewässersedimente. Nach Winn (2000).

Tab. 4.5 Übersicht über physikalisch-limnochemische Kenngrößen und Summenparameter, die bei einer Sedimenttriade im Einzugsgebiet des Neckars für das Kompartiment Wasser ermittelt wurden.

			Forellenbach			**Mühlbach**		**Elsenzgebiet**			**Eberbach**	
	Einheit	Fb1	**Fb2**	Fb3	Fb4	**Mb1**	Mb2	**Hil**	El1	El2	**Eb1**	Eb2
Physikalisch-limnochemische Parameter												
Farbe	qualitativ	braun-rosa	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	leicht braun	unauffällig	unauffällig	unauffällig
Geruch	qualitativ	Abwasser	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	H_2S	unauffällig	unauffällig
Leitfähigkeit	µS/cm	604	225	316	146	95	341	841	1098	1186	841	879
Temperatur	°C [a]	18,2	11,7	14	12	16	18,6	21,4	14,6	17,3	25,6	19,7
pH-Wert		7,9	9,2	7,2	6,1	6	7,5	8,2	7,7	7,7	7,5	7,6
Sauerstoff	mg/L	9,9 (I)	11,1 (I)	9,2 (I)	9,8 (I)	8,8 (I)	7,5 (II)	9,6 (I)	8,1 (I)	7,9 (II)	4,9 (III)	4,1(III)
Sauerstoff	%	99	111	92	93	93	76	98	82	80	60	43
Redoxpotenzial (W)	mV	142	122	140	137	280	107	160	256	276	157	208
Gesamthärte	°dH	4	1	5	3	4	7	25	26	32	19	18
Carbonathärte	°dH	1	1	3	1	1	9	20	22	26	13	16
Nitrit	mg/L [a]	0,23 (III)	0,01 (I)	0,04 (I-II)	0,01 (I)	0,01 (I)	0,07 (II)	0,11 (II-III)	0,08 (II)	0,5 (III-IV)	0,11 (II-III)	0,15 (II-III)
Nitrat	mg/L [a]	126 (IV)	17 (III-IV)	50 (IV)	19 (III-IV)	10 (III)	10 (III)	18 (III-IV)	22 (IV)	16 (III-IV)	14 (III-IV)	11 (III-IV)
Ammonium	mg/L [a]	1 (III)	0,01 (I)	0,5 (II-III)	0,01 (I)	0,5 (II)	0,5 (II)	0,17 (II)	0,08 (I-II)	13,4 (IV)	0 (I)	1 (III)
Ortho-Phosphat	mg/L [a]	8,0 (IV)	<0,03 (I-II)	3,1 (IV)	0,4 (III)	<0,01 (I)	<0,01 (I)	1 (IV)	0,14 (II-III)	0,4 (III-IV)	0,24 (III)	0,17 (II-III)
Sulfat	mg/L [a]	44 (I-II)	28 (I-II)	27 (I-II)	13 (I)	35 (I-II)	42 (I-II)	86 (II)	243 (III)	225 (III)	148 (II-III)	151 (II-III)
Chlorid	mg/L [a]	58 (II)	33 (I-II)	33 (I-II)	17 (I)	4,7 (I)	15 (I)	57 (II)	42 (I-II)	56 (II)	750 (III-IV)	738 (III-IV)
Summenparameter												
BSB_5	mg/L [a]	70 (III-IV)	9 (II-III)	9 (II-III)	7 (II-III)	36 (III-IV)	18 (III-IV)	29 (III-IV)	81 (III-IV)	76 (III-IV)	60 (III-IV)	42 (III-IV)
$KMnO_4$ als O_2	mg/L	5,3	0,4	1,8	0,9	2,38	0,83	12,8	3,5	7	2,4	2,8
SAK_{254}	AE	2,07	0,63	1,21	0,79	0,83	0,30	10,3	2,3	6,3	9,6	12,3
AOX (ohne Schwebstoffe)	µg/L [a]	120 (III-IV)	5 (I-II)	43 (II-III)	16 (II)	12 (II)	10 (I-II)	6 (I-II)	17 (II)	15 (II)	17 (II)	29 (II-III)
AOX (mit Schwebstoffen)	µg/L [a]	121 (III-IV)	9 (I-II)	45 (II-III)	17 (II)	12 (II)	9 (I-II)	17 (II)	27 (II-III)	17 (II)	42 (II-III)	34 (II-III)

[a] Klassifikation Gewässergüteklassen nach LAWA (1998). Die Referenzstandorte wurden fett und grau unterlegt dargestellt.

aerobe als auch anaerobe Vorgänge ablaufen (Rump & Krist 1992). Schon ab 3 cm Tiefe herrschten bei El1 Redox-Spannungen von unter -100 mV vor, so das hier mit Sulfatreduktion gerechnet werden muss (Ahlf et al. 1999, Klee 1993). Bemerkenswert war der große Unterschied der Redoxprofile von El1 und El2, obwohl die Probenstandorte weniger als 500 m auseinander lagen und die Sedimente sich in ihrer Korngrößenverteilung weitgehend glichen: Die bis in 7 cm Tiefe aeroben Bedingungen im Sediment El2 sind daher aller Wahrscheinlichkeit nach auf den Einfluss der Kläranlage Eppingen zurückzuführen.

Bei der **Gesamt-** und **Karbonathärte** des Wassers fielen beinahe alle Werte entsprechend ihres geologischen Untergrunds aus (Braukmann 1987). So spiegelten sehr hohe Härtegrade bei der Elsenz und beim Hilsbach (Gesamthärte 25-32 °dH, Karbonathärte 20-26 °dH) löß- und karbonatreichen Untergrund wider, während das vom Buntsandstein geprägte Wasser des Forellenbachs und des oberen Mühlbachs sehr weich war (Mb1, Gesamthärte 1-5 °dH, Karbonathärte 1-3°dH). Lediglich beim unteren Mühlbach (Mb2, Gesamthärte 7°dH, Karbonathärte 9°dH) waren höhere Härtegrade zu erwarten, außerdem lag hier der Wert der Karbonathärte über dem der Gesamthärte, was auf einen erhöhten Gehalt an Natriumbicarbonat hinweist (Klee 1993).

Erhöhte bis sehr hohe Konzentrationen der Nährstoffe **Nitrit, Nitrat, Ammonium** und **Ortho-Phosphat** dominierten vor allem bei den Standorten nach Kläranlageneinleitungen (El2 und FB1). Die Gewässergüte dieser Standorte wurde jeweils mit den LAWA-Güteklassen III (erhöhte Belastung) oder IV (sehr hohe Belastung) klassifiziert. Am Standort El1 war die extrem hohe Nitratbelastung von 22 mg/L (Güteklasse IV) auffällig. Die hohen Nitrit- und Ammoniumkonzentrationen, die bei El2 unterhalb der Kläranlage gemessen wurden, könnten auf Denitrifikationsprozesse hinweisen (Ahlf et al. 1999). Dies würde auch mit den gemessenen Redox-Spannungen übereinstimmen (Tab. 4.5 und Abb. 4.8). Insgesamt konnte unterhalb der Kläranlage Eppingen eine relative Verschlechterung der Belastungssituation bezüglich der Nährstoffe festgestellt werden. Da ein pH-Wert über 7 gemessen wurde, muss davon ausgegangen werden, dass sich bereits ein Teil des Ammoniums bei El2 in das stark fischtoxische Ammoniak umgewandelt hat (Gunkel 1994a). In der Wasserprobe Hilsbach fanden sich sowohl hohe Nitrat-, Nitrit- als auch Ortho-Phosphatgehalte, was an diesem Standort auf Düngemaßnahmen bei den angrenzenden landwirtschaftlichen Flächen oder die Einleitung einer Kläranlage oberhalb der Probestelle zurückzuführen ist.

Bei der Flachwasserzone Eberbach fielen ebenfalls erhöhte Nährstoffkonzentrationen, insbesondere bei Nitrat auf. Die hohe Ammoniumkonzentration am Standort Eb2 in Kombination mit pH Werten von 7,5 bis 8 und hohen Temperaturen erscheinen insbesondere vor dem Hintergrund des Ammonium/Ammoniak-Gleichgewichtes und der Nutzung der Flachwasserzone als Laichrefugium für Fische als problematisch (Gunkel 1994a). Die Ergebnisse der Wasseruntersuchungen an den Standorten des Mühlbachs weisen auf eine erhöhte Nitrat- und eine deutliche Ammoniumbelastung hin. Beim Standort Mb2 muss ebenfalls mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der Ammoniakbildung gerechnet werden (pH-Wert = 7,5). Am Forellenbach konnten vor allem hohe Gehalte an Nitrat und Ortho-Phosphat gemessen werden. Insbesondere bei den Nitratkonzentrationen ergaben sich an den Standorten Fb1 und Fb3 Extremwerte, die in der Kläranlageneinleitung begründet liegen. Tab. 4.5. zeigt eine deutliche Verringerung der Nährstoffbelastung des Forellenbaches in Fließrichtung. So wurde am Standort Fb1 zum Beispiel eine Nitratkonzentration von 126 mg/L gemessen, bei Fb3 50 mg/L und bei Fb4 nur noch 19 mg/L. Das Wasser am Referenzstandort Fb2 war, abgesehen von einem ebenfalls hohen Nitratgehalt, durch Nährstoffe von allen Standorten am geringsten belastet (Tab. 4.5). Nach den Zielvorgaben der LAWA (1998) für freifließende Gewässer im Neckareinzugsgebiet und für den gestauten Neckar waren die Nitrit-Werte aller Standorte mit Ausnahme von Mb1, Fb2 und Fb4 erhöht. An den Standorten El2, Eb2 und Fb1 wurden die Ammonium-Werte überschritten. Erhöhte Ortho-Phosphat-Konzentrationen zeigten sich bei El2, Hil, Eb1, Fb1, Fb3 und Fb4. Die Zielwerte für Nitrat konnten an keinem der Probennahmestandorte eingehalten werden.

Das Wasser der Standorte des Mühlbachs, des Forellenbachs und des Hilsbachs konnte hinsichtlich der **Sulfat-** und **Chloridkonzentration** als unproblematisch eingestuft werden. Im Gegensatz dazu konnte an den Standorten El1, El2, Eb1 und Eb2 erhöhte Sulfatgehalte (Gewässergüteklassen II-III) festgestellt werden, die sich an der Elsenz auf den geogenen Untergrund mit seinen gipshaltige Schichten des mittleren und oberen Keupers zurückführen lassen (Winn 2000). Die erhöhte Chloridbelastung der Flachwasserzone Eberbach (Eb1, Eb2) kann auf landwirtschaftliche Düngesalze (Brehm & Meijering 1990) und Ladeverluste im Heilbronner Salzhafen (Pinter 1991) zurückgeführt werden.
Beim **Spektralen Absorptionskoeffizient 254 nm** (SAK_{254}) als Summenindikator für die Menge an gelösten organischen Inhaltsstoffen mit konjugierten Doppelbindungssystemen fällt eine Belastung der Standorte El1, El2, Hil, Eb1, Eb2 und Fb1 auf. Die Abwassereinleitungen der Kläranlage Eppingen bewirkten eine Zunahme des SAK_{254} um 200 % gegenüber dem Standort El1 oberhalb der Kläranlage. Die hohe Belastung des Hilsbachs kann durch eine Kläranlageneinleitung oberhalb des Probennahmestandortes oder durch landwirtschaftliche Gewässereinträge erklärt werden. Auch die Kläranlage am Kohlhof bewirkte eine signifikante Zunahme des SAK_{254} am Standort Fb1 gegenüber der Referenz Fb2, wobei im weiteren Verlauf des Fließgewässers eine deutliche Verbesserung der SAK_{254}-Werte festgestellt werden konnte, die auf eine Verdünnung der gelösten organischen Inhaltsstoffen der Punktquelle oder eine Adsorption an Partikeln zurückzuführen ist.
Eine Untersuchung des **Kaliumpermanganatverbrauches** (Summenparameter für oxidierbare organische Stoffe im Wasser) ergab eine geringe Belastung des Wassers und eine gute Korrelation mit dem SAK_{254}.
Die **AOX-Werte** der Wasserproben fast aller Standorte der Sedimentbewertungstriade lagen im Bereich der Gewässergüteklasse II (mäßig belastet) oder II-III (mäßig bis kritisch belastet, Tab. 4.5). Abb. 4.9 zeigt die hohe Belastung des Forellenbachs nach der Kläranlageneinleitung mit organischen Halogenverbindungen (Güteklasse III-IV, kritisch bis stark belastet) in Vergleich zur geringer belasteten Referenz Fb2. Auch bei diesem Parameter wird die Regeneration der Wasserqualität des Forellenbaches in Fließrichtung deutlich. Verantwortlich für die hohe AOX-Belastung von Fb1 könnte ein hoher Anteil von Klinikabwasser am eingeleiteten Gesamtabwasser sein: Reinigungs-, Desinfektions- und Lösungsmittel sind als wichtige Quellen für organische Halogenverbindungen bekannt (LfU 1997). Der von der LAWA (1998) angegebene AOX-Zielwert von 30 µg/L für freifließende Gewässer im Neckareinzugsgebiet und für den gestauten Neckar wird von den Proben Eb1, Eb2 (jeweils unfiltriert), Fb1 (filtriert und unfiltriert) und Fb3 (filtriert und unfiltriert) überschritten. Insgesamt zeigt das Verhältnis der AOX-Werte von filtrierten zu unfiltrierten Proben (Abb. 4.9), dass fast alle halogenierten Verbindungen der Mühlbaches und Forellenbaches nicht schwebstoffgebunden, sondern gelöst vorlagen. Dies bedeutet entweder, dass der Schwebstoffgehalt im Wasser gering war, oder dass ein Großteil der Halogenverbindungen durch direkten (Abwasser) oder indirekten Eintrag (Niederschlag) ins Wasser gelangt sind (Hammer 1995). Im Gegensatz dazu konnte über den Vergleich der filtrierten mit den unfiltrierten Proben an den Proben Hil und Eb1 eine

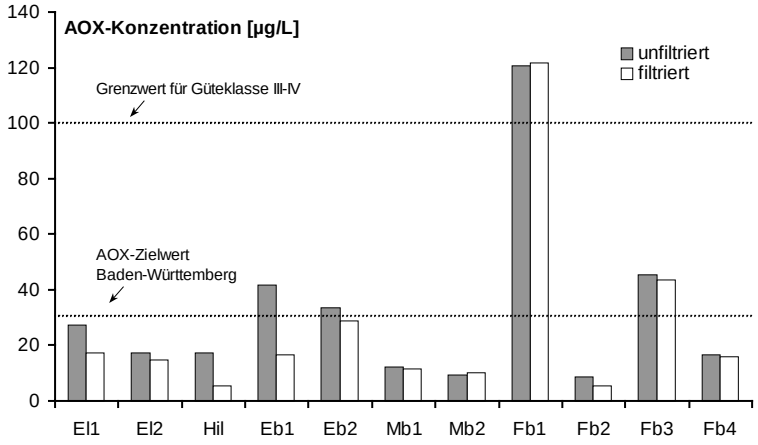


Abb. 4.9. AOX-Konzentrationen von filtrierten und unfiltrierten Wasserproben bei der Sedimentbewertungstriade. Es ist der Zielwert für AOX in Baden-Württemberg und der Grenzwert der AOX-Güteklasse III-IV (kritisch bis stark belastet; nach LAWA 1998) angegeben.

Dominanz von schwebstoffgebundenen Halogenen nachgewiesen werden. Keppler et al. (2000) sowie Schöler und Haiber (1997) beschreiben neben den anthropogenen auch die Existenz von natürlichen AOX-Quellen. Dabei konnten teilweise extrem hohe AOX-Konzentrationen gemessen werden (Seesedimente/Interstitialwasser mit AOX-Gehalten von >400 µg/L, datierter Sedimentkern mit AOX-Gehalten von >90 mg/kg vor 1880). Als biogene Quellen haben Mikroorganismen, Vegetation und die enzymatische Halogenierung bereits vorhandener organischer Verbindungen eine Bedeutung (Schöler & Haiber 1997). Beim Forellenbach kann durch die deutlichen Unterschiede zwischen dem Standort nach der Kläranlageneinleitung und der Referenz, der Großteil der AOX-Belastung auf anthropogene Quellen zurückgeführt werden.

4.5.2 Chemische Analysen von Substanzen mit endokriner Wirkung

Tab. 4.6 gibt einen Überblick über endokrin wirkende und vermutlich endokrin wirkende Substanzen, die in den Wasserproben der Standorte der Sedimenttriade von Herrn Dr. Holtey-Weber (Hygiene-Institut, Universität Bonn) analysiert wurden.
Die ermittelten Konzentrationen der **Phthalate** von mehreren 100 ng/l variieren bei den untersuchten Wasserproben nur gering, so dass erneut die nahezu ubiquitäre Verbreitung dieser Stoffgruppe dokumentiert werden konnte (umfassende Literaturübersichten bei Holtey-Weber 2000). Diethylhexylphthalat war mit Konzentrationen von 600-3000 ng/L die dominanteste Verbindung.
Im Gegensatz dazu konnten für **Alkylphenole** und **Bisphenol A** deutliche Konzentrationsunterschiede ermittelt werden: Die höchsten Konzentrationen dieser Substanzen konnten mit 18 ng/L Octylphenol, 48 ng/L Nonylphenol und 87 ng/L Bisphenol A im Oberflächenwasser des Forellenbaches nach der Abwassereinleitung (Fb1) detektiert werden. Fb2 als nicht von der Kläranlage beeinflusster Nebenarm zeigte nur geringe Konzentrationen (unterhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, bzw. 9,4 ng/L Bisphenol A). Die Abnahme der Alkylphenole bei F3 kann auf Verdünnungseffekte und bei F4 auf Abbau und/oder Adsorption an sedimentierende Partikel zurückgeführt werden. Trotz einer freiwilligen Verzichtserklärung des Industrieverbandes Körperpflege und Waschmittel (1986) werden Alkylphenole auch heute noch vereinzelt in Formulierungen von Reinigungsmitteln eingesetzt (Frey 2000), aus denen sie dann über den Abbau von Alkylphenoxyethoxylaten freigesetzt werden. Neben den in Krankenhäusern in großen Mengen eingesetzten Reinigungsmitteln als Quelle für Alkylphenole könnte Bisphenol A aus Bedarfsgegenständen (Plastikteller) aus dem Küchenbereich und Polycarbonat-Geräten durch starke Reinigungsmittel extrahiert worden sein (Holtey-Weber 2000). Gleichermaßen zu interpretierende Werte zeigte der Vergleich der beiden Entnahmestellen der Elsenz: Octylphenol war schon vor der Kläranlage (El1) in diesem Fließgewässer enthalten, wogegen Nonylphenol und Bisphenol A erst nach der Kläranlage (El2) nachzuweisen waren. Die Gründe für den Nachweis von Bisphenol A liegen in der vielfältigen Verwendung einer großen Bandbreite von Kunststoffen (es existieren viele Polycarbonat-Mischkunststoffe), aus denen das Monomer Bisphenol A ausgewaschen werden und über häusliche, industrielle und Straßenabwässer in Richtung Kläranlage getragen werden kann (Bätscher et al. 1999, Staples et al. 1998). Nonylphenol wird ebenfalls in Unterbodenschutz für Fahrzeuge verwendet, so dass Straßenabwässer zur Kontamination beitragen (Frey 2000). Die Belastung der untersuchten Oberflächengewässer mit Alkylphenolen kann abgesehen von F1 als relativ gering angesehen werden, zumal die meisten nachgewiesenen Konzentrationen von Nonylphenol (<NG bis ca. 20 ng/L) noch deutlich unter denen des von Holtey-Weber (2000) mit der gleichen Methodik analysierten Trinkwassers (30-36 ng/L) lagen.
Bischlorphenylsulfon (BCPS) konnte im Oberflächenwasser des Hilsbach (Hil, 13,9 ng/L) und in der Flachwasserzone Eberbach (Eb2, 10,4 ng/L) nachgewiesen werden. BCPS ist eine erst in jüngerer Zeit bekannt gewordene Kontaminante, die in Flüssen und der Ostsee nachgewiesen werden konnte (Olsson & Bergman 1995). Durch ihre hohe strukturelle Ähnlichkeit mit DDT und PCB und Persistenz gegen Abbauvorgänge muss sie zumindest im Verdacht stehen, ähnliche endokrine Wirkungen zu be-

Tab. 4.6. Übersicht über endokrin wirksame Substanzen**,** die bei einer Sedimenttriade im Einzugsgebiet des Neckars im nativen Oberflächenwasser nachgewiesen werden konnten. Die Messungen wurden von Roman Holtey-Weber (Hygiene-Institut Bonn) durchgeführt.

					Forellenbach			**Mühlbach**			**Elsenzgebiet**		**Eberbach**		
		NG	**BG**	Fb1	**Fb2**	Fb3	Fb4	**Mb1**	Mb2	**Hil**	El1	El2	**Eb1**	Eb2	TW
Atrazin	ng/L	1	2,5	<NG	7,3	<NG	<NG	<NG	<NG	31,7	20,8	10,3	55	47,1	43,2
α-Endosulfan	ng/L	5	10	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
β-Endosulfan	ng/L	5	10	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	ng/L	2,5	5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Bischlorphenylsulfon	ng/L	5	10	<NG	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	13,9	<BG	<NG	<BG	10,4	<BG
Diethylphthalat	ng/L	10	20	<NG	360	1000	221	315	278	<NG	256	45,8	353	1000	235
Benzylbutylphthalat	ng/L	10	20	103	118	119	45,6	84,7	73,8	333	66,4	17,9	213	152	106
Dibutylphthalat	ng/L	50	100	134	129	109	107	140	116	77,8	107	38,8	130	193	94,6
Diethylhexylphthalat	ng/L	100	200	1400	3000	1600	1800	1500	2200	2000	3000	600	1700	1900	2000
p, p´DDE	ng/L	0,5	1	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p´DDT	ng/L	10	25	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p´DDT	ng/L	2,5	5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 28	ng/L	0,5	1	<NG	2,5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	ng/L	0,5	1	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101	ng/L	0,25	0,5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	6,8	<NG	<NG	5,5	<NG	<NG
PCB 138	ng/L	0,25	0,5	<NG	3,4	7,7	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	6,8	<NG
PCB 153	ng/L	0,5	1	<NG	3,2	6,8	2,6	<NG	<NG	2,9	3,2	<NG	3,4	5,6	2,4
PCB 180	ng/L	0,1	0,25	<NG	<NG	5,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	ng/L	0,5	1	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol [D]	ng/L	2,5	5	17,8	<NG	5,1	<BG	<BG	<BG	6,5	9,5	10,1	<BG	<BG	<NG
Techn. Nonylphenol [D]	ng/L	5	10	48	<BG	<BG	<BG	15,9	<BG	<BG	<NG	19,1	<BG	14,4	<NG
Bisphenol A [D]	ng/L	1	2	86,7	9,4	10,7	2,3	<NG	4,3	15,6	<BG	71,1	8,4	27,4	3,7
Diethylstilbestrol [D]	ng/L	0,5	1	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol [D]	ng/L	1	2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron [D]	ng/L	0,5	1	2,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron [D]	ng/L	0,25	0,5	2,5	<NG	<NG	<NG	<NG	0,8	<NG	<NG	8,1	1,2	<NG	<NG
Estradiol [D]	ng/L	0,5	1	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol [D]	ng/L	1	1,5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol [D]	ng/L	1	1,5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze (= 2 x NG). TW: Trinkwasserprobe Theoretikum Heidelberg. Die mit [D] gekennzeichneten Substanzen wurden nach *On-line*-Silylierung im GC-MS-MS untersucht. Die jeweiligen Referenzstandorte sind fett dargestellt bzw. grau unterlegt.

sitzen (Halldin 1996). In Fischen der Ostsee wurde BCPS in vergleichbaren Konzentrationen wie PCB 138 gefunden (Olsson et al. 1999a). Aus diesem Grund wurde BCPS in das Untersuchungsprogramm der Sedimenttriade einbezogen. BCPS ist hiermit (nach unserem Wissen) erstmals in deutschen Fliessgewässern nachgewiesen, und liegt in ähnlichen Konzentrationen (unterer ng-Bereich: 5-14 ng/l) wie PCBs vor.
Das Steroidhormon **Estron** konnte insbesondere nach den Kläranlageneinleitungen (Fb1: 2,5 ng/L und El2: 10,8 ng/L) aber auch in der Flachwasserzone (Eb1: 1,2 ng/L) und dem Mühlbach (Mb2: 0,8 ng/L) nachgewiesen werden. Estron ist das im Rahmen dieser Untersuchungen hauptsächlich in Oberflächenwässern auftretende Steroidhormon und wird von Kläranlagen emittiert. Wahrscheinlich werden die anderen vom Menschen ausgeschiedene Steroidhormone, auch das in diesem Bereich nicht nachgewiesene Ethinylestradiol, mikrobiell zu Estron abgebaut. Auch **Androsteron** wird dem Nachweis am Standort Fb1 zufolge nicht vollständig durch die Reinigungswirkung der Kläranlage Kohlhof eliminiert.
Die Spurenkonzentrationen von **PCBs**, die in der Wasserprobe Fb2, jedoch nicht in der Probe nach der Kläranlage (Fb1) nachgewiesen wurden, weisen auf eine ältere anthropogen-industrielle Belastung (2-3 ng/l von drei PCB-Kongeneren) hin. Insbesondere am Standort nach Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte konnten hohe Konzentrationen (jeweils 5-8 ng/L) nachgewiesen werden. Die Kontamination des Oberflächenwassers nimmt somit vom Standort einige hundert Meter nach dem Wasserbehälter (Fb2) bis nach dem Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3) signifikant zu. Ein großer Anteil der im Wasser gelösten PCBs muss somit auf der Fließstrecke zwischen den Standorten Fb2 und Fb3 in die fließende Welle gekommen sein. Hier könnten Desorptionsprozesse von kontaminierten Sedimentpartikeln eine Rolle spielen. *De facto* konnte am Standort Fb2 auch eine Erhöhung der partikelgebundenen PCB-Belastung nachgewiesen werden (Abschnitt 4.5.6).
Mit den PCBs vergleichbare Restbelastungen durch das seit März 1991 verbotene **Atrazin** sind in der Hälfte der untersuchten Wasserproben (7-55 ng/L) vorhanden. Auffällig sind die erhöhten Konzentrationen an stark landwirtschaftlich geprägten Standorten des Elsenz-Einzugsgebietes und der Neckarflachwasserzone, obgleich alle ermittelten Konzentrationen unterhalb des für Trinkwasser gültigen Grenzwertes von 100 ng/L lagen.
In einer Heidelberger Leitungswasserprobe (Tab. 4.6, TW), abgefüllt im Theoretikum der Universität Heidelberg und analog zu den Oberflächenwasserproben analysiert, konnten 43 ng/L Atrazin, 2,4 ng/L des PCB-Kongener 153, eine Spur Bisphenol A (3,7 ng/L) und hohe Mengen an Phthalaten (2 µg/L Diethylhexylphthalat) nachgewiesen werden (Holtey-Weber 2000). Dieses Belastungsmuster deckt sich gut mit den Konzentrationen dieser Stoffe, die im Oberflächenwasser nach dem Wasserbehälter am Forellenbach nachgewiesen wurden.

4.5.3 Korngrößenanalysen

Die Korngrößenverteilungen der untersuchten Sedimente (Abb. 4.10) spiegelten jeweils den in Abschnitt 4.4 dargestellten geologischen Hintergrund der Standorte wider. Während die löß- und karbonatreichen Standorte im Kraichgau (Elsenz 1 und 2, Hilsbach) eine Tendenz zu schluffig-tonigen Sedimenten zeigten, dominierte bei den überwiegend silikatisch geprägten Buntsandsteinbächen Mühlbach und Forellenbach der Mittelsandbereich, lediglich beim Standort Fb1 war das Maximum in der Feinkiesfraktion zu finden. Abb. 4.10 zeigt weiterhin, dass die Sedimente der Elsenz vor und nach der Kläranlage und bei der Flachwasserzone sich bezüglich ihrer Korngrößenverteilung weitgehend glichen. Dies ist für die spätere Interpretation der partikulären ökotoxikologischen Belastung von Bedeutung, da in anderen Studien vermeintliche Toxizitätsunterschiede oftmals auf Korngrößeneffekte (größere spezifische Oberfläche bei kleinen Korngrößen) zurückgeführt werden konnten (Hellmann 1996). Vor dem Hintergrund der Dominanz der Feinkies- und Grobsandfraktion überraschte zunächst das hohe nachgewiesene ökotoxikologische Schädigungspotential des Sedimentes Fb1.

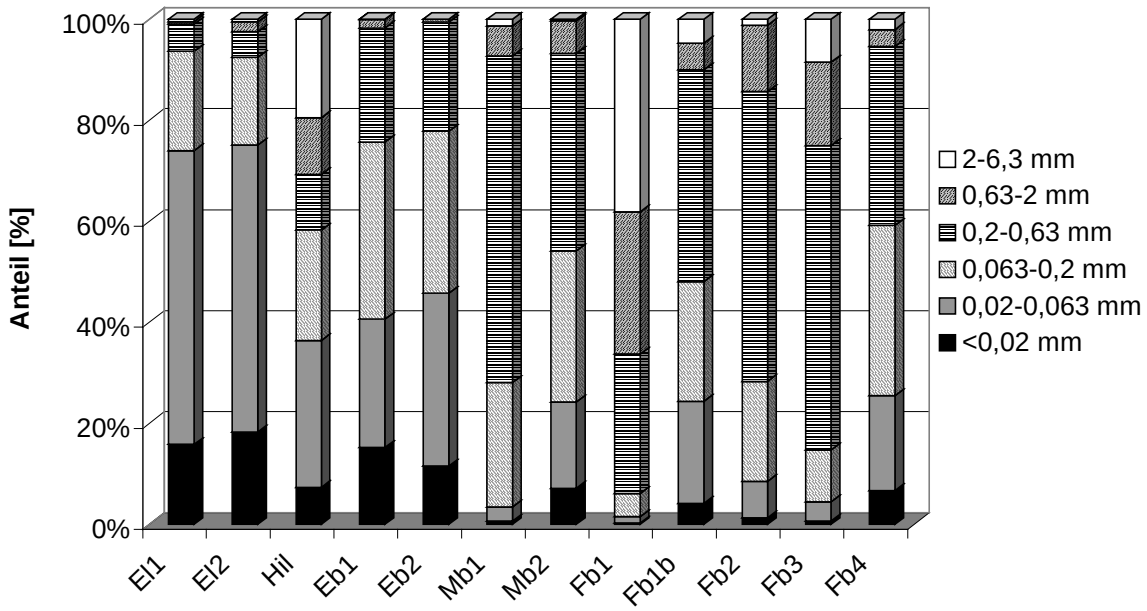


Abb. 4.10. Korngrößenverteilungen der Sedimente als relativer Anteil an der Summe aller Korngrößen. 2-6,3 mm = Feinkies, 0,63-2mm = Grobsand, 0,2-0,63 mm = Mittelsand, 0,063-0,2 mm = Feinsand, 0,02-0,063 mm = Schluff, < 0,02 mm = Ton. Datengrundlage: Winn (2000).

Jedoch zeigte auch bei einer ökotoxikologischen Untersuchung von Moselsedimenten ein Sediment mit großen Korngrößen eine sehr hohe ökotoxikologische Wirkung (persönliche Mitteilung, Herr Dr. Krebs, BfG, Koblenz).

4.5.4 Schwefel- und Kohlenstoffgehalt der Sedimente

Schwefel

Es konnte mehrmals gezeigt werden, dass in mikrobiellen Bioassays, insbesondere mit *Vibrio fischeri* (Brack et al. 1998) und *Salmonella typhimurium* (Abe & Urano 1996) Schwefel sehr stark toxisch wirkt und bei der ökotoxikologischen Untersuchung von unpolaren Extrakten stark störend wirken kann. Bei dem nachgewiesen geringen Schwefelgehalt von durchschnittlich 0,05 % und maximal 0,15 % (=150 µg/g) ist jedoch von keiner toxischen Wirkung in den mikrobiellen Bioassays auszugehen (vgl. Dürr 2000, Brack et al. 1998, Svenson et al. 2000). Die geringen Schwefelgehalte können mit dem überwiegend positiven Redoxpotential der oberflächennah entnommenen Sedimente erklärt werden. Während in der Bundesrepublik keine Grenzwerte vorliegen, beträgt der Schwellenwert für Schwefel in Großbritannien 500 µg/g, der Eingriffswert liegt bei 20 mg/g (Alloway & Ayres 1996). Da die gemessenen Werte aller Proben deutlich darunter lagen, konnte an keinem der Standorte eine erhöhte Schwefelbelastung festgestellt werden.

Gesamtkohlenstoff und TOC

Tab. 4.7 zeigt die deutlichen Unterschiede des Kohlenstoffgehaltes der untersuchten Sedimente. Während alle anderen Sedimente einen **Gesamtkohlenstoffgehalt** (C_{total}) von über 2 % und einen TOC von über 1,5 % besaßen, konnte für die Standorte Fb1, Fb1b und Mb1 nur geringe Kohlenstoffkonzentrationen festgestellt werden. Da viele organische Schadstoffe bevorzugt an organisches Material adsorbieren, kann der **organische Kohlenstoff (TOC)** das Schadstoffpotential unpolarer Substanzen in Sedimenten stark bestimmen (Kammann et al. 2000). Am Referenzstandort Fb2 des Forellenbachs konnte zum Beispiel ein 11-fach höherer Kohlenstoffgehalt als am Standort Fb1 festgestellt werden. Somit besitzt die Wahl der Bezugsgröße (mg Sedimentäquivalent pro mL Medium, bzw. TOC-Äqui-

valent pro mL Medium) einen deutlichen Einfluss auf die Toxizität, den es in Abschnitt 4.7 zu beachten gilt. Aufgrund der relativ hohen TOC-Gehalte ist insbesondere bei den Sedimentproben Eb1, Mb2 und F3 damit zu rechnen, dass eher günstige Bedingungen für Schadstoffanreicherungen vorliegen (Schöler & Haiber 1997).
Die TOC-Gehalte der Sedimente stimmten im wesentlichen mit dem Gesamtkohlenstoff überein, so dass der Anteil an **anorganischem Kohlenstoff** (C_{total} –TOC) bei einigen Proben sehr gering war. Während bei den Sedimenten des Forellenbaches (abgesehen von Fb1) kein Karbonat vorlag, trug der anorganische Kohlenstoff bei den löß- und kalkgeprägten Einzugsgebieten (El1, El2, Hil, Eb1, Eb2, Mb2) deutlich zum Gesamtkohlenstoffanteil bei. Da der Anteil an anorganischem Karbonat das Pufferungsvermögen des Sediments entscheidend mitbestimmt (Burton 1991, Gunkel 1994a), wirkt sich der hohe Kalkanteil der Sedimente der Flachwasserzone positiv aus.

4.5.5 Schwermetallbelastung der Sedimente

Für fast alle **Sedimentproben** konnte nach einem HNO_3-Aufschluss eine verhältnismäßig geringe Belastung (Güteklassen von I bis II nach LAWA 1998) mit den Schwermetallen Chrom, Cadmium, Blei, Nickel und Mangan sowie Lithium nachgewiesen werden (Tab. 4.7). Auffällig waren relativ hohe Kupferkonzentrationen (Güteklasse III-IV) bei allen untersuchten Sedimenten. Weiterhin konnte für das Sediment des Forellenbachs 1b eine relativ hohe Cadmiumbelastung (3 mg/kg, Güteklasse III) und einer erhöhte Bleikonzentration (196 mg/kg, Güteklasse II-III) ermittelt werden.
Die Untersuchungen zu den **Schwermetallgehalten der Porenwässer** (Tab. 4.7) ergaben größere Differenzen in der Belastung zwischen den untersuchten Sedimenten als die HNO_3-Aufschlüsse. Eine Klassifizierung der ermittelten Daten erwies sich als schwierig, da bisher keine Klassifikation für Porenwässer vorliegt. Daher erfolgte eine Klassifikation in Anlehnung an die Oberflächenwasser-Zielwerte für freifließende Gewässer im Neckareinzugsgebiet und den gestauten Neckar (LAWA 1998). Um Gleichgewichtsverteilungen zwischen partikulär gebundenen Schwermetallen und Schwermetallen in Porenwässern gerecht zu werden, die *a priori* höhere Schwermetallkonzentrationen als im Oberflächenwasser erwarten lassen, wurden als Bewertungsgrundlage (in Anlehnung an LAWA 1998) der zweieinhalbfache Zielwert für Oberflächenwässer als Zielwert für das Porenwasser eingesetzt. Ähnlich wie nach dem HNO_3-Aufschluß konnten auch für die Porenwässer durchweg hohe Kupferkonzentrationen (bis 80 µg/L) nachgewiesen werden, die jedoch noch immer unter den Grenzwerten des EU-Rats für Trinkwasser von 100 µg/L lagen (Streit 1994). Die ermittelten Kupferkonzentrationen der Porenwässer einiger Sedimente würden jedoch bei einer direkten Exposition von Fischen zu einer Reihe von toxischen Effekten führen (umfassende Literaturübersicht bei Köck 1996). Insbesondere die bereits ab 10 µg/L mehrfach beschriebene Embryotoxizität erscheint vor dem Hintergrund der direkten Exposition von Fischeiern in Sedimenten (vgl. auch Embryotoxizität in Abschnitt 4.7.3) problematisch (Köck 1996). Die ubiquitäre Kupfer-Belastung könnte aus Fungizid- und Bakterizideinträgen aus der Landwirtschaft, Zusatz für Grünfutter, Straßenabflüssen, Wasserleitungen und Luftstäuben stammen (Erdinger et al. 1997, Maltby et al. 1995a, b, Streit 1994). Am Forellenbach fällt die hohe Belastung der Porenwässer Fb3 (Güteklassen IV-V für Nickel, Blei, Kupfer, Cadmium) und Fb4 (Güteklassen III-IV für Nickel, Blei, Kupfer) auf. Während nach HNO_3-Aufschlüssen das Sediment Fb1 die größte Schwermetallbelastung besaß, scheint im Porenwasser in Fließrichtung (Fb3, Fb4) eine relative Anreicherung stattzufinden. Durch die höhere Bioverfügbarkeit für Organismen ist eine solche Anreicherung von Schwermetallen als ökotoxikologisch problematisch zu beurteilen. Insbesondere die für Fb3 ermittelte Cadmiumkonzentration von 70 µg/L könnte durchaus ökotoxikologische Konsequenzen im Freiland besitzen, da embryotoxische Wirkungen bereits ab 1,8 µg/L und akut toxische Wirkungen bei adulten Regenbogenforellen ab 29 µg/L beschrieben wurden (Brown et al. 1994).

Tab. 4.7. Übersicht über Summenparameter, Schwermetall- und PAH-Konzentrationen die bei Sedimenten während einer integrierten Sedimentbewertung nachgewiesen werden konnten

				Forellenbach			Mühlbach		Elsenzgebiet			Eberbach	
	Einheit	Fb1	Fb1b	**Fb2**	Fb3	Fb4	**Mb1**	Mb2	**Hil**	El1	El2	**Eb1**	Eb2
Gesamtkohlenstoff	%	0,29	1,26	2,49	4,21	2,95	0,63	3,3	2,63	2,45	3,06	3,53	4,19
TOC	%	0,19	1,26	2,49	4,21	2,95	0,63	3,08	2,18	2,04	2,52	1,44	3,01
Gesamtschwefel	%	0,01	0,05	0,02	0,04	0,02	0,01	0,07	0,08	0,09	0,14	0,04	0,10
Sediment, Porenwasser													
Chrom	µg/L [b]	1,5 (I)	8,4 (I)	1 (I)	20 (II)	30 (II)	17 (II)	10 (I)	5 (I)	10 (I)	10 (I)	5 (I)	7 (I)
Nickel	µg/L [b]	10 (II)	17 (III)	15 (III)	100 (IV)	70 (IV)	50 (III)	23 (II)	10	6 (I)	10 (I)	10 (I)	15 (II)
Blei	µg/L [b]	5 (I)	20 (III)	5 (I)	80 (V)	40 (IV)	150 (V)	70 (V)	12 (II)	22 (III)	20 (III)	1 (I)	15 (III)
Kupfer	µg/L [b]	14 (II)	30 (III)	15 (II)	80 (IV)	27 (III)	40 (III)	30 (III)	26 (III)	30 (III)	30 (III)	15 (II)	25 (III)
Cadmium	µg/L [b]	0 (I)	0 (I)	0 (I)	70 (V)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 (I)
Sediment, HNO_3-Aufschluss													
Chrom	mg/kg [a]	22 (I)	71 (I)	1 (I)	9 (I)	8 (I)	49 (I)	45 (I)	25 (I)	25 (I)	38 (I)	23 (I)	56 (I)
Nickel	mg/kg [a]	20 (I)	23 (I)	1 (I)	11 (I)	8 (I)	44 (II)	44 (II)	41 (II)	22 (I)	27 (I)	39 (II)	22 (I)
Cadmium	mg/kg [a]	0 (I)	3 (III)	0 (I)	0 (I)	0 (I)	1 (I)	0 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)	0(I)	1 (I)
Kupfer	mg/kg [a]	270 (III-IV)	301 (III-IV)	k.A.	k.A.	k.A.	277 (III-IV)	272 (III-IV)	265 (III-IV)	286 (III-IV)	334 (III-IV)	256 (III-IV)	303 (III-IV)
Lithium	mg/kg	8	5	0	4	3	8	8	7	8	8	8	8
Blei	mg/kg [a]	52 (II)	196 (II-III)	4 (II)	25 (II)	15 (II)	65 (II)	65 (II)	58 (II)	55 (II)	59 (II)	60 (II)	64 (II)
Mangan	mg/kg	0	88	3875	3719	1169	4550	1619	2560	7100	1446	305	2194
EPA-PAHs mit LC/MS													
Dimethylnapthalin	µg/kg	60,9	28,1	38,8	31,0	39,3	14,8	60,2	22,6	73,6	158,9	83,2	64,7
Napthalin	µg/kg	47,6	17,9	30,4	22,6	32,0	5,3	40,9	7,0	28,3	32,5	20,7	35,3
Acenaphthylen	µg/kg	26,5	18,2	5,1	11,8	1,4	1,0	49,1	6,6	19,5	57,3	2,3	43,3
Acenaphten	µg/kg	77,7	52,1	6,6	34,9	0,8	1,5	266,5	6,6	15,2	11,3	0,8	20,4
Fluoren	µg/kg	119,1	94,3	7,6	50,2	6,3	1,4	488,7	10,2	17,0	20,8	2,5	27,0
Phenanthren	µg/kg	596,0	540,0	120,8	797,5	51,6	13,2	703,3	178,7	234,4	284,1	16,2	345,2
Anthracen	µg/kg	441,8	491,7	32,7	414,1	9,6	3,6	571,9	97,3	79,1	111,8	9,0	81,9
Fluranthen	µg/kg	512,7	427,6	251,3	1072,5	86,6	48,4	540,4	284,7	445,3	359,3	91,7	344,0
Pyren	µg/kg	398,7	341,1	176,1	883,8	78,2	51,1	401,8	276,9	369,0	312,3	82,4	289,5
Benzo(a)anhracen	µg/kg	564,3	687,5	132,5	769,8	17,0	9,8	768,0	478,6	493,3	508,7	25,3	364,6
Chrysen	µg/kg	616,7	186,1	173,1	829,4	23,8	16,0	886,6	504,7	593,2	554,8	24,4	412,9
Benzo(b+k)fluoranthen	µg/kg	1090,2	1265,3	290,0	1193,0	41,7	32,4	1639,7	728,4	915,1	1038,4	42,3	741,5
Benzo(e)pyren	µg/kg	659,3	751,2	109,3	427,2	16,2	11,9	1004,1	278,9	382,3	496,9	20,9	291,5
Benzo(a)pyren	µg/kg	717,7	840,1	108,7	539,9	16,4	9,2	1077,0	374,8	468,9	588,3	5,5	361,6
Perylen	µg/kg	343,2	378,5	28,6	139,0	125,5	3,4	769,7	97,5	140,0	173,8	6,3	102,2
Indeno(c,d)pyren	µg/kg	727,0	815,2	102,9	378,8	25,1	12,0	1227,7	251,0	455,7	484,4	21,4	269,6
Benzo(g,h)perylen	µg/kg	764,6	827,6	97,7	352,1	22,5	11,7	1266,5	238,9	473,0	500,0	22,0	270,2
Dibenzo(a,c)anthracen	µg/kg	295,7	340,9	44,2	116,0	14,9	4,7	787,2	81,0	179,0	173,4	10,6	99,9
Summe PAHs [c]	mg/kg	7,9 (III)	8,1 (III)	1,7 (II)	8,1 (III)	0,6 (I)	0,2 (I)	12,5 (IV)	3,9 (II)	5,3 (III)	5,7 (III)	0,4 (I)	4,1 (III)

[a] Klassifikation nach Gewässergüteklassen der LAWA (1998), [b] Klassifikation als Vielfaches der Zielvorgaben für Schwermetallkonzentrationen für freifließende Gewässer im Neckareinzugsgebiet und für den gestauten Neckar (nach LAWA 1998): 1 x Zielwert: geringe Belastung, 2,5 x: mäßig, 5 x: deutlich, 10 x: hoch, >10 x: sehr hoch, [c] Klassifikation nach Umweltbehörde Hamburg (1997), Klasse II als Zielvorgabe für Sedimente im Hamburger Hafen. n.d.: nicht nachweisbar. Die Referenzstandorte der Triade sind jeweils fett gedruckt und grau hinterlegt.

Während der Flachwasserzonenstandort Eb1 eine verhältnismäßig geringe Porenwasserbelastung besaß, konnten für Eb2 erhöhte Nickel-, Kupfer- oder Bleikonzentrationen bestimmt werden. Weiterhin fällt die erhöhte Belastung der Porenwässer des Mühlbaches mit den Schwermetallen Blei (jeweils Güteklasse V), Kupfer und Nickel (II-III) auf. Angesichts der Lage des Standorts Mb1, für den nur geringe Belastungen zu erwarten waren, überraschten die nachgewiesenen Schwermetallkonzentrationen. Hier könnte, bei einer Westwindhäufigkeit von 25%, eine Deposition von partikulären Luftschadstoffen aus dem Großraum Mannheim eine Erklärung sein (Eichler et al. 1995, Erdinger et al. 1997).

4.5.6 Konzentrationen organischer Schadstoffe in den Sedimenten

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe. Tab. 4.7 gibt einen Überblick über die mit Hilfe von Accelerated Solvent Extractors™ (ASE)/ GC-MS ermittelte PAH-Belastung der Sedimente, die von Herrn Dürr während eines Forschungsaufenthaltes am Department of Environmental Chemistry der Universität Umeå unter Anleitung von Dr. van Bavel durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Summe der PAHs variierte um einen Faktor 62 von 0,2 mg/kg für das Sediment Mb1 bis zu 10,2 mg/kg (Mb2). Da in den bekannten Sedimentklassifikationssystemen der LAWA (1998) und der ARGE Elbe die Konzentrationen an polyzyklischen Aromatischen Hydrokarbonsäuren (PAH) nicht berücksichtigt werden, wurde das Klassifikationssystem der Umweltbehörde Hamburg (Maaß et al. 1997) eingesetzt. Am Forellenbach konnte für die Standorte nach der Kläranlageneinleitung (Fb1, Fb1b) und für den Standort nach dem Zusammenfluss (Fb3) mit jeweils 8 mg/kg eine höhere Belastung als für die Referenz Fb2 (2 mg/kg) festgestellt werden. Der Regenerationsstandort Fb4 besaß mit einer PAH-Summe von 0,6 mg/kg die geringste Belastung. Die relativ hohe Belastung von Fb2 weist auf Altlasten in diesem Gebiet oder auf den Eintrag luftbürtiger Schadstoffe hin (Erdinger et al. 1997). Nach Hochrechnungen wurden in den neuen Bundesländern etwa 1 Mio. t Luftstäube in Fließgewässer eingetragen, die 10 % der gesamten Schwebstofffracht der Flüsse entsprechen (Hellmann 1996). Gravierend erhöhte sich die Summe der PAHs im Verlauf des Mühlbachs von 0,2 (Mb1, Güteklasse I) auf 12,5 mg/kg (Mb2, IV). Eine Erklärung hierfür gibt das Altlastenkataster der Stadt Heidelberg, das in unmittelbarer Umgebung des Mühlbaches 17 registrierte Altlasten nennt. Neben einer chemischen Reinigung, mehreren Tankstellen, einer Füllfederhalterfabrik, einem Betrieb für Wasseraufbereitungschemikalien, Druckereien, Reparaturwerkstätten und einer Emaillierwerkstatt wird in dem Altlastenkataster auch eine Möbelfabrik beschrieben. Für das Einzugsgebiet der Elsenz konnte eine gleichmäßig hohe Belastung festgestellt werden. Insbesondere die Kläranlage Eppingen bewirkt keine signifikante Erhöhung der PAH-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu konnte bei der Flachwasserzone eine höhere Belastung des temporär trockenfallenden Standortes (Eb2) bestimmt werden.

Dibenzo-*p*-Dioxine und -Furane. Die chemischen Analysen der PCDD/Fs und PCBs wurden von Herrn Dürr (Hygiene-Institut Halle) während eines Forschungsaufenthaltes an der Universität Umeå (Department of Environmental Chemistry, Schweden) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. van Bavel durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Standardisierung der Dioxin- und Furangehalte wurden die Toxizitätsäquivalente (TEQs) der World Health Organisation (Van den Berg et al. 1998) benutzt. Dabei werden die Konzentrationen der 17 besonders toxischen Verbindungen mit Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF, relative Wirksamkeit in Bezug zu 2,3,7,8-Tetrachlor-*p*-dibenzodioxin) multipliziert und dann aufaddiert. Während bei den Sedimenten Fb1 und Mb2 die PCDDs/Fs aufgrund von starken Matrixeffekten nicht quantifiziert werden konnten, überraschte die im Vergleich zu den anderen Standorten erhöhte Belastung des Referenzstandortes am Forellenbach (Fb2) mit TEQs von 3,1 ng/kg Trockengewicht bzw. 130 ng/kg organischem Kohlenstoff (Abb. 4.11). Diese Konzentration liegt jedoch einen Faktor 40 unter dem Grenzwert von 120 ng/kg Trockengewicht, ab dem Klärschlämme nicht mehr auf landwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzte Böden ausgebracht werden

dürfen (AbfKlärV 1992). Die Kontamination unterschied sich bezüglich der Kongenerenprofile deutlich von den anderen Proben des Neckareinzugsgebietes, so dass auf eine sehr lokale Kontamination, etwa durch eine illegale Entsorgung von Schlämmen einer Chloralkali-Elektrolyse, geschlossen werden kann (persönliche Mitteilung Dr. van Bavel). Bei einer Recherche im Altlastenkataster der Stadt Heidelberg fiel eine nicht-identifizierte Altlast in einem direkt angrenzenden Gebiet auf (Siebert 1999). Auch am Oberlauf des Mühlbaches (Mb1) konnte eine erhöhte Kontamination nachgewiesen werden, die vermutlich aus der direkten Exposition dieses Standortes in der Abluftfahne der stark industrialisierten Region Mannheim/Ludwigshafen resultiert. Die signifikante Zunahme der PCDD/F-Konzentrationen zwischen den Elsenz-Standorten El1 und El2 kann auf die Kläranlage Eppingen zurückgeführt werden, die den einzigen Einleiter in diesem Bereich des Fließgewässers darstellt. Ein Vergleich der PCDD/F-Konzentrationen der Sedimente aus dem Einzugsgebiet des Neckars (MW der PCDD/F-TEQs von 33 ng/kg o.c.) mit Analysen aus dem Hamburger Hafen (PCDD/F-TEQs von 252 bis zu 2450 ng/kg o.c., Götz 1997) und des stark mit PCBs kontaminierten schwedischen Emån-Flusssystems (PCDD/F-TEQs von 1,1 bis 7 ng/kg o.c., Engwall et al. 1998a) dokumentiert eine geringe bis mäßige Belastung der untersuchten Sedimente. Nach einem Erlass des Ministeriums für Umwelt in Baden-Württemberg (zitiert in LfU 1995), können Böden bis zu einem TEQs von 5 ng/kg Trockengewicht uneingeschränkt landwirtschaftlich genutzt werden. Eine Massenbilanzierung, die den Anteil der chemisch-analysierten PCDDs/Fs an der gesamten, sehr hohen dioxin-ähnlichen Wirksamkeit in einem Biotest mit embryonaler Hühnerleberkulturen berechnet, ist in Abschnitt 4.7.9 dargestellt.

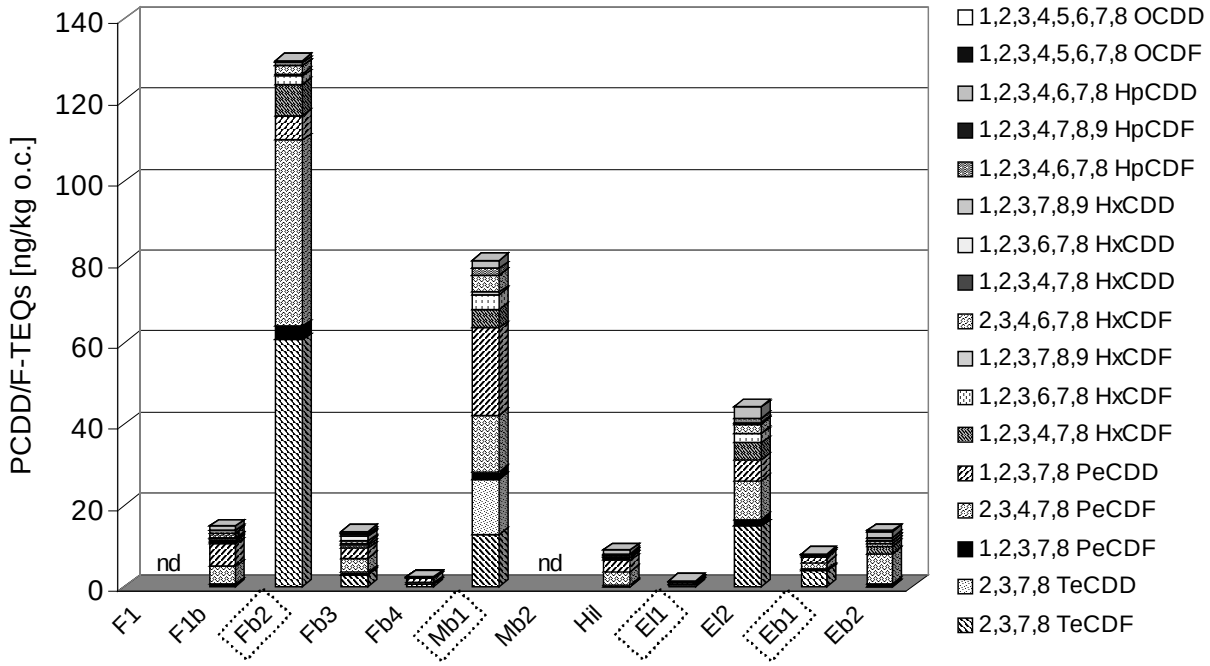


Abb. 4.11. Konzentrationen von 17 analysierten PCDDs/Fs dargestellt als Toxizitätsäquivalente (TEQ) von 2,3,7,8-TCDD. Die Referenzstandorte der Triade sind hervorgehoben. Datengrundlage: Dürr, unveröffentlichte Daten; nd: durch Matrixeffekte nicht quantifizierbar.

Polychlorierte Biphenyle. Abb. 4.12 gibt einen Überblick über die Summe der Konzentrationen von 49 analysierten PCB-Kongeneren in den Sedimentproben. Insbesondere bei den Sedimentproben Fb2 und Mb2 konnten mit jeweils 0,055 bis 0,068 mg/kg Trockengewicht hohe Konzentrationen an PCB # 138 und 153 nachgewiesen werden, so dass die Proben nach dem Klassifikationsverfahren der ARGE-

Elbe für diese Stoffe in die schlechteste Güteklasse IV eingeteilt wurden (Neumann-Hensel et al. 2000).
Ein Vergleich des Referenzstandortes am Forellenbach mit schwebstoffbürtigen Sedimenten der Elbe bei Dessau und Hamburg-Blankensee zwischen September 1994 und August 1995 (ARGE 1996) zeigte bezüglich der Substanzen α- und γ-Hexachlorcyclohexan und -benzen, *p,p´*-DDT und seiner Metaboliten *p,p´*-DDD, *p,p´*-DDE und der 9 PCB-Kongeneren (# 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156 und 180) mit 8, 17 und 4,5 mg/kg o.c. ähnliche Belastungspotenziale. Eine Berechnung des Anteils der chemisch analysierten PCBs an der tatsächlichen dioxin-ähnlichen und endokrinen Belastung im Sinne des TEQ-Konzeptes ist in den Abschnitten 4.7.8 und 4.7.9 dargestellt.

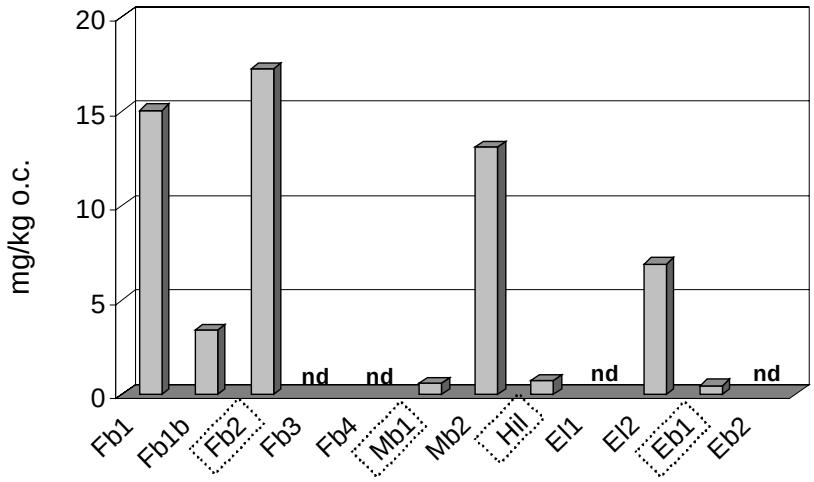


Abb. 4.12. Summenkonzentrationen von 53 analysierten PCB-Kongeneren in µg pro g C. Die Referenzstandorte der Triade sind hervorgehoben. Datengrundlage: Dürr, unveröffentlichte Daten; nd: durch Matrixeffekte nicht quantifizierbar. Die Summe der PCBs wurde aus den 49 Einzelkonzentrationen der Kongeneren # 52, 49, 56, 60, 66, 70, 74, 76, 84, 89, 92, 97, 99, 101, 105, 110, 113, 118, 127, 128, 134, 138, 143, 146, 149, 153, 156, 158, 160, 170, 171, 172, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 182, 183, 185, 187, 190, 192, 194, 195, 196, 201, 203 ermittelt.

Chemische Analysen endokriner Stoffe in Sedimentextrakten. Die Analysen der endokrin wirksamen Stoffe wurden von Herrn Dr. Holtey-Weber (Hygiene-Institut Bonn) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Tab. 4.8). Die relativ hohen Nachweisgrenzen sind durch die Probenaufbereitung zu erklären. Mit den Proben wurde weder einer Aufkonzentrierung noch ein Clean up durchgeführt. Die acetonischen Extrakte wurden nach Filtration und Verdünnung chemisch analysiert (Holtey-Weber 2001). Es wurden in den untersuchten Sedimentextrakten der Triade lediglich Phthalate, Alkylphenole, PCBs und Bisphenol A nachgewiesen. **Dibutylphthalat** (DBP) als die dominierende Substanz konnte in allen Sedimenten nachgewiesen werden, in Konzentrationen von mehreren hundert µg/kg bis zu 2,4 mg/kg im Sediment des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung (Fb1). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten fallen bei Dibutylphthalat jedoch sehr gering aus, vielmehr scheint es eine ubiquitäre Verbreitung zu besitzen. Im Gegensatz dazu, konnten für **Diethylhexylphthalat** (DEHP) erhebliche Unterschiede nachgewiesen werden: Nicht nur die Standorte nach Kläranlagen (F1, F3 und El2 mit 0,6-2,2 mg/kg) erwiesen sich im Vergleich zu den Referenzen als stark belastet, auch für den hinteren Abschnitt der Flachwasserzone (Eb2) konnte eine Konzentration von 0,7 mg/kg detektiert werden. Die anderen Phthalate waren nur unterhalb der Bestimmungs- oder Nachweisgrenze in den Sedimenten vorhanden. Phthalate wurden von Van der Velde (1999) in ähnlich hohen Konzentrationen in Sedimenten nachgewiesen. Im Sedimentextrakt Fb1 konnten zudem die höchsten Konzentrationen von **Nonylphenol, Octylphenol** und **Bisphenol A** bestimmt

Tab. 4.8. Übersicht über endokrin wirksame Substanzen in acetonischen Sedimentextrakten einer integrierten Sedimentbewertung, nach Holtey-Weber (2000).

				Forellenbach				***Elsenz***		***Eberbach***	
Substanz	**Einheit**	**NG**	**BG**	Fb1	*Fb2*	Fb3	Fb4	*Hil*	El1	*Eb1*	Eb2
Atrazin [d]	µg/kg	40	80	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
α-Endosulfan [d]	µg/kg	6	12	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
β-Endosulfan [d]	µg/kg	6	12	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan [d]	µg/kg	6	12	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat [d]	µg/kg	100	200	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Benzylbutylphthalat [d]	µg/kg	300	600	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Dibutylphthalat [d]	µg/kg	150	300	2400	1020	760	619	695	644	810	913
Diethylhexylphthalat [d]	µg/kg	200	400	2200	<NG	603	<NG	<BG	1130	<BG	700
p, p´DDE [d]	µg/kg	30	60	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p´DDT [d]	µg/kg	10	20	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p´DDT [d]	µg/kg	20	40	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52 [d]	µg/kg	4	8	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101 [d]	µg/kg	10	20	<NG	71	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 138 [d]	µg/kg	10	20	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 153 [d]	µg/kg	10	20	<NG	161	25	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 180 [d]	µg/kg	30	60	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194 [d]	µg/kg	10	20	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol [e]	µg/kg	5	10	87,2	<BG	<BG	<BG	17,0	22,9	<BG	<BG
Techn. Nonylphenol [e]	µg/kg	10	20	5000	73,2	162	159	29,0	105	109	132
Bisphenol A [e]	µg/kg	3	6	13,1	<NG	<BG	<NG	<BG	61,6	7,2	14,8
Diethylstilbestrol [e]	µg/kg	3	6	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol [e]	µg/kg	3	6	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron [e]	µg/kg	20	40	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron [e]	µg/kg	3	6	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estradiol [e]	µg/kg	4	8	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol [e]	µg/kg	20	40	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol [e]	µg/kg	6	12	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

[d] Bestimmung im GC/MS-MS aus organischen Extrakten, nach Filtration, 1:20 Verdünnung und ohne Clean-up, [e] Bestimmung aus organischen Extrakten im GC/MS-MS nach *On-line*-Silylierung * über der Kalibrationsgrenze, somit halbquantitative Angaben, NG: Nachweisgrenze BG: Bestimmungsgrenze (2 x Nachweisgrenze). Die Referenzstandorte sind fett und grau unterlegt dargestellt.

werden: Die ermittelte Konzentration von 5 mg/kg Nonylphenol übertrifft die Konzentrationen aller anderen Extrakte um mindestens einen Faktor 30. Die weniger starken Unterschiede bei den untersuchten Oberflächenwasserproben lassen sich mit der großen Affinität des Nonylphenol zu Partikeln erklären, die zu einer Anreicherung der Substanz im Sediment Fb1 führt. Octylphenol zeigte nicht das gleiche Verhalten wie sein höheres Homologes Nonylphenol und ist wahrscheinlich aufgrund etwas höherer Polarität und insgesamt geringeren Vorkommens nicht so stark im Sediment Fb1 angereichert (87 µg/kg) wie Nonylphenol. Die erhöhten Werte von Alkylphenolen, Bisphenol A und DEHP im Sediment der Elsenz nach der Kläranlageneinleitung (El2) können durch die hohen Konzentrationen dieser Substanzen in kommunalen Abwassereinleitungen erklärt werden (Bätscher et al. 1999, Matthiessen & Sumpter 1998, Schrenk-Bergt & Steinberg 1998, Servos 1999, Tyler & Routledge 1998).

Die vorgestellten Befunde zu den Konzentrationen endokrin wirkender Substanzen in Sedimentextrakten korrelieren gut mit Konzentrationen und Verteilungen dieser Substanzen z.B. in Sedimenten Berliner Gewässern (Pilz 1999): Dort wurde in nahezu allen Proben DBP gefunden, mit einem Maximalwert von 2200 µg/kg. Dominierend unter den Phthalaten war DEHP mit einem Median von 790 µg/kg. NP trat dort mit einem Median von 480 und einem Maximum von 5600 µg/kg auf, BPA wurde mit Konzentrationen bis 116 µg/kg (Median: 11 µg/kg) bestimmt. Ein Unterschied, der wahrscheinlich aus regionalen Begebenheiten herrührt, ist das in Berlin nicht nachgewiesene OP und das vereinzelt in geringen Konzentrationen auftretende BBP welches in den hier untersuchten Proben nicht vorkam.

In Abschnitt 4.7.8 dieser Studie wird die endokrine Aktivität eines methanolischen Sedimentextraktes im Dot-Blot-Assay (Bio-TEQs) mit Hilfe einer Massenbilanzierung mit den chemisch ermittelten TEQs für endokrine Substanzen verglichen.

4.6 Ergebnisse und Diskussion: *In situ*-Untersuchungen

Zusammenfassung. *Mit Hilfe einer Untersuchung der Makrozoobenthos-Biozönose und der Berechnung diverser Bioindices (z. B. Saprobienindex, Ökotoxikologischer Index nach Carmargo, Diversität und Evenness, ökologische Säure- und Sauerstoffstufen und Rhitron-Ernährungstypen-Index) konnte der Fließgewässerzustand in situ umfassend erfasst und bewertet werden. Es zeigte sich, dass Saprobie-basierte Bioindices alleine zur Erfassung komplexer Belastung nicht geeignet sind, wogegen aus der kombinierten Verwendung der Indices weiterführende Informationen zur Art der Schädigung der Biozönose erhalten werden konnten. Während mit dem Diversitätsindex nach Shannon-Wiener keine belastungsabhängige Differenzierung der Standorte möglich war, erwies sich der ökotoxikologische Index nach Carmargo als geeigneter, sensitiver Bioindex zur Analyse von Degradationen in situ.*
Bei einer integrierten Sedimenttriade von 12 Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars ergaben sich für die Untersuchungskomponente 'Belastungszustand in situ' folgende Befunde: Für beide Standorte der Neckarflachwasserzone bei Eberbach (Eb1, Eb2) konnte eine einheitliche hohe Belastung der Biozönosen nachgewiesen werden, wobei mit der Karlsruher Methode und dem Ökotoxikologischen Index größere Störungen an einem Standort mit temporärer Sedimentresuspension (Eb2) ermittelt werden konnten. Im Einzugsgebiet der Elsenz konnte mittels der Bioindices die geringste, aber dennoch deutliche Belastung in situ für die Referenz (Hil) festgestellt werden. Die Kläranlageneinleitung Eppingen verschlechterte die sehr hohe Saprobie der Elsenz kaum, wogegen sie in einem verschlechterten ökotoxikologischen Index und Sauerstoffindikation resultierte. Am Forellenbach konnte eine deutliche Degeneration des Fließgewässerabschnittes nach der Kläranlageneinleitung (Fb1) gegenüber der Referenz (Fb2) festgestellt werden. Bei einem Vergleich mit einem Regenerationsstandort (Fb4) erwies sich aber auch die Biozönose des Referenzstandortes als deutlich gestört. Die Befunde wiesen darauf hin, dass am Forellenbach ein komplexes Belastungsmuster in situ aus Saprobie, Säurebelastung und ökotoxikologischer Kontamination vorlag. Am Mühlbach konnte eine deutliche Degradation der Biozönose im Unterlauf (Mb2) dokumentiert werden.

Die *In situ*-Untersuchungen der integrierten Sedimentbewertung wurden im Rahmen von zwei Diplomarbeiten durchgeführt (Karaus 1999, Siebert 1999), in welchen umfassendere Darstellungen der Befunde von Makrozoobenthosanalysen aller untersuchten Probestandorte unter besonderer Berücksichtigung von Zeitreihen dargestellt sind.

4.6.1 Artenzusammensetzungen

Flachwasserzone Eberbach

Abb. 4.13 zeigt die Verteilung der Großgruppen und die einzelnen nachgewiesenen Taxa der Neckarflachwasserzone bei Eberbach. Beide Standorte waren durch eine geringe Artenvielfalt gekennzeichnet. Während am Übergang der Flachwasserzone zum Neckar (**Eb1**) überwiegend Vertreter der Gruppen Gastropoda, Bivalvia, Crustacea und Ephemeroptera nachgewiesen werden konnten, war der hintere Abschnitt der Flachwasserzone (**Eb2**) durch einen erhöhten Anteil an Gastropoda, Diptera und Oligochaeta geprägt, wogegen Crustacea und Ephemeroptera fast bzw. ganz fehlten. Das geringe Vorkommen von Chironomidenlarven, die meist in schluffigen Gewässerböden dominieren, könnte auf die starke Strömung am Standort Eb1 zurückzuführen sein. Auch die hohen Abundanzen der Ephemeropterengattung *Caenis,* die gerne in Totwasserräumen hinter strömungsexponierten Strukturelementen aus Steinen, Wasserpflanzen oder Falllaub lebt, lassen sich mit den Strömungsverhältnissen

erklären (Caspers 1982). Sedimentation von Schwebstoffen im hinteren Bereich der Flachwasserzone behindert die Entwicklung einer natürlichen Biozönose und fördert vor allem die Besiedlung mit Tubificiden und Chironomidenlarven (Lindegaard 1995, Saether 1979, Wiederholm 1980a). Ein Großteil der vorkommenden Gastropoden ist charakteristisch für stehende oder mäßig fließende Gewässer. Da die Flachwasserzone einen weitgehend stehenden Wasserkörper mit temporären Strömungen darstellt, ist sie für viele **Gastropoden** ein ideales Besiedlungsgebiet. *Valvata piscinalis*, die im hinteren Bereich der Flachwasserzone in hohen Abundanzen nachgewiesen werden konnte, ist ein typischer Sedimentbewohner großflächig stehender und langsam fließender Gewässer (Schmedtje & Kohmann 1988). Ihre Nahrung besteht aus Detritus und Aas. Aus der Gruppe der **Bivalvia** konnten *Corbicula fluminea* und *Dreissena polymorpha* an beiden Standorten nachgewiesen werden. Sie kommen im feinkörnigen Sediment größerer Gewässer vor und zeichnen sich durch eine hohe Toleranz gegenüber schwankenden Sauerstoffkonzentrationen aus.
Die hohen Abundanzen von *Dreissena polymorpha* im hinteren Bereich der Flachwasserzone lassen

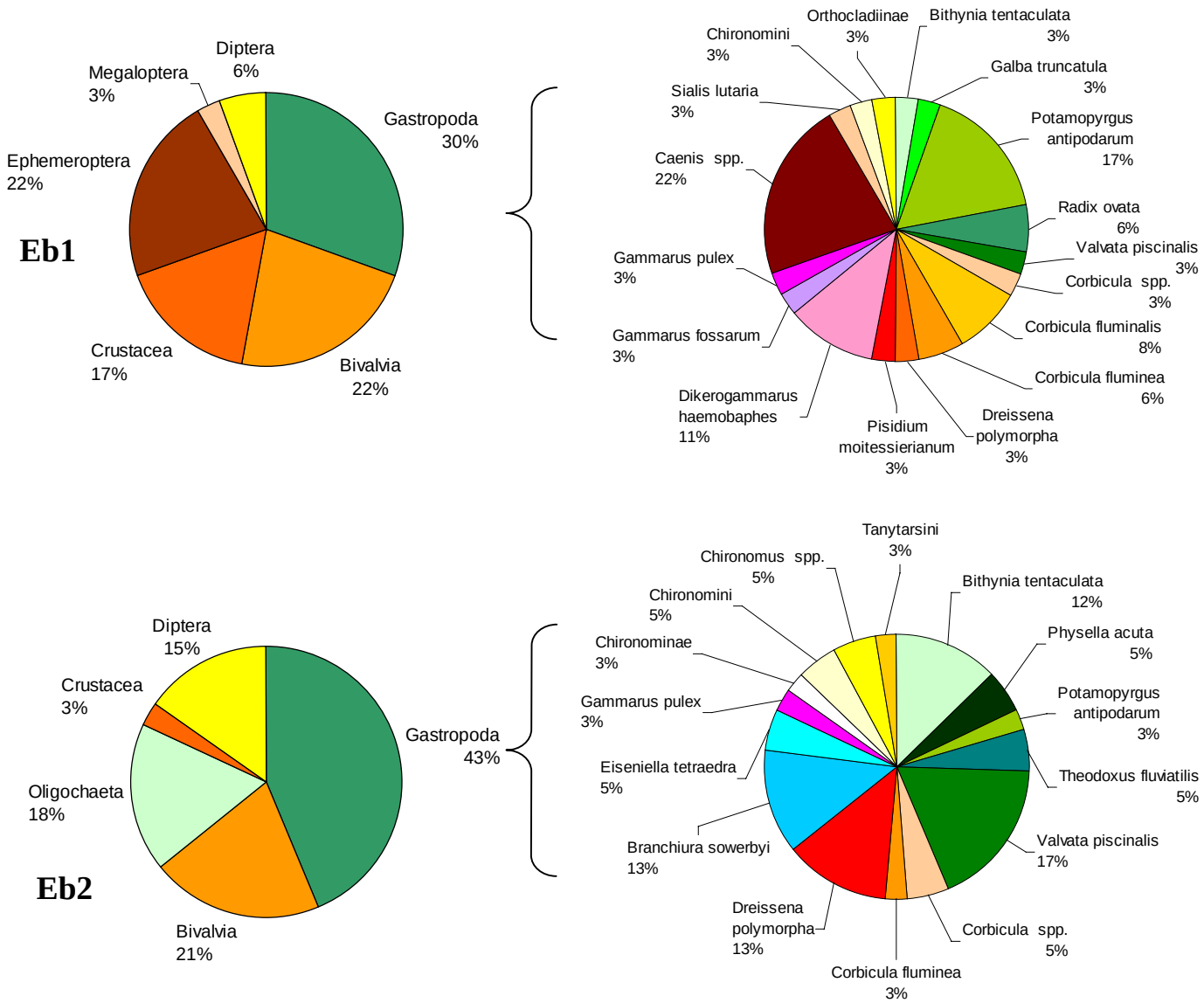


Abb. 4.13. Übersicht über die nachgewiesenen Großgruppen und Makrozoobenthos-Taxa in der Neckarflachwasserzone bei Eberbach, modifiziert nach Karaus (1999). Eb1: Übergangsbereich zum Neckar, Eb2: temporär trockenfallender Abschnitt.

sich durch die reduzierten Fließgeschwindigkeiten erklären. Von den gefundenen **Oligochaeten** konnten nur *Branchiura sowerbyi* und *Eiseniella tetraedra* bestimmt werden. Letztere Art ist rheophil und besitzt eine hohe Toleranz gegenüber Gewässerverschmutzung. Innerhalb der **Crustaceen** konnte *Dikerogammarus haemobaphes, Gammarus fossarum* und *Gammarus pulex* nachgewiesen werden. *Dikerogammarus haemobaphes* stellt als pontokaspisches, tertiäres Relikt eine aus der Donau eingewanderte Gammaridenart dar. Sie bevorzugt tiefes Wasser und schnelle Strömung (Prunescu-Arion & Elian 1965). Insgesamt konnten nur geringe Individuenzahlen der Gammariden dokumentiert werden, wobei in Neckarnähe mehr Tiere gefunden wurden als im hinteren Teil der Flachwasserzone. Die Funde von **Ephemeropteren**-Larven beschränkten sich auf die Gattung *Caenis.* Die regelmäßig in Flachlandbächen, dem Potamal größerer Fließgewässer und in Stillgewässern vorkommende **Megalopteren**-Art *Sialis lutaria* konnte in Eb1 als Einzelfund verzeichnet werden. Sie lebt im Schlamm langsam fließender oder meist stehender Gewässer und stellt einen Indikator für ß-mesosaprobe bis α-mesosaprobe Bereiche dar. Innerhalb der **Dipteren** kamen nur Vertreter aus der Familie der Chironomiden vor. Aufgrund der Schwierigkeit der Artbestimmung ist eine Bestimmung zum Teil nur bis zur Unterfamilie beziehungsweise bis zur Gattung möglich (Dr. Otto, Fahrenkrug, persönliche Mitteilung). Eine nähere Aussage über den Gewässerzustand ist mit Hilfe der in der Flachwasserzone gefundenen Dipteren nicht erzielbar, da mit der Unterfamilie meist keine Bewertung möglich ist.

Elsenzgebiet

Der Standort vor der Kläranlage (**El1**) war durch eine geringe Artenzahl gekennzeichnet. Die gefundenen Tiere zählen zu den Gruppen der Bivalvia, Crustacea, Ephemeroptera und Diptera (Abb. 4.14). Im Verlauf der Untersuchungen fiel die Dominanz der Dipteren auf. So betrugen die relativen Häufigkeiten bei allen Probennahmen mehr als 50 % und im Juli sogar 100 % (Karaus 1999). Unter den Dipteren wurden über die Dauer der Beprobungen vor allem die Art *Prodiamesa olivacea* aber auch Vertreter der Chironomus-thummi-Gruppe nachgewiesen. Durch die Einleitung der Kläranlage Eppingen (Standort **El2**) verringerte sich die Artenvielfalt gegenüber El1 drastisch (Abb. 4.14): Vertreter der Familie der Chironomidae (Diptera) dominierten an diesem Standort mit 98 %, wobei auf 0,1 m^2 bis zu 182 Organismen der *Chironomus thummi*-Gruppe nachgewiesen werden konnten. Hirudinea und Crustacea trugen jeweils 1 % zur Gesamtartenliste bei. Chironomidenlarven stellen gute Indikatoren für organische Belastung dar, da es bei erhöhter Belastung zu Änderungen in der Chironomidengemeinschaft kommt (Saether 1979). Bei einem Vergleich der relativen Verteilungen der Chironomidengruppen (Unterfamilien und Triben) bei den Standorten vor und nach der Kläranlage fällt die Verschiebung von Charaktergruppen für belastete (Tanypodinae, Prodiamesinae) zu sehr stark belasteten Gewässern auf (*Chironomus thummi*-Gruppe mit einem Saprobiewert von 3,5; Armitage et al. 1995, Saether 1979, Wiederholm 1980a, b). In einer anderen Studie, dem BIOTOX-Programm zur Untersuchung der Elbe wurde eine Klassifikation der vorgefundenen Chironomiden nach zunehmender organischer Belastung erarbeitet, bei der die *Chironomus thummi*-Gruppe als eine Indikatorgruppe für sehr hoch belastete Sedimente diente (Mädler 1992). Die relativen Häufigkeiten der am Referenzstandort Hilsbach (**Hil**) gefundenen Großgruppen und Arten sind in Abb. 4.14 dargestellt. Im Verlauf der Probennahmen wurden Individuen der Gruppen Hirudinea, Crustacea, Ephemeroptera, Coleoptera, Trichoptera und Diptera gefunden. Im Vergleich zu den Probenstellen an der Elsenz konnte am Hilsbach eine größere Artenvielfalt nachgewiesen werden, die auf eine geringere Belastung dieses Gewässers hinweist. Zu den konstant präsenten Gruppen zählten Hirudinea, Trichoptera und Ephemeroptera. Auffällig war das Vorkommen von meist nur einer Art pro Gruppe in hohen Individuenzahlen. So kam *Hydropsyche siltalai* bei den Trichopteren, *Baetis spp.* bei den Ephemeroptera und *Gammarus fossarum* bei den Crustacea in hohen Individuenzahlen vor. Auch die fehl-

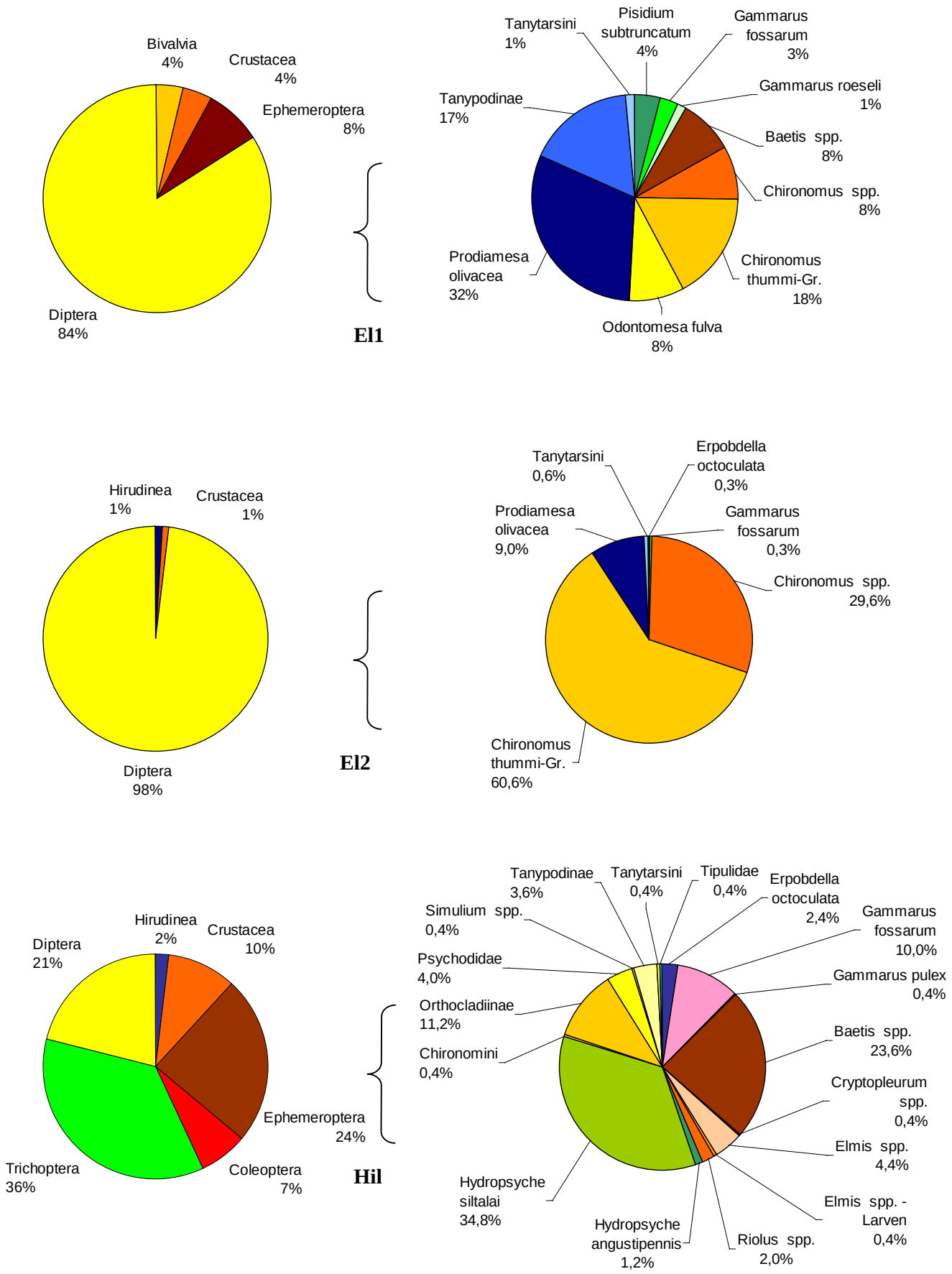


Abb. 4.14. Übersicht über die nachgewiesenen Großgruppen und Makrozoobenthos-Taxa im Elsenzgebiet, modifiziert nach Karaus (1999). El1 ist ein Standort an der Elsenz vor und El2 nach der Kläranlage Eppingen. Hil = Referenzstandort Hilsbach.

enden Nachweise von Vertretern der *Chironomus thummi*-Gruppe dokumentiert die bessere Gewässergüte des Hilsbachs im Vergleich zu den beiden Elsenz-Standorten.

Forellenbach

Am Standort nach der Kläranlageneinleitung **(Fb1)** wurden insgesamt sechs Arten aus drei Tierstämmen bestimmt (Tab. 4.9). Während bei den ersten beiden Probenahme im Mai und Juli *Asellus aquaticus* (Isopoda, 66 % und 88 %) und *Erpobdella octoculata* (Hirudinea, 10 % und 30 %) dominierten, konnten im August auch zahlreiche Dipteren-Larven aus der Familie Psychodidae (37 %) identifiziert werden. Auch am Referenzstandort **(Fb2)** fanden sich insgesamt sechs verschiedene Arten aus zwei Stämmen. Bei den beiden Probenahmen im Juli und August waren Crustaceen in beträchtlicher Individuenzahl vertreten (Gattung Niphargus: 67 % und 29 %, *Asellus aquaticus*: im August 18 %). Ein Drittel der erfassten Organismen wurde im Juli als *Chaetopteryx villosa* (Trichoptera) bestimmt. Bei der Bestandsaufnahme im August wurden Vertreter der Gattung *Sericostoma* (18 %), *Drusus annulatus* (23 %, beides Trichoptera) sowie Dipterenlarven aus der Familie der Limoniidae (12 %) gefunden. Der Standort nach dem Zusammenfluss der beiden Quellbäche **(Fb3)** zeigte mit 15 gefundenen Taxa die größte Artenvielfalt unter allen untersuchten Bachabschnitten (Tab. 4.9). Im Juli waren neben sieben Arten aus der Ordnung Trichoptera (insgesamt 43 % der Individuen) und Vertretern der Ordnung Ephemeroptera (Gattung *Baetis* und *Ephemerella ignita*, 48 %) auch Dipterenlarven der Familie Limoniidae (9 %) zu finden. Im August hatte sich das Artenspektrum dahingehend verschoben, dass Trichopteren nur noch mit einer Gattung (Sericostoma, 24 %) vertreten waren, Plecopteren mit zwei Arten (21 %) auftraten, Coleopteren der Gattung Elmis bestimmt werden konnten (3 %) und der Anteil der Dipterenlarven mehr als die Hälfte (52 %) der gefundenen Individuen ausmachte. Das Makrozoobenthos des Standortes **Fb4** wurde an den drei Erhebungsterminen durch *Gammarus fossarum* (69-85 %) dominiert. Insgesamt wurde mit 14 Taxa eine vergleichsweise hohe Artenvielfalt ermittelt, die eine Regeneration des Forellenbaches in diesem Abschnitt dokumentiert. Weiterhin konnten Trichopteren, Ephemeropteren Plecopteren und Coleopteren identifiziert werden (Tab. 4.9). Außerhalb der Beprobungszeiten (am 9.11.98 und 25.11.1998) fielen entlang des gesamten Klärbachs schimmelartige Überzüge der Stromsohle auf, die von Frau Dr. Radek (ehemals Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg, jetzt Zoologisches Institut der Freien Universität Berlin) als Kolonien des Ciliaten *Carchesium polypinum* bestimmt wurden, dessen Kolonien oftmals in der kalten Jahreszeit in Vorflutern unterhalb von schlecht funktionierenden Kläranlagen anzutreffen und typische Anzeiger für eine stark belastete Gewässerqualität (Gewässergüte III) sind (Berger et al. 1997).

Mühlbach

Am Oberlauf des Mühlbachs (**Mb1**) wurden insgesamt 11 Arten aus den drei Insekten-Ordnungen Trichoptera, Plecoptera und Diptera identifiziert (Tab. 4.9). Zum ersten Probenahmen-Zeitpunkt fanden sich (unter den insgesamt in die Untersuchungen einbezogenen Taxa) lediglich Vertreter der Trichoptera (5 Arten, nach Individuenzahlen 47 %) und Plecoptera (2 Arten, 53 %). Auch bei den beiden Probennahmen im Juli und August dominierten Trichoptera und Plecoptera die Biozönose. Zudem konnten Dipterenlarven mit 12-14 % der Gesamtindividuenzahl identifiziert werden. Im Gegensatz zu der hohen Diversität im Oberlauf wurde im Unterlauf des Mühlbachs (**Mb2**) eine stark degradierte Biozönose angetroffen: Es wurden mit 5 Arten die wenigsten Taxa unter allen untersuchten Bachabschnitten der Triade gefunden. Die beiden im Juli und August durchgeführten Bestandsaufnahmen belegten die Abwesenheit sowohl von Trichopteren als auch von Plecopteren zu diesen Zeitpunkten. An deren Stelle fanden sich Dipterenlarven der Art *Prodiamesa olivacea* (26 % beziehungsweise 24 %) sowie Mollusken (vier Arten).

Tab. 4.9. Die Individuenzahlen pro m^2 der 32 bestimmten Taxa für die Beprobungsstellen des Forellenbachs (Fb) und des Mühlbachs (Mb) für die Beprobungszeitpunkte Mai (V), Juli (VII) und August (VIII) 1998. Die Referenzstandorte sind grau unterlegt. Modifiziert nach Siebert (1999).

Standort	Fb1			**Fb2**		Fb3		Fb4			**Mb1**			Mb2	
Probentermin	V	VII	VIII	VII	VIII	VII	VIII	V	VII	VIII	V	VII	VIII	VII	VIII
Chironomidae															
Prodiamesa olivacea	-	-	-	-	-	-	78	-	-	-	-	-	-	122	122
Tanypodinae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-
Coleoptera															
Elmis spp.	-	-	-	-	-	-	11	-	-	11	-	-	-	-	-
Limnius spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-
Crustacea															
Asellus aquaticus	367	333	378	-	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gammarus fossarum	-	-	-	-	-	-	-	300	200	911	-	-	-	-	-
Niphargus spp.	-	-	-	44	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diptera															
Limoniidae	-	-	-	-	22	44	122	-	-	-	-	22	11	-	-
Psychodidae	-	-	467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ephemeroptera															
Baetis spp.	-	-	-	-	-	189	-	-	22	-	-	-	-	-	-
Baetis melanonyx	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ephemerella ignita	-	-	-	-	-	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hirudinea															
Erpobdella octoculata	167	44	333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastropoda															
Physella acuta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100
Potamopyrgus antipodarum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	78
Radix ovata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56	111
Radix peregra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	156	89
Plecoptera															
Leuctra nigra	-	-	-	-	-	-	11	-	-	22	44	-	22	-	-
Nemoura spp.	11	-	22	-	-	-	67	-	-	-	-	-	11	-	-
Protonemoura spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	33	-	-	-
Trichoptera															
Chaetopteryx major	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	-	-
Chaetopteryx villosa	-	44	33	22	-	22	-	-	33	56	67	33	67	-	-
Drusus annulatus	-	-	-	-	44	44	-	11	11	-	-	-	-	-	-
Hydropsyche instabilis	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
Lithax niger	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
Micropterna lateralis	11	-	-	-	-	11	-	-	-	22	-	22	33	-	-
Odontocerum albicorne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	11	-	-
Potamophylax cingulatus	-	-	-	-	-	11	-	11	11	-	22	-	-	-	-
Rhyacophila dorsalis	-	-	-	-	-	44	-	11	11	-	-	-	-	-	-
Rhyacophila tristis	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
Sericostoma spp.	-	-	-	-	33	22	89	-	-	44	11	33	89	-	-
Wormaldia occipitalis	-	-	-	-	-	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taxa je Probenahme	4	3	5	2	5	11	6	7	6	7	7	6	8	5	5
Taxa je Standort		6		6		15			14			11		5	

4.6.2 Saprobienindex

Abb. 4.15 gibt einen Überblick über die ermittelten Saprobienindices der Fließgewässer nach der erweiterten Taxaliste der LfU Baden-Württemberg. Es konnten Saprobienindices zwischen 1,5 (oligosaprob bis β-mesosaprob, gering belastet) und 3,2 (α-mesosaprob bis polysaprob, sehr stark verschmutzt) ermittelt werden. Während für die Flachwasserzone bei Eberbach (Eb1, Eb2) keine großen Unterschiede in der Belastung mit leicht abbaubaren organischen Substanzen nachgewiesen werden konnten, zeigte der Saprobienindex bei den anderen Fließgewässergruppen jeweils die geringste Belastung für die Referenzstandorte und einen Regenerationsstandort am Forellenbach (Fb4) an. Die Kläranlage Eppingen (zwischen den Standorten El1 und El2) verschlechterte die (ohnehin sehr hohe) Saprobie der Elsenz nicht signifikant, wogegen die Kläranlage am Kohlhof (Fb1) eine deutliche Erhöhung des Saprobienindex gegenüber der Kontrolle Fb2 bewirkte. Eine starke saprobielle Degradation im Vergleich zur Referenz (1,5) konnte auch für den Unterlauf des Mühlbaches (2,6) nachgewiesen werden. Zu den Ergebnissen der Saprobienindices sei kritisch angemerkt, dass in einzelnen Fällen die in DIN 38410 geforderte statistische Absicherung der Befunde mittels einer Abundanzsumme von mindestens 15 beziehungsweise einem Streuungsmaß von höchsten 0,2 nicht gewährleistet werden konnte, so dass die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind. Durch die Mehrfachbestimmung der Saprobienindices mit mehreren Probennahmen-Zeitpunkten und die dabei festgestellten geringen Schwankungen (Karaus 1999, Siebert 1999) können aber dennoch die Tendenzen eindeutig abgeschätzt werden. Am Standort Fb2 konnte ein Saprobienindex nach DIN von 2,7 (Güteklasse III) bestimmt werden (Siebert 1999), wogegen der Saprobienindex mit der erweiterten Taxaliste der LfU Baden-Württemberg den Bachabschnitt mit 1,8 (Abb. 4.15, Güteklasse II) bewertete. Bei der DIN-Klassifizierung war als einziges DIN-Taxon die Wasserassel *Asellus aquaticus* mit einem Saprobiewert von 2,7 vertreten und bedingte allein die Klassifikation. Dieser Vergleich veranschaulicht, dass durch die Verwendung des Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste eine repräsentativere Bewertung der Saprobie möglich ist.

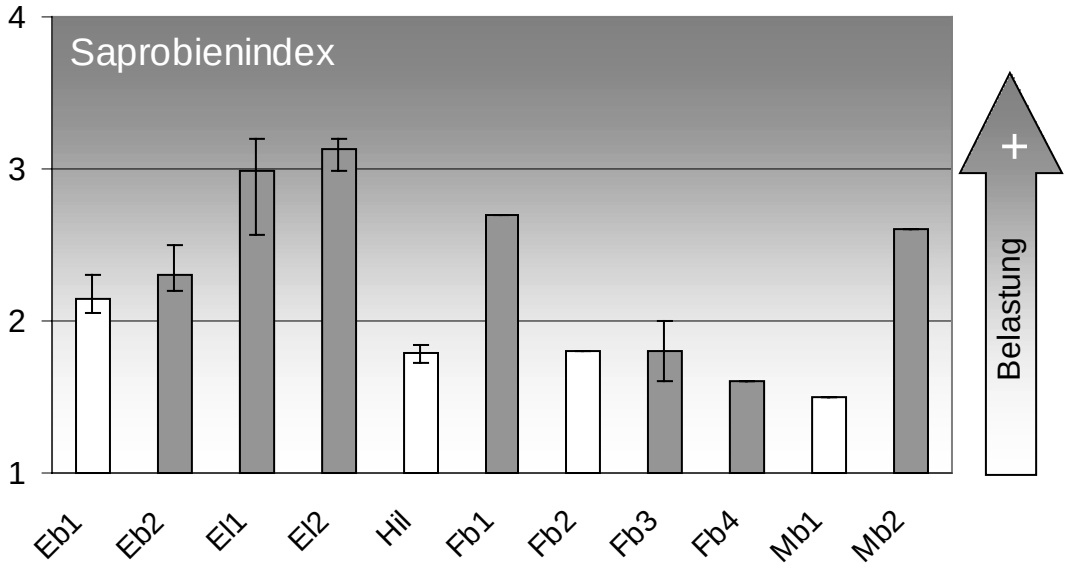


Abb. 4.15. Saprobienindices der Fließgewässerstandorte nach der erweiterten Taxaliste. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert des Saprobienindex, der aus den Indices von zwei (Fb2, Fb3, M2) bis drei Beprobungsterminen berechnet wurde. Die Minima und Maxima der Saprobienindices der einzelnen Beprobungstermine werden als Fehlerindikatoren dargestellt. Die Referenzstandorte der einzelnen Fließgewässergruppen sind hell dargestellt. Datengrundlage: Karaus (1999) und Siebert (1999).

4.6.3 Ökotoxikologischer Index nach Carmargo

Abb. 4.16 zeigt die Verteilung der Ökotoxikologischen Indices nach Carmargo, die auf Basis der Gesamtartenlisten der einzelnen Standorte berechnet wurden. Der höchste Ökotoxikologischen Index (77) konnte für den Unterlauf des Mühlbachs ermittelt werden. Dieser Befund korreliert sehr gut mit der in 4.6.3 dargestellten hohen Zunahme der Saprobie des Mühlbaches. Am Forellenbach wurden als Referenz der Standort Fb4 gewählt, da sich der eigentliche Referenzstandort Fb2 als ökologisch degradiert (Abschnitt 4.6.1) und mit Altlasten (Abschnitte 4.5.6 und 4.7) belastet erwies. Nicht nur für den Fließgewässerabschnitt nach der Kläranlageneinleitung (Fb1, 76,5) sondern auch für den Referenzstandort (Fb2, 73,5) konnte eine hoher Ökotoxikologischer Index berechnet werden. Die hohe Belastung des Referenzstandortes Fb2 deckt sich nicht mit dem Saprobienindex, der nur eine leicht erhöhte organische Belastung gegenüber dem Regenerationsstandort Fb4 nachweisen konnte (Abb. 4.16). Vielmehr scheint am Standort Fb2 eine Belastungsart vorzuliegen, die eine deutliche Degradation der Biozönose bewirkt, aber nicht mit dem Saprobienindex nachgewiesen werden kann, der in erster Linie die Belastung mit leicht abbaubaren organischen Stoffen bewertet. Als mögliche Belastungsarten kommen starke pH-Schwankungen (niedriger pH des geogen sauren Standort versus gelegentliche Spülungen der alkalischen Substrate des Wasserwerkes) im Oberlauf oder toxisch wirkende Substanzen in Frage. Der hohe Ökotoxikologische Index am Standort Fb2 korreliert auch mit einzelnen Befunden aus den Triade-Komponenten Bioassay und Chemischer Analytik: Es konnten an diesem Standort sowohl eine leichte mutagene und gentoxische Wirkung (Abschnitte 4.7.6-7) als auch erhöhte Konzentrationen von PCBs und PCDD/Fs (Abschnitt 4.5.6) nachgewiesen werden.
Im Gegensatz zum Saprobienindex konnte auch bei der Neckarflachwasserzone mit Hilfe des Ökotoxikologischen Index eine eindeutige Belastung des hinteren Abschnittes der Flachwasserzone (Eb2) gegenüber dem Übergang zum Neckar (Eb1) ermittelt werden. Im Elsenzgebiet ermittelte dieser Index ebenso wie der Saprobienindex die geringste Belastung für das Referenzgewässer Hil. Im Gegensatz zum Saprobienindex resultierte aus der Einleitung der Kläranlage Eppingen eine deutliche Zunahme des Ökotoxikologischen Index am Standort El2.

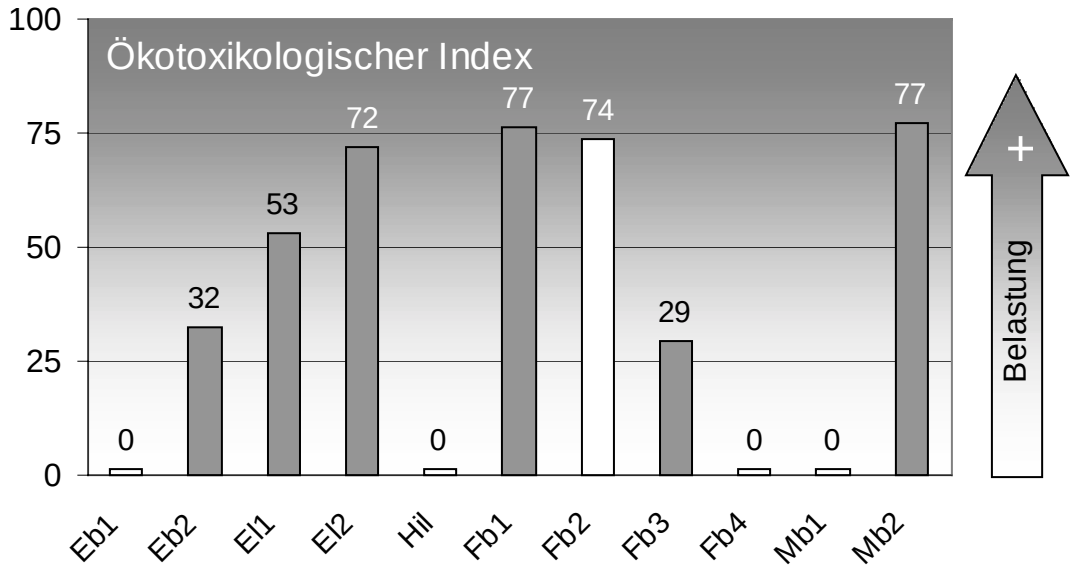


Abb. 4.16. Ökotoxikologischer Index nach Carmargo für die bei einer Sedimenttriade untersuchten Fließgewässerstandorte im Einzugsgebiet des Neckars. Hell dargestellt sind die Referenzstandorte der einzelnen Fließgewässergruppen. Da sich am Forellenbach der Referenzstandort als stark degradiert und chemisch stark belastet erwies, wurde der Regenerationsstandort Fb4 als Referenzstandort für die Berechnung des Ökotoxikologischen Index eingesetzt.

Während insgesamt die Ergebnisse des Ökotoxikologischen Index mit einem Korrelationskoeffizienten nach Person von 0,69 gut mit denen des Saprobienindex korrelierten (Abb. 4.17), ermittelte der Ökotoxikologische Index für den Referenzstandort des Forellenbaches (Fb2), aber auch für die Standorte Eb2 und El2 erhöhte Belastungen im Vergleich zum Saprobienindex. Diese Befunde verdeutlichen, dass die ausschließliche Bewertung des *In situ*-Zustandes von Fließgewässerbiozönosen mit Hilfe von Saprobie-basierten Indices, wie sie bisher in den meisten europäischen Staaten durchgeführt wird, nicht ausreichend ist (Braukmann & Pinter 1997a) und sogar zu falsch negativen Bewertungen führen kann. Da die saprobielle Belastung mit zunehmendem Anschluss von Kommunen und Industrie an das Kläranlagennetz mehr und mehr an Bedeutung verliert, sich die ökologische Gewässerqualität aber nicht im gleichen Maße verbessert, wird der Bedarf an einer umfassenden ökologischen Bewertung deutlich (Friedrich & Lacombe 1992). Durch die weiterführende Informationen zur Belastung, die durch die Verwendung des Ökotoxikologischen Indexes in dieser Sedimenttriade erhalten werden konnten, kann er als Index zur Bewertung des Zustandes *in situ* zur Ergänzung des Saprobienindex uneingeschränkt empfohlen werden. Auch bei einer Meta-Analyse von Makrozoobenthos-Daten von 162 belasteten Gewässerabschnitten mit unterschiedlichen Belastungsarten (wie beispielsweise organischer und struktureller Belastung, Textil-, Fischteich- und Deponieabwässer, Säure sowie Restwässer) konnte gezeigt werden, dass der Ökotoxikologische Index zwar nicht als toxizitätsspezifisch anzusehen ist, aber in fast allen Fällen von Belastung mit einer signifikanten Zunahme reagierte und sich daher für die Bewertung von toxischen Wirkungen *in situ* sehr gut eignet (Böhmer et al. 1999).

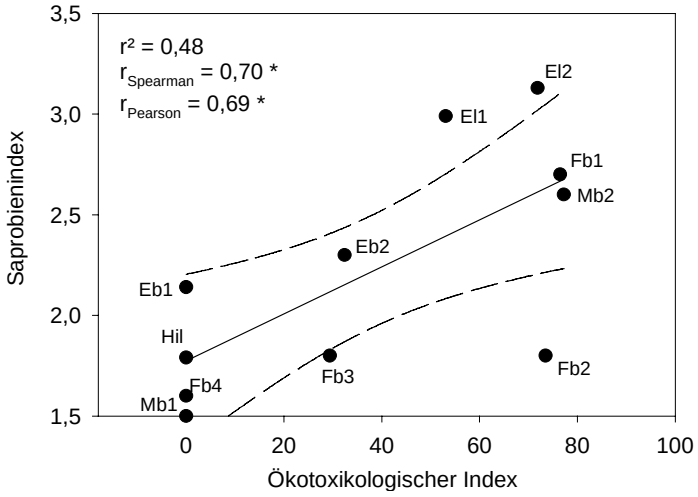


Abb. 4.17. Korrelation des Saprobienindex und des Ökotoxikologischen Index. * $p < 0,05$. Die gestrichelten Linien stellen das 5- und 95%-Konfidenzintervall dar.

4.6.4 Rhithron-Ernährungstypen-Index

Übersichten über die bei der Sedimenttriade ermittelten Anteile verschiedener Ernährungstypen des Makrozoobenthos geben Karaus (1999) und Siebert (1999). Auf Basis dieser Daten wurde der Rhithron-Ernährungstypen-Index (RETI) berechnet und in Abb. 4.18 dargestellt. Da sich der Index nur für Fließgewässer mit einer Breite von unter 5 m berechnen lässt (Schweder 1992), konnte er nicht für die Flachwasserzone bei Eberbach ermittelt werden. Mit Hilfe des RETI konnte für die Standorte im Elsenzgebiet (El1 > El2 > Referenz Hil) und für den Forellenbachstandort Fb3 eine deutliche, sowie für den Unterlauf des Mühlbaches (Mb2) und den Referenzstandort des Forellenbaches (Fb2) eine leichte Störung der Zusammensetzung der Ernährungstypen des Makrozoobenthos nachgewiesen werden. Während in einigen Studien Kläranlageneinleitungen zu einer deutlichen Abnahme des RETI führten (Adam et al. 2000, Böhmer et al. 1999, Schweder 1992), entspricht der hohe RETI nach der Einleitung der Kläranlage am Forellenbach (Fb1; Mittelwert von 0,74 bzw. 0,6 bei der Triadeprobennahme im August), trotz der dokumentierten Degradation bei anderen Indices, der Zusammensetzung einer nur leicht gestörten Ernährungstypenverteilung. Als mögliche Erklärung für den hohen RETI könnte die geringe Artenvielfalt des Standortes (insgesamt nur 6 Arten) in Kombination mit einer umstrittenen Einteilung einzelner Arten zu bestimmten Ernährungstypen dienen: Bei einigen Organismen,

etwa *Gammariden,* der Trichopterengattung *Drusus* und der Ephemeroptere *Baetis rhodani* sind die Ernährungstypen-Zuordnungen widersprüchlich (Böhmer et al. 1999, Schweder 1992). Der hohe RETI von Fb1 ergibt sich beispielsweise aus dem massenhaften Aufkommen von *Asellus aquaticus*. Böhmer et al. (1999) konnten bei einem Vergleich von Makrozoobenthos-Datensätzen von 162 belasteten Gewässerabschnitten mit Referenzen zeigen, dass aus dem Modus der Zuordnung deutliche Unterschiede in den Ergebnissen des RETI resultieren können. Weiterhin könnte die Habitatstruktur und die vorherrschenden großen Korngrößen bewirken, dass Sedimentfresser, die bei der Berechnung des RETI eine Erniedrigung des Indexwertes bewirken, sich am Standort Fb1 nicht ansiedeln konnten.

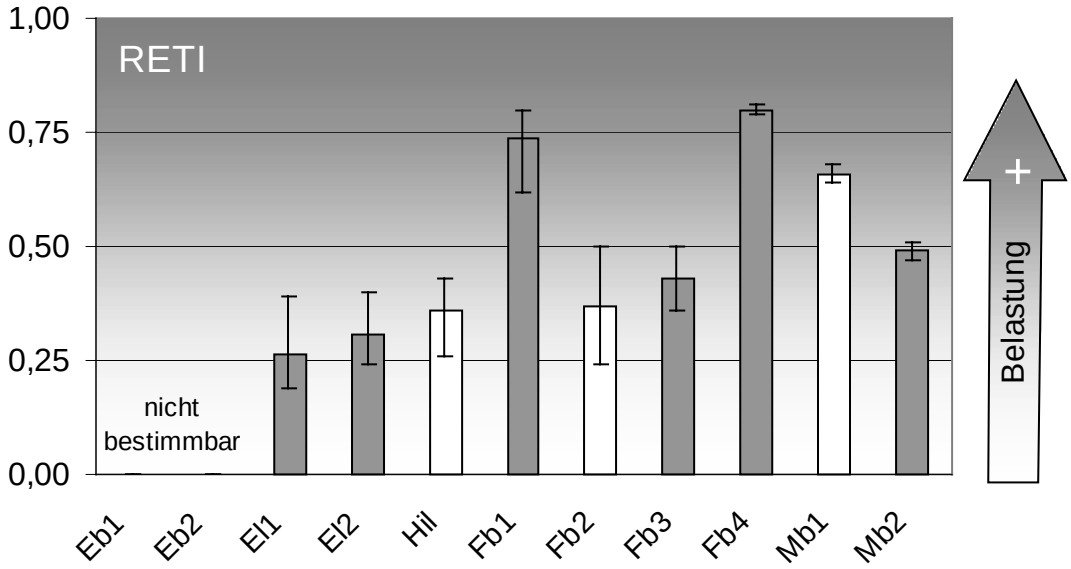


Abb. 4.18. Verteilung des Rhithron-Ernährungstypen-Index (RETI) der Fließgewässerstandorte, die im Rahmen einer Sedimentbewertungstriade untersucht wurden. Als Balken sind die Mittelwerte der RETI von 3 Beprobungsterminen, als Fehlerbalken die Minima und Maxima dargestellt. Ein RETI von ≤ 0,5 zeigt für Bäche ein gestörtes und naturfernes Ernährungsgefüge an (Schweder 1992). Datengrundlage: Karaus (1999) und Siebert (1999).

4.6.5 Diversität und Evenness

Abb. 4.19 gibt einen Überblick über Diversität (H_s) und Evenness der untersuchten Fließgewässer. Während für die Flachwasserzone, den Mühlbach, den Standort Fb3 am Forellenbach sowie El1 und Hil im Elsenzgebiet nur geringe Verunreinigungen (H_s von 2-3) nachgewiesen werden konnten, zeigte der Index für die beiden Standorte nach Kläranlagen (Fb1 und El2) aber auch für den Regenerationsstandort am Forellenbach eine mäßige Verunreinigung (H_s von 1-2) an. Die ermittelte Evenness deutete nur bei Fb4 auf ein gestörtes Ökosystem hin. Diese Befunde zeigen, dass die Belastungen von Fließgewässern mit dem Shannon-Wiener-Index und der Evenness alleine nicht eindeutig eingeordnet werden können. Auch Böhmer et al. (1999) konnten zeigen, dass sich der Diversitätsindex nach Shannon-Wiener für die Anzeige allgemeiner Belastungen von Fließgewässern nicht eignet, da bei fast allen untersuchten Belastungsarten eine Zunahme und nicht Abnahme des Index zu verzeichnen war. Diese Zunahme ist in erster Linie durch den Rückgang des prozentualen Anteils der dominierenden Taxa bei gleichzeitigem Verlust einiger individuenschwacher Taxa zu erklären (Böhmer et al. 1999).

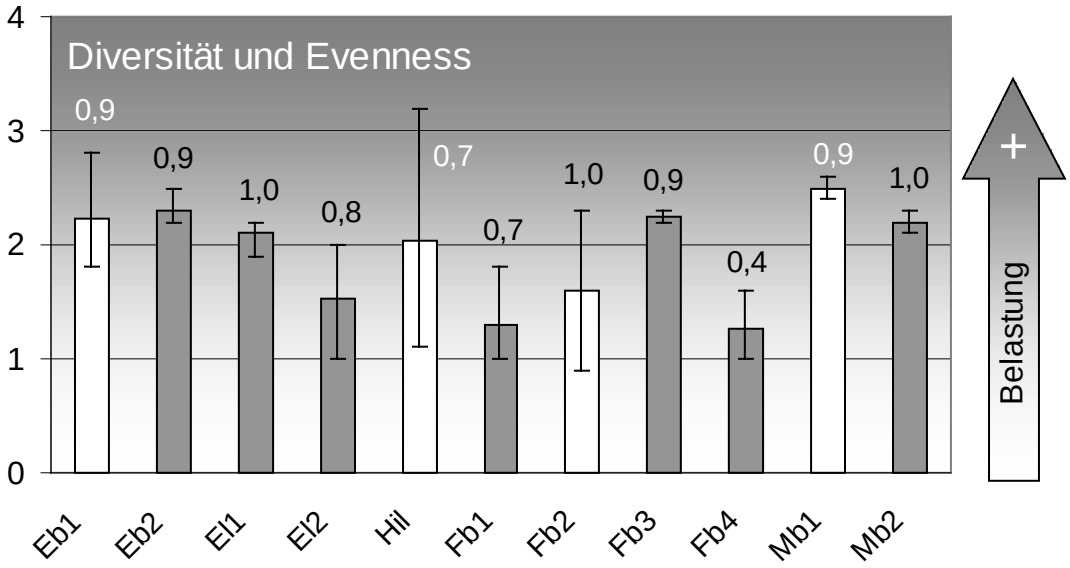


Abb. 4.19. Diversität und Evenness der untersuchten Fließgewässerstandorte. Die Balken stellen die Mittelwerte des Diversitätsindex nach Shannon-Wiener aller drei Beprobungstermine und die Fehlerbalken die ermittelten Minima und Maxima dar. Die Mittelwerte der Evenness sind als Ziffern angegeben. Datengrundlage: Karaus (1999) und Siebert (1999).

4.6.6 Sauerstoffindikationen

In Abb. 4.20 sind die mit Hilfe von Makrozoobenthosanalysen ermittelten Sauerstoffindikationen der Sedimenttriade dargestellt, die jeweils aus der Sauerstoffstufe mit der höchsten Dominanz ermittelt wurden. Es konnten große Unterschiede in den Sauerstoffindikationen festgestellt werden. Insbesondere bei den Fließgewässern mit kleinen, silikat-dominierten Einzugsgebieten (Forellenbach und Mühlbach) konnten unterschiedliche Sauerstoffindikationen nachgewiesen werden: Am Unterlauf des Mühlbachs (Mb1) und beim Forellenbach am Standort nach der Kläranlageneinleitung konnte eine mittlere Sauerstoffindikation von 4 (schlecht) ermittelt werden, die mit einer Mindestsauerstoffkonzentration von nur 2 mg/L einhergeht. Im Gegensatz dazu betrug an den anderen Standorten beider Fließgewässer die Sauerstoffindikationen zwischen 1 und 2 (sehr gut bis gut). Auf verminderte, teilweise sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen weisen auch die Sauerstoffindikationen bei der Flachwasserzone bei Eberbach (Eb2) und bei der Elsenz (El1, El2) hin (Abb. 4.20). An diesen Standorten wurde zumindestens bei einem Beprobungstermin die Sauerstoffstufe von 5 (sehr schlecht) detektiert, die anzeigt, dass Anaerobie auch über längere Zeit vorherrschen kann. Während mit limnochemischen Methoden in der Flachwasserzone mäßige bis kritische Sauerstoffkonzentrationen (4,1-6,3 mg/L, LAWA-Güteklassen II-III) nachgewiesen werden konnten, betrugen die Sauerstoffkonzentrationen an der Elsenz zwischen 7,4 und 9,2 mg/L (LAWA-Güteklassen I-II). Dieser Befund verdeutlicht, dass durch punktuelle physikalische Messung die Minima der Sauerstoffkonzentrationen in einem Gewässer nur sehr schlecht bewertet werden können. Mit physikalischer Messung nicht erfasste Sauerstoffminima können durch Verdrängung von sauerstoffempfindlichen Arten Veränderungen in der Zusammensetzung der Biozönose bewirken, die mittels der biologisch-ökologischen Sauerstoffindikation retrospektiv erfasst werden kann (Böhmer et al. 1998).
Nach Böhmer et al. (1999) zeigt die Makrozoobenthos-Sauerstoffindikation sehr spezifisch die Sauerstoffversorgung an: Bei einer Überprüfung von 162 belasteten Gewässerabschnitten und ihrer Referenzen zeigten fast nur strukturell und saprobiell belastete Gewässer aber auch Restwässer eine deutliche

Abweichung zur Sauerstoffindikation der Referenz, wogegen die anderen Belastungsarten nur geringe Abweichungen bewirkten.

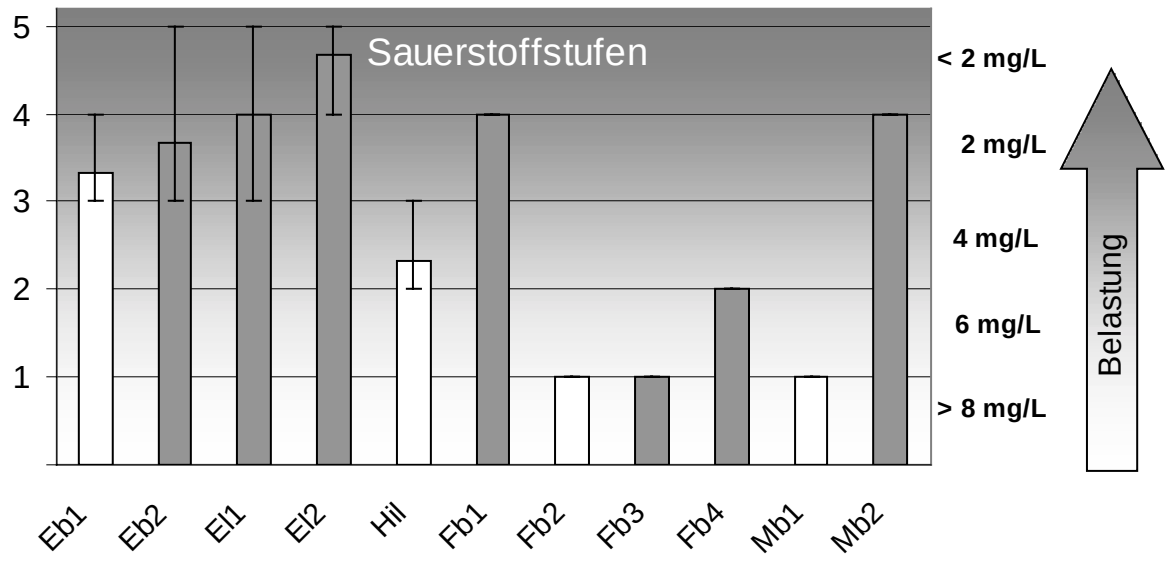


Abb. 4.20. Sauerstoffindikation der untersuchten Fließgewässerstandorte. Die Balken stellen die Mittelwerte der Sauerstoffindikation (Sauerstoffstufe mit der höchsten Dominanz) aller drei Beprobungstermine und die Fehlerbalken die ermittelten Minima und Maxima dar. Datengrundlage: Karaus (1999) und Siebert (1999). Rechts sind die mit den biologischen Sauerstoffstufen korrespondierenden Mindestsauerstoffkonzentrationen dargestellt, die höchstens kurzfristig unterschritten werden (LfU 1992).

4.6.7 Vergleichende Bewertung der Makrozoobenthosanalysen

Flachwasserzone bei Eberbach

Die verschiedenen Bewertungsindices für Makrozoobenthos zeigten für die beiden Standorte der Flachwasserzone bei Eberbach eine relativ einheitliche, hohe Belastung an. So konnte an beiden Standorten eine mäßige bis kritische saprobielle Belastung nachgewiesen werden, die mit niedrigen physikalisch gemessenen Sauerstoffkonzentrationen und mittels sauerstoffempfindlicher Taxa ermittelter biologisch-ökologischer Sauerstoffindikation korrelierte. Während mit der Mehrzahl der Bioindizes für Eb1 die gleiche Belastung nachgewiesen werden konnte wie für Eb2, zeigte die Einteilung in Güteklassen nach der Karlsruher Methode eine deutlich schlechtere Einstufung des hinteren Abschnittes der Flachwasserzone (Tab. 4.10, Karaus 1999). Auch der Ökotoxikologische Index zeigte eine höhere Belastung für den Standort Eb2 an.

Tab. 4.10. Güteklassen der Flachwasserzone Eberbach nach der Karlsruher Methode

Beprobung	Eb1	Eb2
Mai	I-II	II-IV
Juli	I-II	n.b.
August	III-IV	III-IV

n.b.: aufgrund fehlender Übereinstimmung mit der Liste von Schmitz (LfU 1992), konnte keine Einteilung erfolgen.

Die in 4.6.6 diskutierte schlechte Eignung des Diversitätsindex nach Shannon und Wiener zur Bewertung allgemeiner Belastung lässt sich an der Flachwasserzone demonstrieren: Während bei einer Effizienzkontrolle der Flachwasserzone durch Geier (1994) im Jahre 1994 ein Diversitätsindex von 1,2 und eine Evenness von 0,71 ermittelt werden konnte, wurden in dieser Studie Diversitätsindices von 1,8-2,8 (mit einer Evenness von etwa 1) ermittelt, die eine scheinbare Erhöhung der Diversität vortäuschen. Die Zunahme des Diversitätsindex ist dabei in erster Linie durch den Rückgang des prozentualen Anteils der dominierenden Taxa bei gleichzeitigem Verlust einiger individuenschwacher Taxa zu erklären (Böhmer et al. 1999). *De facto* verringerte sich aber die Gesamtzahl der vorgefundenen Makrozoobenthosarten bzw. Gattungen von 45 im Jahre 1994 (Geier 1994) auf nur 24 im Jahre 1998 (Karaus 1999). Obwohl bereits Geier (1994) im Vergleich zu anderen Untersuchungen an Flachwasserzonen in Altrheinen (Halbfass 1990) geringe Diversität und Besiedlungsdichten nachgewiesen hat, konnte diese Studie somit eine weitere tendenzielle Artenverarmung dokumentieren. Es sollte kritisch angemerkt werden, dass diese Studie nur bedingt mit den Untersuchungen von Geier (1994) verglichen werden kann, da im Jahre 1994 eine längere Periode und eine Mehrzahl von Beprobungsstellen untersucht wurde, so dass *a priori* mehr Arten angenommen werden können.

Die geringe Diversität der Flachwasserzone kann mehrere Ursachen haben:

- Regelmäßig, etwa alle 10-20 min vorbeifahrende Schiffe bewirken starke Strömungen im Übergangsbereich sowie Wasserstandsschwankungen von bis zu 20 cm im hinteren Bereich der Flachwasserzone, gekoppelt mit temporärem Trockenfallen.
- Die morphologische Struktur bewirkt eine starke Sedimentation von feinkörnigen Schwebstoffen im hinteren Abschnitt der Flachwasserzone und führt zu einseitigen Habitatstrukturen. Im Vergleich zu tonig-schluffigen Sedimenten sind Schotterstrecken fast immer quantitativ und qualitativ reicher besiedelt (Schönborn 1992). Halbfass (1990) konnte in Altrheinarmen, die aufgrund extremer Wasserstandsschwankungen und Wellenschlag bei gleichzeitig fehlender schützender Habitate, ebenfalls eine verarmte Makrozoobenthos-Gesellschaft nachweisen und eine deutliche Abhängigkeit der Besiedlung vom Substrat zeigen.
- Durch die Wasserstandsschwankungen werden die abgelagerten Sedimente ständig remobilisiert, so dass durch ständige Oxidation in der Wassersäule eine Sauerstoffzehrung und eine Anreicherung von leicht austauschbaren Metallbindungsspezies im Sediment verursacht werden kann (Calmano et al. 1991), die eine hohe Verfügbarkeit und damit Toxizität für Organismen besitzen (Hollert et al. 1999a).
- Ein weiterer Belastungsfaktor im Untersuchungsgebiet der Flachwasserzone stellt die hohe Temperatur im Sommer dar, die beispielsweise mit einer verminderten Sauerstoffsättigung einhergeht.

Elsenzgebiet

Im Einzugsgebiet der Elsenz konnte mit Hilfe der Charakterisierung von Makroinvertebraten deutliche Unterschiede bezüglich der Belastung ermittelt werden. Während mit der Mehrzahl der verwendeten Bioindices für den Hilsbach (als Referenz des Elsenzgebietes) die geringste, aber dennoch deutliche Belastung nachgewiesen werden konnte, erwiesen sich beide Standorte an der Elsenz als stark degradiert. Der hohe Saprobienindex (3,0) am Standort El1 vor der Kläranlage Eppingen erhöhte sich durch die Abwassereinleitung nur geringfügig auf 3,1. Die Sauerstoffindikation nahm von Stufe 4 (schlecht) zu der Stufe 5 (sehr schlecht) zu, so dass aufgrund der nachgewiesenen Taxa im Gewässerabschnitt nach der Kläranlage zeitweise sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen (unter 2 mg/L mit Tendenz zur Anaerobie) angenommen werden können (LfU-Baden-Württemberg 1992). Die biologisch-ökologische Sauerstoffindikation stimmt nicht mit den nachgewiesenen hohen Sauerstoffkonzentrationen im Oberflächenwasser (Abschnitt 4.5.1) überein, lässt sich aber durch eine starke Sauerstoffzehrung während der Nacht erklären (Böhmer et al. 2000, Braukmann 1987, Braukmann & Pinter 1997b). Im Gegensatz zum Saprobienindex verschlechterte sich der Ökotoxikologische Index dras-

tisch um 35,8 %. Somit scheint von der Kläranlage Eppingen eine ökologische Belastung auszugehen, die mit Hilfe des Saprobienindex, der in erster Linie auf organisch leicht abbaubare Stoffe reagiert, nicht erfasst werden kann (Böhmer et al. 1999). Auch die deutliche Verschlechterung des Diversitätsindex nach Shannon-Wiener von 2,1 zu 1,5 demonstriert eine Verringerung der Diversität durch die Kläranlageneinleitung. Weiterhin dokumentiert die Verschiebung der Chironomiden-Dominanzen von Charaktergruppen für belastete (Tanypodinae, Prodiamesinae) zu sehr stark belasteten Gewässern (Chironomus thummi-Gruppe) die Belastung des Gewässers durch die Kläranlageneinleitung (Armitage et al. 1995, Saether 1979, Wiederholm 1980a, b).

Forellenbach

Am Forellenbach konnte eine deutliche Degradation des Fließgewässerabschnittes nach der Kläranlageneinleitung (Fb1) gegenüber dem Referenzstandort (Fb2) festgestellt werden. Der Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste verringerte sich beispielsweise um eine Güteklasse, und die Sauerstoffindikation verschlechterte sich um drei Güteklassen von sehr gut nach schlecht. Jedoch fiel auch eine relativ geringe Artenvielfalt am Referenzstandort auf. Eine Berechung des Ökotoxikologischen Index, bei welcher der Regenerationsstandort Fb4 als Bezugsgröße gewählt wurde, konnte eine starke Degradation nicht nur für den Abschnitt nach der Kläranlageneinleitung, sondern auch für den Referenzstandort Fb2 nachweisen. Daher müssen für den Referenzstandort Störungen der Biozönose angenommen werden, die durch den Saprobienindex nicht erfasst werden konnten und sich somit nicht auf organisch leicht abbaubare Stoffe zurückführen lassen. Als mögliche Ursachen für die geringe Artenvielfalt am Referenzstandort können strukturelle Belastungen ausgeschlossen werden, da dieser Fließgewässerabschnitt eine naturnahe Struktur besaß. Vielmehr könnten Säurebelastung oder ökotoxikologisch relevante Umweltschadstoffe für die Störungen der Biozönosen verantwortlich sein. Siebert (1999) konnte mit Hilfe einer makrozoobenthosbasierten Ermittlung der Säurestufen sehr hohe Säurebelastungen sowohl für den Standort Fb1 (Stufe 4, permanent sauer) als auch Fb2 (Stufe 3, kritisch sauer) nachweisen. Am Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3) und am Regenerationsstandort Fb4 wurde mit einer Klasse von 2 wieder eine typische Säurestufe für Fließgewässer des Buntsandstein-Odenwaldes erreicht (Bostelmann et al. 1994, Braukmann & Vobis 1998). Somit könnte die Säurebelastung durchaus einen Einfluss auf die geringe Diversität der Standorte Fb1 und Fb2 besessen haben. Mit der vergleichsweise geringeren Säurebelastung könnte auch die größere Artenvielfalt am Standort Fb3 zu erklären sein, der sich in Bioassays und chemischer Analytik als stark belastet erwies (Abschnitte 4.5 und 4.7). Der Referenzstandort erwies sich in einzelnen Bioassays zur mutagenen und gentoxischen Wirkung und insbesondere bezüglich der Belastung mit PCDD/PCDF- und PCB als deutlich kontaminiert. Daher kann insbesondere die dokumentierte ökotoxikologische Belastung als Ursache für die Störungen in der Zusammensetzung der Biozönose am Referenzstandort Fb2 angenommen werden. Am Forellenbach konnte die Schädigung des Makrozoobenthos wie folgt zusammengefasst werden: Fb1 >> Fb2, Fb3 > Fb4. Die dargestellten Befunde verdeutlichen, dass schon bei kleinen Einzugsbereichen komplexe Störungsmuster und Quellen für Störungen des Makrozoobenthos vorliegen können, so dass eine umfassende Bewertung *in situ* nur mit Hilfe mehrerer Bioindices durchgeführt werden kann (Braukmann & Pinter 1997a).

Mühlbach

Für den Mühlbach konnte mit der Analyse des Makrozoobenthos eine starke Degradation der Biozönose im Unterlauf festgestellt werden. Die Mehrzahl der eingesetzten Bioindices zeigte eine nur geringe Störung der Biozönose für den Oberlauf des Fließgewässers an. Die geringe organische Belastung (Gewässergüte I-II) spiegelt sich auch in der relativ hohen Artenvielfalt (11 Taxa) wider. Der ermittelte RETI von 0,66 zeigt die Dominanz der Weidegänger und Zerkleinerer und ist für kalkarme, naturnahe Rhitrale charakteristisch (Schönborn 1992, Schweder 1992). Der turbulente Verlauf mit schnellen und kleinen Wasserfällen begründet zusammen mit der geringen organischen Belastung die

sehr gute Sauerstoffindikation von 1. Als problematisch erwies sich im Oberlauf des Fließgewässers die hohe Säureklasse von 3-4 (Siebert 1999), die weiterhin durch das völlige Fehlen säuresensitiver Taxa wie Eintagsfliegen, Gammariden und Mollusken (Braukmann & Vobis 1998) untermauert wurde (Siebert 1999). Die Säurebelastung ist auch für die schlecht gepufferten Buntsandsteinböden des Odenwaldes sehr hoch, für die Werte zwischen 2 und 3 typisch sind (Bostelmann et al. 1994, Braukmann 1987). Sowohl die Dominanz von Fichtenforsten im Einzugsgebiet des Mühlbaches (Braukmann & Vobis 1998) als auch die direkte Exposition in der Abluftfahne der hoch industrialisierten Region Mannheim/Ludwigshafen mit ihren emmitierten Luftschadstoffen (Karrasch 1988) tragen zur Versauerung des Mühlbaches bei.
Eine starke Schädigung der Biozönose konnte am Unterlauf des Mühlbaches festgestellt werden. Während die Säurebelastung durch das Durchlaufen von Lößauflagen mit ihrer erhöhten Pufferkapazität zurückging (Säurestufe 2), konnte mit Hilfe der Bioindices eine hohe Saprobie (Saprobienindex von 2,6, kritisch belastet) und damit einhergehend schlechte Sauerstoffindikation (Klasse 4) nachgewiesen werden. Für die schlechte Sauerstoffversorgung kann neben der Belastung mit leicht abbaubaren organischen Stoffen auch die starke Verbauung und das daraus resultierende Fehlen von turbulenten Strömungen verantwortlich gemacht werden. Die Abnahme des RETI auf etwa 0,5 zeigte durch die deutliche Zunahme der Filtrierer und Sedimentfresser eine Potamalisierung des Gewässers an (Schweder 1992). Auch mit Hilfe des Ökotoxikologische Index konnte eine deutliche Degradation des Unterlaufes nachgewiesen werden. Das Durchlaufen des Bachs durch den Heidelberger Stadtteil Handschuhsheim, das Passieren einer Schrebergartenanlage mit teilweiser Kleintierhaltung, die strukturelle Armut des Fließgewässers, die unmittelbare Nähe landwirtschaftlich intensiv genutzter Flächen aber auch die dokumentierten Altlasten (4.5.6) dürften für die *In situ*-Störungen im Unterlauf des Mühlbaches verantwortlich sein.

Bewertung der eingesetzten Kombination von Bioindices

Die Befunde zeigen, dass bei den untersuchten Fließgewässerstandorten komplexe Belastungssituationen *in situ* vorlagen, die keinesfalls über die Verwendung eines einzelnen Bioindices analysiert werden können. Die alleinige Verwendung von Saprobie-basierten Bewertungsverfahren erlaubt keine umfassende Beschreibung des Zustandes *in situ* (Braukmann & Pinter 1997a) und kann zu falschnegativen Befunden führen (Böhmer et al. 1999). Die Befunde zeigen, dass mit Hilfe der kombinierten Verwendung mehrer Bioindices weiterführende Informationen zur Art der Schädigung der Biozönose erhalten werden können. Während einige, relativ unspezifische Bioindices verschiedene Arten der Belastung abbilden (Diversität, RETI, Ökotoxikologischer Index), spiegeln spezifischere Bioindices (etwa Saprobienindex, Säure- und Sauerstoffstufen) Unterschiede in den Reaktionen der Biozönose auf verschiedene Belastungsarten wider (Böhmer et al. 1999). Basierend auf dem Grundgedanken der EU-Wasserrahmenrichtlinie, dass jegliche biozönotische Abweichung eines Gewässers von der Referenz als Defizit in der ökologischen Qualität gewertet werden muss (Brockett 2000, Irmer 2000), erscheint die kombinierte Anwendung verschiedener Bioindices als sinnvoll (Böhmer et al. 1997, Chovanec et al. 1997, Friedrich 1998, Friedrich & Lacombe 1992, Reynoldson et al. 1995, Schmedtje 1998, Schweder 1992).

4.7 Ergebnisse und Diskussion: Befunde der Bioassays

Zusammenfassung. *Das Belastungspotenzial von Sedimenten und Oberflächenwasserproben von 12 Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars wurde mit Hilfe einer In vitro-Biotestbatterie untersucht: akute Toxizität mit den Bakterien Arthrobacter globiformis, Bacillus cereus und Vibrio fischeri, Algenhemmtest mit Pseudokirchneriella subkapitata, akuten Cytotoxizitätstest mit der permanenten Zelllinie RTG-2, Fischeitest mit Danio rerio, Teratogenität (verlängerter Fischeitest mit Danio rerio), Genotoxizität (Comet-Assay mit der Zelllinie RTG-2), Mutagenität (Ames-Test), endokrine Wirksamkeit (Dot-Blot-Assay mit Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle und dioxin-ähnliche Wirksamkeit in Organkultur embryonaler Hühnerlebern. Über den Einsatz verschiedener Expositionspfade (natives Sediment, organische Extrakte, Porenwässer und wässrige Eluate) sowie einfachen Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken (Alumina-Säulenchromatographie und Flüssig/Flüssig-Extraktionen) wurde, eine Identifizierung des Schädigungspotenzials versucht. Sowohl bei der dioxin-ähnlichen als auch bei der endokrinen Belastung wurde über Toxicity equivalency-Faktoren der Anteil der chemisch analysierten Substanzen an den biologischen berechnet.*

Mit Arthrobacter globiformis konnte eine starke bakterientoxische Wirkung nicht nur für die acetonischen Sedimentextrakte, sondern auch für 5 der 12 nativen Sedimentproben nachgewiesen werden. Bei einer Flachwasserzone am Neckar erwies sich insbesondere der Fischeitest mit den Expositionspfaden natives Sediment, Porenwasser und organischer Extrakt als geeignet, das ökotoxikologische Schädigungspotenzial zu charakterisieren und Hinweise zur Bioverfügbarkeit der partikulär gebundenen Schadstoffe für Fische zu geben. Die Porenwässer der Triade schädigten Danio rerio mit Mortalitäten von 0 bis 50 %, wobei die höchste Sedimenttoxizität von dem temporär trockenfallenden Abschnitt der Neckarflachwasserzone bei Eberbach ausging. Ebenso wie bei den Untersuchungen im Bakterienkontakttest konnte auch für den Fischeitest gezeigt werden, dass die tatsächlich bioverfügbare Toxizität (native Sedimente) besser mit einer Untersuchung von acetonischen Extrakten als mit Porenwässern abgeschätzt werden kann. Lipophilere Sedimentinhaltsstoffe besitzen in diesen beiden Testverfahren eine höhere Bioverfügbarkeit als angenommen. Der akute Zelltest mit RTG-2-Zellen ergab mit NR_{50}-Werten von 30 mg/ml bis zu 400 mg/ml große Unterschiede in der Toxizität acetonischer Extrakte mit sehr guter Korrelation (r=0,81) zwischen dem Zelltest und dem Fischeitest mit Danio rerio. Im Comet-Assay konnte mit Induktionsfaktoren bis zu 4,2 eine gentoxische Wirkung für einige wässrige Eluate, Wasserextrakte und Porenwässer der Triade nachgewiesen werden. Auch in diesem Testsystem ließ sich eine signifikante Zunahme der Genotoxizität für Eluate eines temporär trockenfallenden Teiles der Flachwasserzone gegenüber einem Referenzstandort zeigen. Im Ames-Test wirkten zahlreiche Proben mutagen, wobei bei einzelnen acetonischen Extrakten die mutagene Wirkung durch eine bakterientoxische Aktivität maskiert wurde. Eine Flüssig/flüssig-Fraktionierung nach pH-Wert konnte die Hypothese der Maskierung verifizieren und in Neutralfraktionen der Sedimente des Forellenbaches eine extrem hohe Mutagenität nach der Kläranlageneinleitung (Induktionsfaktor von 6,5) und eine weitgehende Regeneration im weiteren Verlaufe des Fließgewässers nachweisen. Die Untersuchung der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit konnte eine hohe bis sehr hohe Belastung der Fließgewässersedimente aufzeigen. Eine Untersuchung von Oberflächenwasserproben zeigte eine starke endokrine Belastung mit 17ß-Estradioläquivalentkonzentrationen von bis zu 27 ng/L für das native Wasser (nach einer Kläranlageneinleitung), bis zu 13,7 ng/L bzw. 115 ng/L für Oberflächen- bzw. Porenwasser des Neckars. Die nachgewiesenen Konzentrationen können bereits populationsrelevante Veränderungen bei Fischen bewirken.

Publikationen, die bisher aus dieser Teilstudie entstanden sind:

Hollert, H., Dürr, M., Olsman, H., Halldin, K., van Bavel, B.., Brack, W., Tysklind, M., Engwall, M. & Braunbeck, T., 2001: Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the Neckar River. Ecotoxicology: submitted.

Hollert, H., Karaus, U., Dürr, M., Brack, W., Winn, N., Siebert, I., Wetterauer, B., Rudolf, M., Heise, S., Engwall, M., Erdinger, L., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 2000. Integrierte Sedimentuntersuchungen und Bioassay-dirigierte Fraktionierungen - Zwei Konzepte zur Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg (Ö 97 004). In: F. Horsch, W.G. Filby, S. Gross and H. Krug (Editors), Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe, online unter http://bwplus.fzk.de. BWPLUS-Berichte, pp. 1-20.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Pawlowski, S., Islinger, M., Gratzer, H., Ahlf, W., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. Berichte Umweltforschung des Forschungszentrums Karlsruhe: online unter www.fzk.de..

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Pawlowski, S., Gratzer, H., Holtey-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Brack, W., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Integrated assessment of sediments and surface waters in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of in vitro toxicity, chemistry and macrozoobenthos. In: SETAC (Hrsg.), 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Oral presentation, Philadelphia, USA.

4.7.1 Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*

Mit Hilfe des Bakterienkontakttests mit *Arthrobacter globiformis* wurde im Rahmen der Sedimentbewertungstriade die Toxizität von Sediment und Wasser über die folgenden Expositionspfade untersucht:

- Natives Sediment,
- Acetonische Sedimentextrakte,
- Porenwasser und
- XAD-Harz-Extrakte von Oberflächenwasser.

Natives Sediment. Die Bakterientoxizität der nativen Sedimente wurde mit dem Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* und *Bacillus cereus* nach Liß & Ahlf (1997) durchgeführt. Während bei vielen anderen *In vitro*-Biotests die partikelgebundenen Schadstoffe erst nach Extraktion untersucht werden können, ermöglicht der Kontakttest eine Bewertung von nativen und damit chemisch kaum veränderten Sedimenten (Gratzer & Ahlf 1999a, Liß & Ahlf 1997, Rönnpagel et al. 1998, Rönnpagel et al. 1999). Abb. 4.21 zeigt die Toxizität von nativen Sedimenten gegenüber *Arthrobacter*-Bakterien, die photometrisch über die Dehydrogenase-Aktivität der Keime ermittelt und in Prozent angegeben wurde. Fünf der zwölf untersuchten nativen Sedimente schädigten die Bakterien signifikant: Die Elsenzsedimente induzierten vor (El1) und hinter der Kläranlage (El2) Hemmungen von über 85 %, aber auch die Referenzprobe Hilsbach (Hil) schädigte die Bakterien bereits zu 81 %. Für den Mühlbach konnte eine Zunahme der Bakterienhemmung von 14 % im Oberlauf (Mb1) auf 87 % im anthropogen überformten Unterlauf (Mb2) nachgewiesen werden. Die Sedimente des Forellenbaches induzierten im Bereich der Kläranlageneinleitung (Fb1, Fb1b) eine Aktivität der mikrobiellen Dehydrogenasen. Diese könnte durch eine Verbesserung der Wachstumsbedingungen für den Testorganismus *Arthrobacter globiformis* (aufgrund der höheren Eutrophie des Sedimentes) bewirkt worden sein. Es ist beispielsweise bekannt, dass *Arthrobacter globiformis* in Kläranlagen vorkommt. Andererseits ist für einige Schadstoffe, wie etwa bestimmte Phenolderivate, eine Schädigung der Membran als Wirkungsmechanismus beschrieben, aus der eine verstärkte Freisetzung von Dehydrogenasen resultieren kann (Herr PD Dr. Ahlf, persönliche Mitteilung). Um eine falsch-negative Bewertung der Sedimente zu vermeiden, wurde die Aktivierung in späteren Berechnungen ebenfalls als toxischer Effekt bewertet (Herr PD Dr. Ahlf, persönliche Mitteilung). Am Forellenbach konnte die geringste Bakterientoxizität für den Referenzstandort Fb2 ermittelt werden. Für das Sediment nach dem Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3)

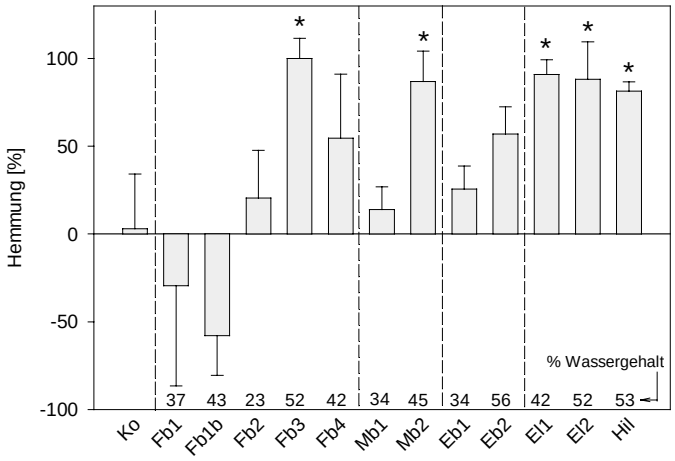


Abb. 4.21. Bakterientoxizität von nativen Sedimenten (3 g Feuchtgewicht) im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*, n ≥ 5, nachgewiesen über die Hemmung der mikrobiellen Dehydrogenasen. * Die markierten Proben hemmten die Bakterien signifikant gegenüber der Kontrolle (Post-hoc-Test nach Dunnett p<0,05). Ko: Kontrolle mit Quarzsand der Siebklasse W4. Die Wassergehalte der Sedimente sind im unteren Teil der Graphik angegeben.

konnte mit 100 % die höchste Hemmung der *Arthrobacter*-Bakterien ermittelt werden, wogegen am Regenerationsstandort Fb4 eine deutliche Abnahme auf 55 % detektiert werden konnte. Die hohe Toxizität des Sedimentes nicht am Standort nach der Kläranlageneinleitung, sondern nach dem Zusammenfluss (Fb3) kann durch eine Adsorption von wassergelösten Inhaltsstoffen an Schwebstoff und eine Sedimentation in relativ strömungsberuhigten Bereichen des Standortes Fb3 erklärt werden und korreliert mit den Befunden aus dem akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen (Abschnitt 4.7.4 und Hollert et al. 1999e).

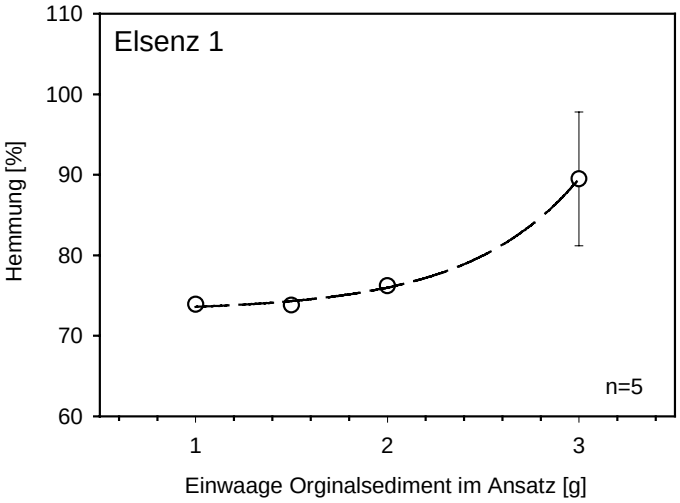


Abb. 4.22. Dosis-Wirkungskurve für die Bakterientoxizität des nativen Sedimentes Elsenz 1 im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*. Als Kontrolle und für die Verdünnungen wurde Quarzsand der Siebklasse W4 eingesetzt. Datengrundlage: Winn (1999).

Eine tendenzielle, obgleich statistisch nicht signifikante Zunahme der Bakterientoxizität konnte auch für den hinteren Teil der Flachwasserzone bei Eberbach (Eb2) ermittelt werden. Ein wichtiger Parameter bei der Bewertung der Befunde des Bakterienkontakttests ist der Wassergehalt der nativen Sedimente (Zimmer & Ahlf 1994). Haben zwei Sedimente unterschiedliche Wasseranteile, so kann dies bei dem Sediment mit dem höheren Wassergehalt wie eine relative Schadstoffverdünnung wirken. Daher kann für das Sediment des hinteren Abschnittes der Flachwasserzone mit seinem höheren Wassergehalt (Abb. 4.21) eine relative Unterbewertung der Toxizität im Vergleich zur wasserärmeren Referenz angenommen werden. Abb. 4.22 zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die native Sedimentprobe von El1. Es wird deutlich, dass auch eine Verdünnung der Sedimentprobe mit Quarzsand der Siebklasse W4 nur eine langsame Abnahme der Toxizität bewirkte.

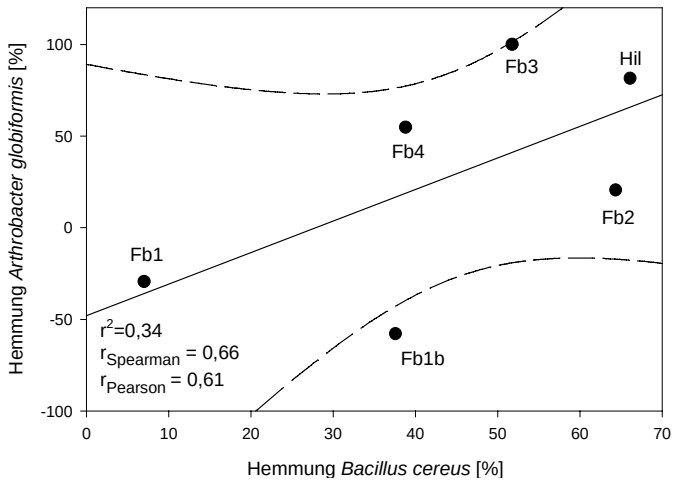


Abb. 4.23. Regression der Bakterientoxizität von 6 nativen Sedimenten (unverdünnte Orginalprobe) im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* und *Bacillus cereus*. Die 5- und 95% Konfidenzintervalle sind als unterbrochene Linien dargestellt. Datengrundlage: Winn (1999) und unveröffentlichte Daten der AG Ökotoxikologie der TU Hamburg-Harburg.

Eine Untersuchung von sechs nativen Sedimentproben im Bakterienkontakttest mit *Bacillus cereus*, die Herr Gratzer (TU Hamburg-Harburg) freundlicherweise durchgeführt und zur Verfügung gestellt hat, ergab nur mäßige Übereinstimmungen mit den Befunden mit *Arthrobacter globiformis* (Abb. 4.23). Während die Befunde bei den Sedimenten Fb3, Fb4 und Hil gut übereinstimmen, ergaben sich starke Abweichungen für das Toxizitätspotenzial der Standorte Fb1, Fb1b und Fb2.

Acetonische Extrakte. Die Bakterientoxizitäten von acetonischen Extrakten, die im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis* auch für wässrige Proben getestet wurden, sind in Abb. 4.24 dargestellt. Tabelle 4.9 zeigt die mittels der Regressionsfunktionen berechneten EC_{50}-Werte. Am Forellenbach konnte insbesondere für die Sedimentextrakte der Standorte Fb3 und Fb1b mit EC_{50}-Werten von 80 und 90 mg Sedimenttrockengewicht/ml Testansatz eine hohe bakterientoxische Wirkung ermittelt werden. Das Extrakt Fb1 bewirkte – analog zum nativen Sediment – eine Stimulation in einer eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Während die beiden Standorte nach der Kläranlageneinleitung (Fb1, Fb1b) bei der Untersuchung der nativen Sedimente jeweils negative Hemmungen induzierten, konnte somit für die acetonischen Extrakte eine unterschiedliche Wirkung nachgewiesen werden. Dieser Befund verdeutlicht, dass negative Hemmungen beim Expositionspfad natives Sediment mit drastischen bakterientoxischen Effekten beim Expositionspfad acetonischer Extrakt einhergehen können, und daher im Risk-Assessment als problematisch bewertet werden sollten. Die niedrigste Bakterientoxizität konnte am Forellenbach für die Referenz Fb2 (EC_{20} von 400 mg/ml) ermittelt werden.

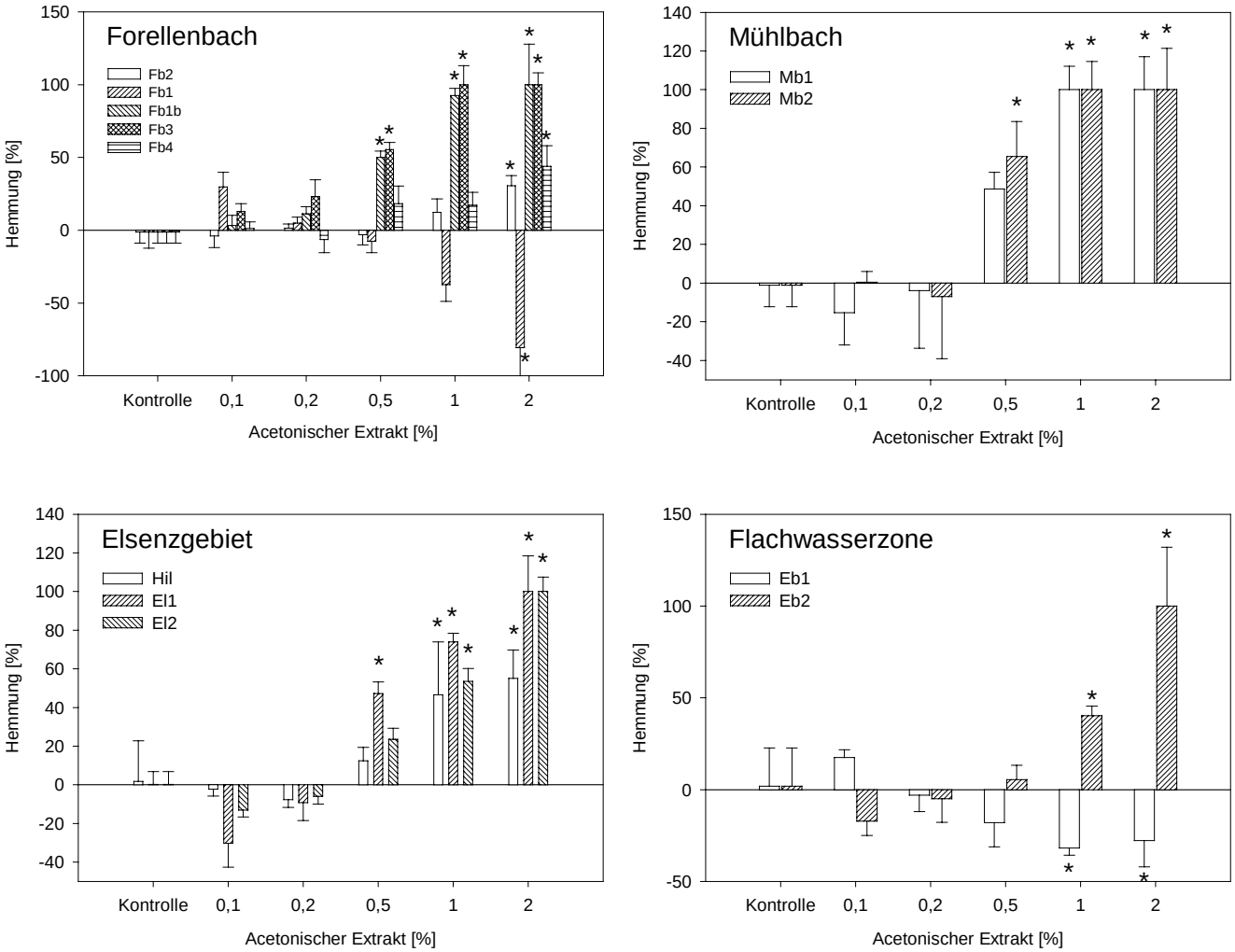


Abb. 4.24. Bakterientoxizität von acetonischen Extrakten der Sedimenttriade im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis*. Die Extrakte wurden mit jeweils 8 Replika in wässriger Lösung getestet und die Konzentration in der Einheit % Orginalextrakt im Testansatz angegeben. Die jeweiligen Referenzstandorte sind in weiß dargestellt. Die mit * markierten Proben unterschieden sich in einem *Post-hoc*-Test nach Dunnett mit $p < 0,05$ von den Kontrollen. Datengrundlage: Winn (1999).

Die geringe Toxizität des Sedimentextraktes Fb4 (EC_{20} von 340 mg/ml) zeigt die weitgehende Regeneration des Forellenbaches im Unterlauf an. Abb. 4.24 zeigt weiterhin, dass von allen Sedimentextrakten aus dem Einzugsgebiet der Elsenz eine starke bakterientoxische Wirkung ausging. Während die Extrakte aus der Elsenz jeweils Hemmungen von 100 % induzierten, wurden die Bakterien durch die höchste Extraktkonzentration der Referenz Hil nur zu 55 % gehemmt. Bei allen Proben aus dem Elsenzgebiet fällt auf, dass jeweils die beiden Konzentrationen vor Einsetzten einer akuten Toxizität eine Zunahme der Aktivität der mikrobiellen Dehydrogenasen bewirkt haben. Eine solche Aktivierung des Stoffwechsels konnte auch mehrfach bei dem akuten Zelltest mit der Zelllinie RTG-2 beobachtet werden und kann als eine subletale Hormese der Zellen aufgefasst werden (Hollert et al. 2000a).
Große Unterschiede in der Bakterientoxizität konnten für die Extrakte der Flachwasserzone bei Eberbach ermittelt werden. Während für den hinteren Abschnitt der Flachwasserzone (Eb2) eine Hemmung bis zu 100 % und ein EC_{50} von 330 mg/ml ermittelt werden konnte, förderte das Extrakt der Referenz (Eb1) die mikrobiellen Dehydrogenasen der Bakterien in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Porenwasser. Das Porenwasser der Sedimentproben wurde in drei Verdünnungsstufen mit dem Bakterienkontakttest in wässriger Lösung getestet. Die Porenwasserkonzentrationen im Testansatz betrugen 12,5, 25 und 50 %. Insgesamt konnte für die Porenwässer ein weitaus geringeres Schädigungspotenzial als für die nativen Sedimente und acetonischen Extrakte ermittelt werden. Die höchste Hemmwirkung (30,7 %) konnte bei der Probe Fb1 im Ansatz mit 25 % Porenwasser festgestellt werden. Tab. 4.10 gibt einen Überblick über die maximalen Hemmungen, die von den einzelnen Porenwässern induziert wurden. Das Porenwasser des Referenzstandortes (Eb1) am Übergang der Flachwasserzone zum Neckar hemmte die *Arthrobacter*-Bakterien in einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung mit der maximalen Hemmwirkung von 24 % (Abb. 4.25). Im Gegensatz dazu konnten für die Proben aus dem hinteren, temporär trockenfallenden Bereich der Flachwasserzone (Eb2) bei allen untersuchten Konzentrationen signifikante Hemmungen nachgewiesen werden. Eindeutige Korrelationen der Befunde aus den Porenwasseruntersuchungen mit den Ergebnissen der Bakterientoxizitätstests mit nativem Sediment und acetonischen Sedimentextrakten und zu den Resultaten der chemischen Analytik waren nicht zu beobachten. In Anbetracht der hohen Toxizität der nativen Sedimente wäre eine höhere Toxizität der Porenwässer zu erwarten gewesen. Die Diskrepanz in der Toxizität könnte aus der Lagerung des Porenwassers bei -30 °C resultieren, bei der ein Ausfallen von Schwermetallen denkbar wäre. Andererseits haben Untersuchungen mit der Expositionsphase wässrige Eluate (Ergebnisse nicht dargestellt) bei einer umgehenden Überprüfung im Dehydrogenase-Assay ähnlich geringe Toxizitäten ergeben, so dass die Probenlagerung als Fehlerquelle weitgehend ausgeschlossen werden kann. Vielmehr zeigt das Verhältnis der Bakterientoxizität bei den Expositionspfaden natives Sediment und Porenwasser an, dass von den lipo-

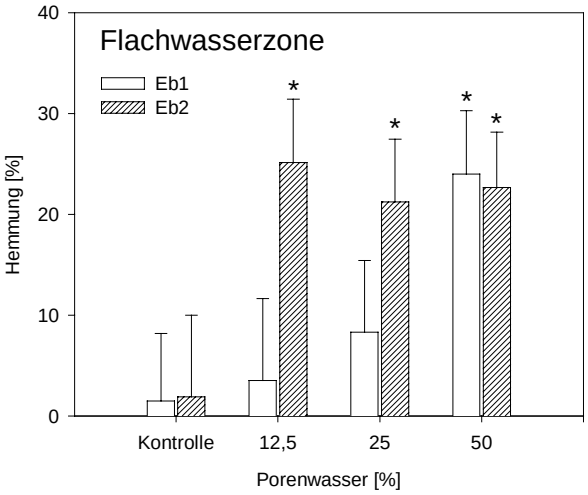


Abb. 4.25. Bakterientoxizität der Porenwässer der Neckar-Flachwasserzone bei Eberbach im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis*. Die Mediane der Hemmungen ± Standardabweichungen aus 8 Messungen sind dargestellt. Datengrundlage: Winn (1999).

phileren, partikulär gebundenen Sedimentinhaltsstoffen der größte Beitrag zum tatsächlich bioverfügbaren Schädigungspotenzial (ermittelt durch native Sedimente) ausgeht. Diese Hypothese konnte auch für den zweiten eingesetzten Festphasen-Biotest, den Fischeitest mit *Danio rerio*, bestätigt werden (Abschnitt 4.7.3).
Die Befunde zur Untersuchung der verschiedenen Expositionspfade im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* verdeutlichen, dass aus der Testung von Porenwässern und wässrigen Eluaten nur wenig Zusatzinformation erlangt werden kann, so dass sie nur bei spezieller Indikation (etwa Toxizitätsbewertungen bei anstehenden Sedimentverklappungen) untersucht werden sollten. Für eine Routineprüfung können die Expositionspfade acetonischer Extrakt (zur Abschätzung des potenziellen Schädigungspotenzials) und natives Sediment (zur Ermittlung des tatsächlich bioverfügbaren Schädigungspotenzials) empfohlen werden.

XAD-Extrakte. Die im Vergleich zum nativen Wasser um das 10.000-fache aufkonzentrierten XAD-Extrakte wurden in wässriger Lösung mit einem Aufkonzentrierungsfaktor von 100 und einer Endkonzentration von 1% DMSO im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis* getestet.
Abb. 4.26 zeigt, dass insbesondere von dem Oberflächenwasserextrakt nach der Kläranlageneinleitung (Fb1) eine bakterientoxische Wirkung ausging. Aber auch für die Referenzprobe des Forellenbaches (Fb2) konnte eine signifikante, obgleich geringere Bakterientoxizität ermittelt werden. Eine signifikante Zunahme der Dehydrogenase-Aktivität konnte für den XAD-Extrakt Mb2 des Mühlbaches nachgewiesen werden. Auch eine Blindprobe, die aus 20 L Trinkwasser des Hygiene-Institutes durch eine analoge Aufkonzentrierung hergestellt wurde, bewirkte eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der Dehydrogenase-Aktivität. Das nachgewiesene bakterientoxische Schädigungspotenzial der durch das Harz aufkonzentrierten, lipophilen und leicht polaren Wasserinhaltsstoffe der Oberflächenproben kann in Anbetracht der 100-fachen Aufkonzentrierung als gering bis mäßig bewertet werden. Eine Untersuchung von insgesamt 66 nativen Wasserproben aus Kläranlagenabläufen in der Schweiz ergab im Dehydrogenase-Assay Bakterienhemmungen bis zu 40 % in Wochenmischproben (Hollert et al. 2000e). Auch bei Berücksichtigung einer Verdünnung der Abwasserproben in den Vorflutern erwiesen sich die Schweizer Abwasserproben als um ein Vielfaches problematischer.

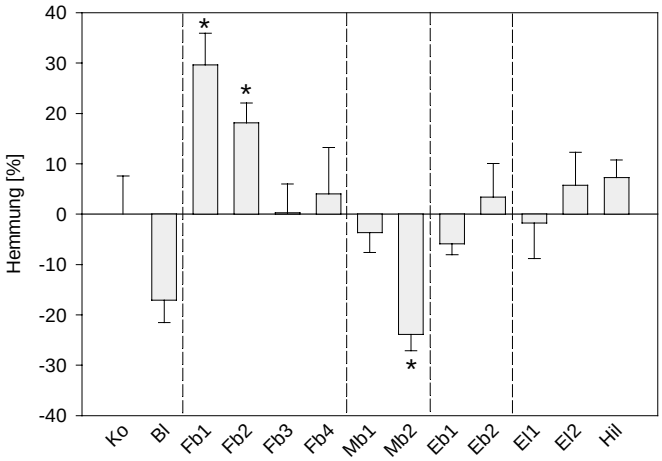


Abb. 4.26. Bakterientoxizität von XAD-Extrakten aller Standorte der Sedimentbewertungstriade im Dehydrogenase-Assay mit *Arthrobacter globiformis*. Die Oberflächenwasserproben wurden mit einer 100-fachen Aufkonzentrierung getestet. Bl: Blindprobe, Extrakt aus 20 L Leitungswasser des Hygiene-Institutes der Universität Heidelberg. Die Mediane der Hemmungen ± Standardabweichungen aus 8 Messungen sind dargestellt. Die mit * markierten Proben unterschieden sich in einem *Post-hoc*-Test nach Dunnett signifikant von den Kontrollen. Datengrundlage: Winn (1999).

Tab 4.10. Übersicht über die Befunde aus den *In vitro*-Biotests einer integrierten Sedimentbewertung im Einzugsgebiet des Neckars

				Forellenbach			**Mühlbach**			**Elsenz**		**Eberbach**	
	Einheit	Fb1	Fb1b	**Fb2**	Fb3	Fb4	**Mb1**	Mb2	**Hil**	El1	El2	**Eb1**	Eb2
Bioassays													
Arthrobacter globiformis													
Natives Sediment	% Mortalität	29[A] (17)	57[A] (50)	20,5 (7,6)	100 (100)	54,7 (47,4)	13,9 (0)	86,6 (84,4)	81,4 (78,4)	91 (89,5)	88,3 (86,4)	25,7 (13,7)	57 (50)
Extrakt	$1/EC_{50}$	0,007 (77,8)	0,007 (84)	0,002 (11,6)	0,006 (72,1)	0,002 (10,5)	0,006 (72,1)	0,008 (100)	0,002 (11,0)	0,006 (77,6)	0,005 (62,8)	0,0 (0)	0,003 (27,7)
Porenwasser	% Mortalität	31 (100)	30 (96,7)	19 (61,3)	3 (9,7)	19 (61,3)	11 (35,5)	0 (0)	25 (80,6)	23 (74,2)	19 (61,3)	23 (74,2)	23 (74,2)
XAD-Wasserextrakt	% Mortalität	29,6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Danio rerio													
Extrakt	$1/EC_{50}$	0,04 (63,7)	0,038 (62,0)	0,003 (7,26)	0,032 (70,6)	0,011 (1,8)	0,037 (57,1)	0,055 (100)	0,037 (56,8)	0,022 (31,4)	0,036 (55,3)	0,009 (9,8)	0,063 (100)
Porenwasser	% Mortalität	20 (40)	25 (50)	15 (29,9)	10 (20)	0 (0)	25 (50)	40 (80)	5 (10)	35 (70)	40 (80)	0 (0)	50 (100)
RTG-2-Zellen													
Extrakt, ohne S9	$1/EC_{50}$	0,008 (15,8)	0,022 (63,5)	0,004 (3,7)	0,033 (100)	0,01 (23,4)	0,015 (41,1)	0,02 (56,25)	0,025 (72,7)	0,011 (27)	0,011 (27)	0,003 (3,2)	0,029 (84,4)
Extrakt, mit S9	$1/EC_{50}$	0,005 (33,3)	0,009 (87,9)	0,003 (11,1)	0,01 (100)	0,01 (87,9)	0,003 (11,1)	0,01 (100)	0,01 (100)	0,009 (87,9)	0,009 (87,9)	0,003 (13,3)	0,01 (100)
Porenwasser, ohne S9	% Mortalität	26,5 (51)	5 (9,4)	0 (0)	51,7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11,1 (21,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Porenwasser, mit S9	% Mortalität	31 (93,6)	0,5 (1,2)	33 (99,7)	33,1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Eluat, ohne S9	% Mortalität	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	53 (100)	0 (0)	38 (71,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Eluat, mit S9	% Mortalität	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (17,4)	0 (0)	51,3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Comet-Assay													
Porenwasser, ohne S9	IF	2,1 (34,3)	1,7 (10,7)	3,2 (100)	1,7 (9,58)	2,8 (78,7)	1,9 (20,2)	1,5 (0)	1,8 (16,8)	2,1 (36,1)	1,7 (10,4)	2,5 (57,1)	2,0 (24,9)
Porenwasser, mit S9	IF	1,5 (11,8)	2,0 (69,7)	1,5 (20,4)	1,9 (62,9)	2,2 (96,6)	1,5 (17,4)	1,9 (58,0)	1,7 (40,8)	1,3 (0)	1,6 (30,04)	2,3 (100)	1,8 (50,85)
Eluat, ohne S9	IF	1,7 (28,0)	2,1 (50,0)	1,7 (29,1)	1,8 (34,3)	2,1 (48,5)	3,0 (92,1)	2,6 (71,0)	1,2 (2,9)	1,6 (21,5)	1,1 (0)	1,6 (23,6)	3,2 (100)
Eluat, mit S9	IF	2,4 (49,0)	0,86 (0)	2,0 (36,9)	3,3 (75,9)	2,2 (41,9)	4,1(100)	2,5 (52,1)	1,5 (19,4)	1,5 (18,4)	2,2 (41,9)	3,0 (65,9)	2,8 (59,9)
XAD, ohne S9	IF	2,0 (50)		0,8 (0)	2,1 (55,6)	3,2 (100)	2,2 (58,5)	2,5 (72,3)	2,4 (68,0)	1,4 (28,3)	3,1 (96,5)	1,6 (36,9)	3,1 (99,1)
XAD, mit S9	IF	1,4 (35,8)		1,4 (36,8)	1,1 (17,4)	1,5 (46,2)	1,5 (44,9)	1,8 (60,0)	2,0 (74,0)	2,4 (97,3)	2,5 (100)	1,7 (56,5)	0,8(0)
Ames-Test													
TA 98, Extrakt, mit S9	IF		1,5 (75)	1,6 (100)	1,6 (100)	1,3 (25)	1,4 (50)	1,4 (50)	1,2 (0)	1,4 (50)	1,2 (0)		1,5 (75)
TA 98, Extrakt, ohne S9	IF		1,3 (9,1)	2,3 (100)	1,4 (18,2)	1,2 (0)	1,4 (18,2)	1,3 (9,1)	1,4 (18,2)	1,3 (9,1)	1,2 (0)		1,4 (18,2)
TA 100, Extrakt, mit S9	IF	1,9 (100)	1,4 (37,5)	1,6 (62,5)	1,3 (25)	1,2 (12,5)	1,5 (50)	1,6 (62,5)	1,4 (25)	1,4 (25)	1,3 (37,5)	1,1 (0)	1,3 (25)
TA 100, Extrakt, o. S9	IF	1,5 (100)	1,3 (50)	1,5 (100)	1,3 (50)	1,2 (25)	1,4 (75)	1,5 (100)	1,3 (25)	1,3 (25)	1,1 (0)	1,1 (0)	1,2 (0,25)
TA 98, XAD, mit S9	IF	1,5 (57)		1,4 (42,8)	1,5 (57,1)	1,2 (14,3)	1,1 (0)	1,1(0)	1,2 (14,3)	1,2 (14,3)	1,4 (42,8)	1,8 (100)	1,3 (28,6)
YG1021, XAD, ohne S9	IF	1,9 (66,6)		1,4 (11,1)	1,6 (33,3)	1,5 (22,2)	2,2 (100)	1,7 (44,4)	1,3 (0)	1,3 (0)	1,4 (11,1)	1,8 (55,5)	1,4 (11,1)
EROD-Assay, Extrakt	$1/EC_{25}$	5 (100)	0,5 (9,7)	0,1 (1,7)	5 (100)	0,25 (4,7)		0,66 (13,1)	0,4 (7,7)	0,33 (6,4)	0,33 (6,4)	0,01 (0)	0,26 (5,4)
Vitellogenin-Induktion	pg Vtg	2073 (100)		7,5 (0)	187 (8,7)	149 (6,8)	97 (4,5)	78 (3,4)	130 (5,9)	176 (8,2)	973 (46,7)	639 (30,6)	347 (16,4)

Die Referenzstandorte der Triade sind fett gedruckt und grau unterlegt. In Klammern jeweils die in % der maximalen Belastung transformierten Daten, * nach der erweiterten Taxaliste der LAWA, IF = Induktionsfaktor, A = Aktivierung der Bakterien, die aus einer Membranschädigung resultieren könnte. Der Betrag der Aktivierung wurde wie eine Hemmung weiterberechnet.

4.7.2 Leuchtbakterientest

Für einen Abgleich der in dieser Studie entwickelten Biotestbatterie mit der von Zimmer & Ahlf (1994) vorgestellten und von Gratzer & Ahlf (1999a) im Rahmen eines UBA-Projektes validierten Biotestbatterie zur Ermittlung des Schädigungspotenzials von Sedimenten wurden ausgewählte Sedimentproben durch Herrn Gratzer (TU Hamburg-Harburg) freundlicherweise mit der Hamburger Biotestbatterie untersucht. Abb. 4.27 zeigt die Bakterientoxizität von methanolischen Sedimentextrakten der integrierten Sedimentbewertung im Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri*. Die Extrakte wurden als Kaltextrakte durch Rotation im Überkopfschüttler nach der Methode von Kwan & Dukta (1990) hergestellt. 5 g Sediment wurden mit 15 ml Methanol versetzt und für 1 h geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 11.000 rpm wurde der Überstand mit Aqua bidest. auf eine Endkonzentration von 1,5 % Methanol verdünnt. Aus dieser Stammlösung (G1) wurden weitere Verdünnungen nach der G-Systematik hergestellt und im Leuchtbakterientest nach der Methode von Gratzer & Ahlf (1999a) auf ihre Bakterientoxizität untersucht. Abb. 4.27 zeigt, dass alle untersuchten Extrakte die Bakterien in deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen schädigten. Für den Extrakt Hilsbach (Hil) konnte mit einer maximalen Hemmung von über 80 % die höchste Toxizität ermittelt werden. Am Forellenbach resultierte aus der Einleitung einer Kläranlage (Fb1 und Fb1b) eine signifikante Erhöhung der Sedimenttoxizität gegenüber der Kontrolle Fb2. Die höchste bakterientoxische Wirkung von Forellenbachsedimenten konnte am Standort nach dem Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3) mit strömungsberuhigten Bereichen detektiert werden. Am Standort Fb4 konnte eine deutliche Verbesserung der Sedimentqualität nachgewiesen werden. Abb. 4.28 zeigt die insgesamt gute Übereinstimmung der Extrakttoxizitäten bei der Verwendung von *Arthrobacter globiformis* und *Vibrio fischeri*. Auffällig ist die höhere relative Toxizität des Extraktes Hil im Leuchtbakterientest.

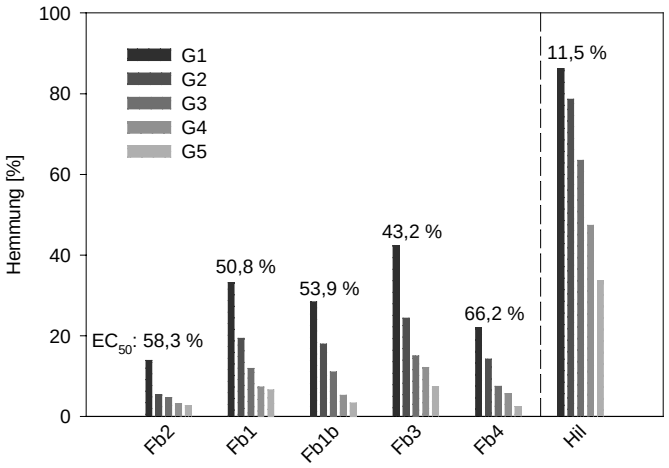


Abb. 4.27. Bakterientoxizität von methanolischen Sedimentextrakten im Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri*. Als höchste Testkonzentration (G1) wurde eine wässrige Lösung des Extraktes mit einer Konzentration von 5 mg Sediment / ml Testmedium eingesetzt. Die untersuchten Konzentrationen sind in der G-Nomenklatur angegeben. Der EC_{20} der jeweiligen Proben ist in der Einheit % der wässrigen Ausgangslösung angegeben.

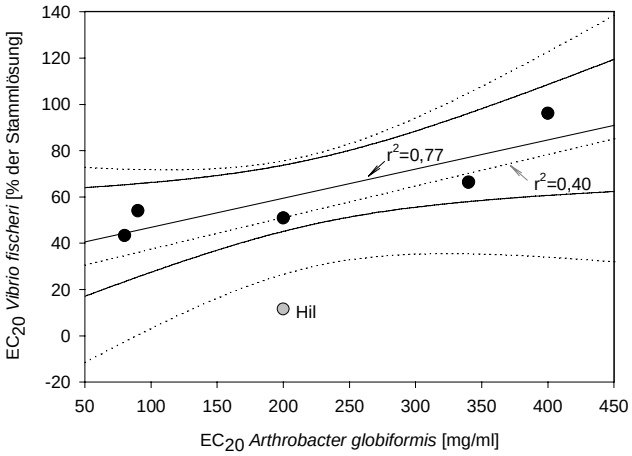


Abb. 4.28. Regressionsgerade und Konfidenzintervalle (5 und 95%) für die EC_{20}-Werte der Bakterientoxizitäten von organischen Extrakten bei *Arthrobacter globiformis* und *Vibrio fischeri*. Die Regressionsanalyse wurde mit (unterbrochene Darstellung) und ohne (durchgehende Linien) den Wert Hilsbach durchgeführt, um den Einfluss des Ausreißers auf den Verlauf der Regressionsgerade zu verdeutlichen.

4.7.3 Fischeitest mit *Danio rerio*

Im Rahmen dieser Studie wurde der Fischeitest mit *Danio rerio*, der sich während der Projektlaufzeit als Ergänzungs- bzw. Ersatzmethode für den Fischtest mit der Goldorfe (DIN 38 412) in der DIN-Validierungsphase befand und für den inzwischen eine DIN-Norm (DIN 38 415-Teil 6, 2001) publiziert wurde, an die Untersuchung verschiedener Expositionsphasen (Porenwasser, acetonische Extrakte und native Sedimente) partikulär gebundener Schadstoffe angepasst. Im Rahmen einer Staatsexamensarbeit (Rudolf 2000) wurde der Fischeitest mit *Danio rerio* an die Überprüfung von nativen Sedimenten adaptiert und an sechs Proben der Triade durchgeführt. Da die toxische Wirkung der Sedimente *a priori* durch ein komplexes Gemisch verschiedener Schadstoffe hervorgerufen wird, ließen sich bei den untersuchten Sedimenten keine spezifischen Schädigungen beobachten, sondern eine Mischung vieler möglicher Fehlentwicklungen, wie etwa unterentwickelte Ohr- und Augenanlagen, fehlende Somiten, Pigmentierungsstörungen, Ödeme, fehlender Blutkreislauf, Wirbelsäulenverkrümmungen, Gleichgewichtsstörungen und ungefüllte Schwimmblasen (Bildtafeln 4.1-4.3). Im Hinblick auf die Zielstellung der Entwicklung einer einfachen, praktikablen Bewertungsstrategie für Sedimente wurden als Parameter für die vergleichende Gegenüberstellung zunächst die Mortalitätsrate eingesetzt. Zudem soll aufgezeigt werden, inwiefern der zusätzliche Untersuchungsparameter Tagesschlupfverteilung weiterführende Informationen zum Schädigungspotenzial der Sedimente liefern kann.

Tab. 4.10 gibt eine Übersicht über die Embryotoxizität verschiedener Expositionsphasen der untersuchten Sedimentproben. Abb. 4.29 zeigt die Embryotoxizität der nativen, unverdünnten Porenwässer der Sedimentbewertungstriade im Fischeitest mit *Danio rerio* nach einer Expositionszeit von 48 h.
Im **Elsenzgebiet** konnte für die beiden Standorte an der Elsenz (El1, El2) eine einheitlich hohe Embryotoxizität nachgewiesen werden, wogegen der Referenzstandort Hilsbach (Hil) ein deutlich geringeres Schädigungspotenzial besaß. Insbesondere am Standort Eberbach ist die starke Toxizität des Porenwassers des hinteren Bereiches der **Flachwasserzone** (Eb2, 50 % Mortalität) im Vergleich zum Porenwasser am Übergang zum Neckar (Eb1, 0 % Mortalität) zu erkennen. Der Embryotoxizität des nativen Porenwassers im Fischeitest mit *Danio rerio* kommt eine hohe Relevanz für das Ökosystem Flachwasserzone zu: Nach Burton (1991) stellt das Porenwasser bei benthischen Organismen den Hauptaufnahmepfad für sedimentgebundene Schadstoffe dar; sowohl über die Körperoberfläche als auch über respiratorische Epithelien können die im Porenwasser gelösten Schadstoffe in den Organismus gelangen (Ahlf 1995). Ein Grund für die hohe Mortalität des Porenwassers könnte die Anreicherung leicht austauschbarer Metallbindungsformen im Zuge des beschriebenen periodischen Trockenfallens des Sedimentes sein.
Die Untersuchung von nativen Sediment- oder Schwebstoffproben besitzt *a priori* größte ökologische Relevanz, da sie unmittelbar die aktuelle Bioverfügbarkeit von Schadstoffen berücksichtigt.

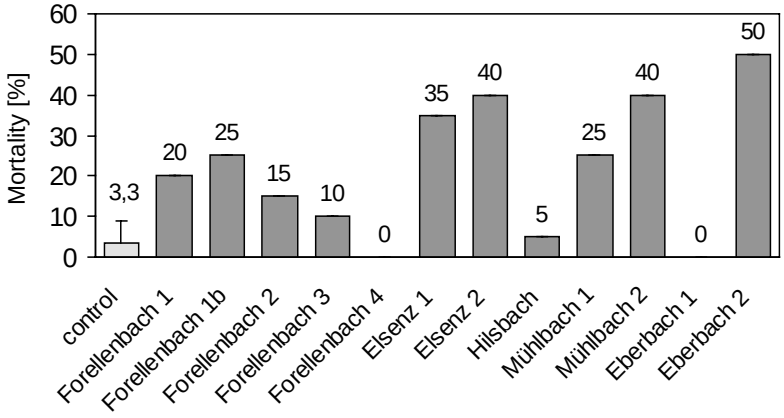
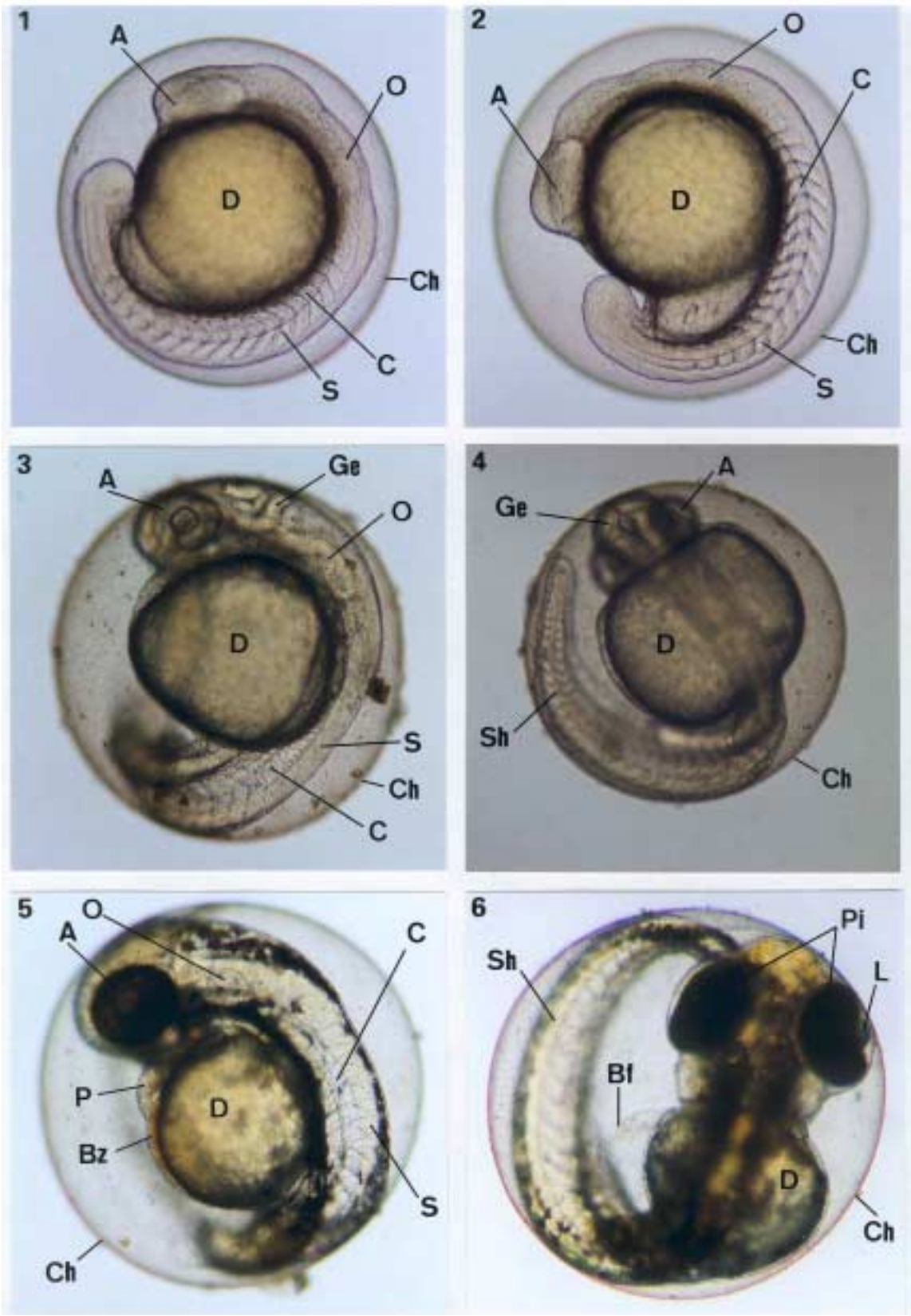
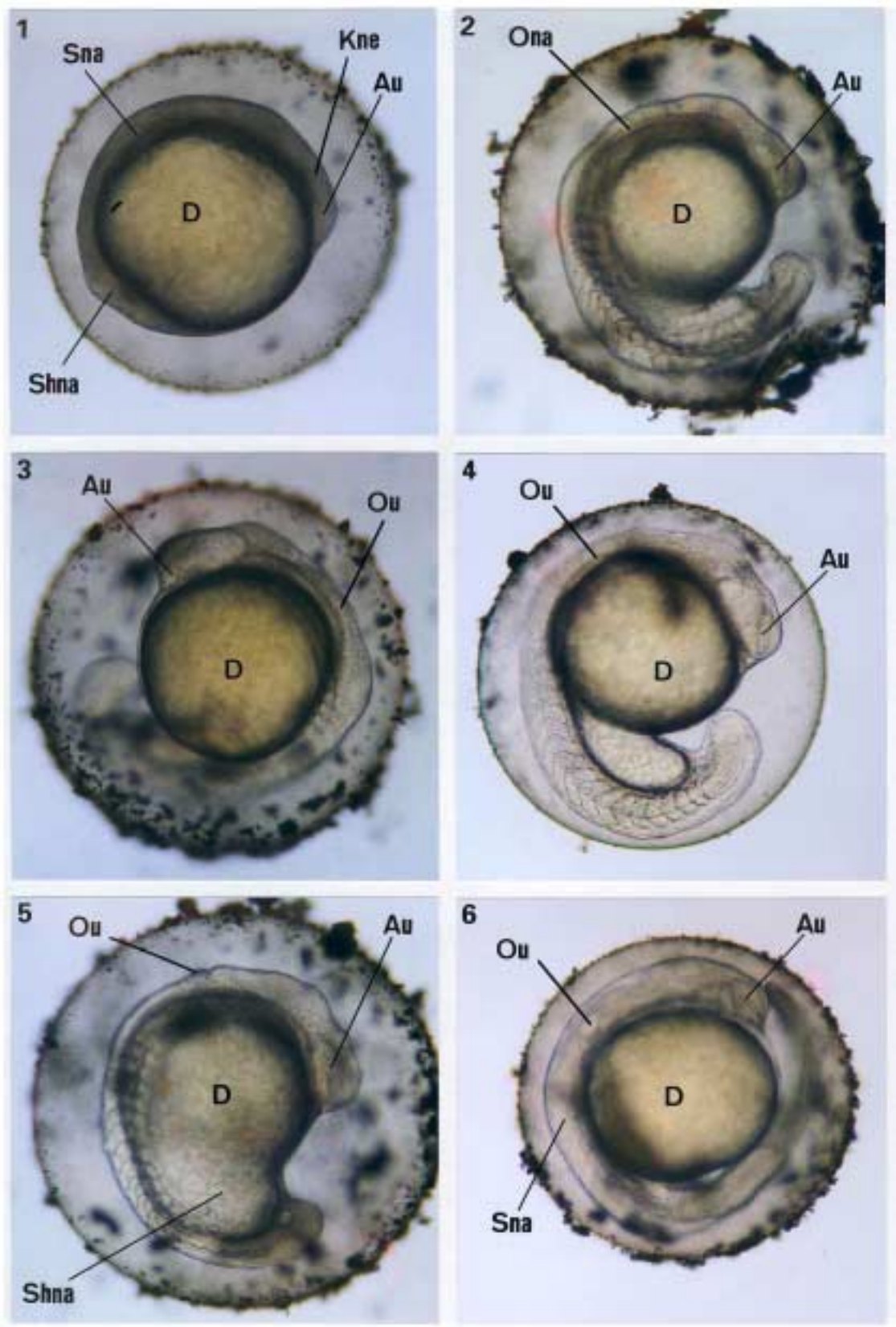


Abb. 4.29. Embryotoxische Wirkung von unverdünnten nativen Porenwässern im Fischeitest mit *Danio rerio* mit jeweils 20 Fischeiern nach 48 h Exposition. Die Mortalität wurde nach den in Abschnitt 2.8.7 genannten Kriterien ermittelt. Mortalität der Kontrolle als Mittelwert ± Standardabweichung aus drei Ansätzen.



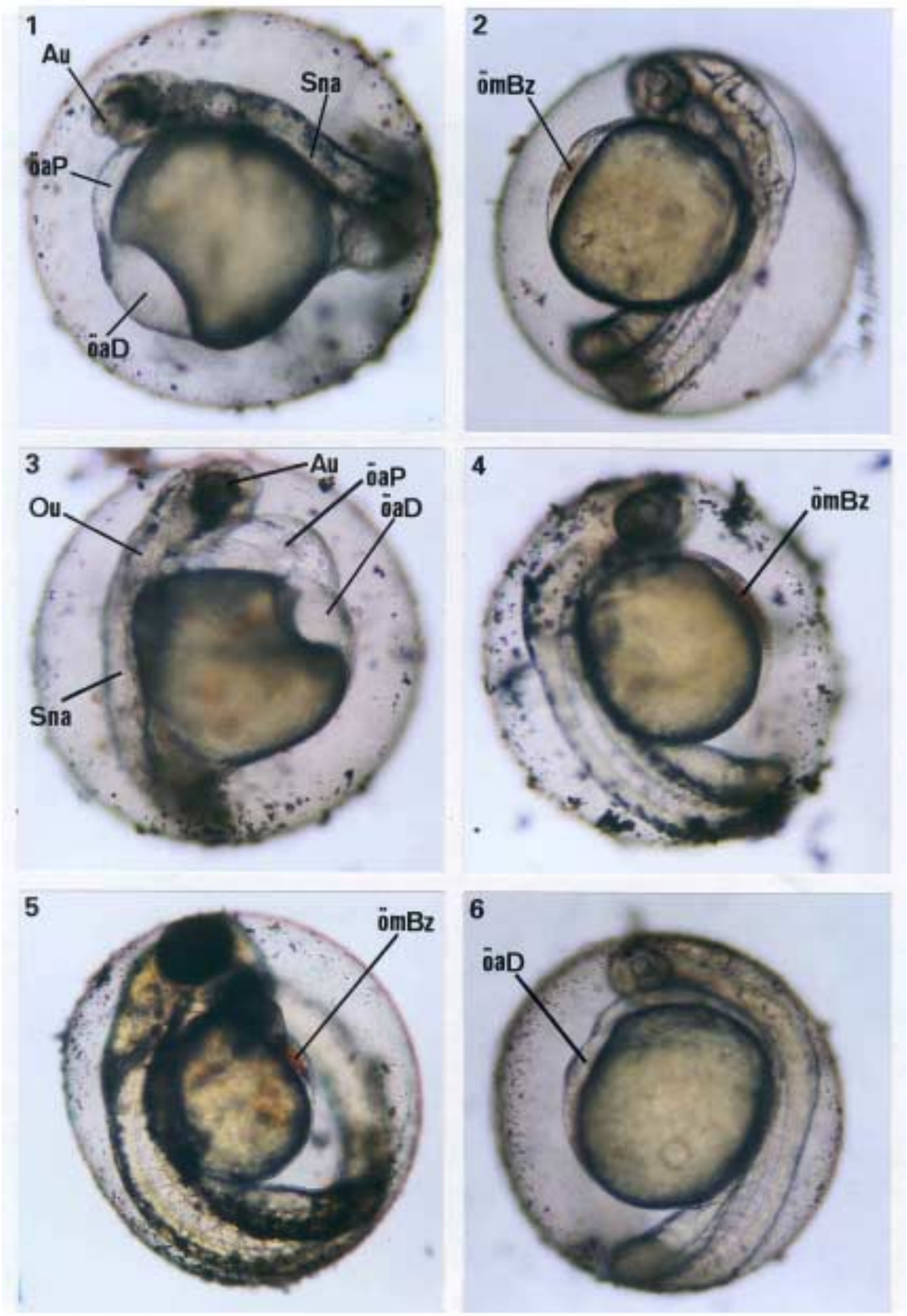
Bildtafel 4.1. Embryonalentwicklung des Zebrabärblings (*Danio rerio*) nach Inkubation mit Kunstwasser. Abbildungen aus Rudolf (2000). A= Augenanlage, Bf= Brustflosse , Bz= Blutzellen, C= Chorda, Ch= Chorion, D= Dottersack, Ge= Gehirn, L= Linse, Kne= Kopf nicht entwickelt, O= Ohranlage, P= Perikard, Pi= Pigmentschicht des Auges, S= Somiten bzw. Muskelsegmente.

Bild 1 Embryo im Alter von 16 h
Bild 2 Embryo im Alter von 18 h
Bild 3 Embryo im Alter von 25 h
Bild 4 Embryo im Alter von 25 h
Bild 5 Embryo im Alter von 48 h
Bild 6 Embryo im Alter von 72 h



Bildtafel 4.2. Fehlentwicklungen in der Embryonalentwicklung von *Danio rerio* nach Inkubation mit nativen Sedimenten der Sedimentbewertungstriade. Abbildungen aus Rudolf (2000). Au= Augenanlage unterentwickelt, D= Dottersack, Kne= Kopf nicht entwickelt, Ona= Ohranlage nicht angelegt, Ou= Ohranlage unterentwickelt, Shna = Schwanz nicht vollständig abgelöst, Sna = Somiten nicht ausgebildet.

Bild 1 Fb3, Embryo, 48 h, 231 mg/ml
Bild 2 Fb1b, Embryo, 48 h, 231 mg/ml
Bild 3 Fb1b, Embryo, 48 h, 143 mg/ml
Bild 4 Fb4, Embryo, 48 h, 600 mg/ml
Bild 5 Eb1, Embryo, 72 h, 600 mg/ml
Bild 6 Fb3, Embryo, 72 h, 231 mg/ml



Bildtafel 4.1. Fehlentwicklungen in der Embryonalentwicklung von *Danio rerio* nach Inkubation mit nativen Sedimenten der Sedimentbewertungstriade. Abbildungen aus Rudolf (2000). Au= Augenanlage unterentwickelt, Ou= Ohranlage unterentwickelt, öaD= Ödem am Dottersack, öaP = Ödem am Perikard, ÖmBz = Ödem mit Blutzellen gefüllt, Sna = Somiten nicht ausgebildet.

Bild 1 Fb3, Embryo, 48 h, 231 mg/ml
Bild 2 Fb1b, Embryo, 48 h, 231 mg/ml
Bild 3 Fb1b, Embryo, 48 h, 143 mg/ml
Bild 4 Fb4, Embryo, 48 h, 600 mg/ml
Bild 5 Eb1, Embryo, 72 h, 600 mg/ml
Bild 6 Fb3, Embryo, 72 h, 231 mg/ml

In der jüngsten Zeit konnten verschiedene Sedimentkontakttests vorgestellt werden, die überwiegend Organismen der niederen trophischen Ebenen einsetzen (Gratzer & Ahlf 1999a). Insbesondere bei den wirbeltiernahen Zellkultursystemen müssen die partikulär gebundenen Schadstoffe in eine wässrige Phase überführt werden; der Fischeitest mit *Danio rerio* kann jedoch auch mit nativen Sedimenten durchgeführt werden (Ensenbach 1999). Um auch eine mittelfristige Bioakkumulation von partikulär gebundenen Schadstoffen zu erfassen, wurden die Fischeier und Embryonen nicht nur über 48 h (Ensenbach 1999), sondern über 144 h auf Letalität und Störungen der Embryonalentwicklung untersucht.

Abb. 4.30 zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Mortalität des nativen Sedimentes Eberbach 2 im verlängerten Fischeitest mit *Danio rerio*. Es ist zu erkennen, dass vom untersuchten Sediment der Flachwasserzone eine starke toxische Wirkung auf die Fischeier und Embryonen ausging. Dieses Biotestergebnis zeigte weiterhin, dass das toxische Potenzial dieses Sedimentes in einer für Fischeier und Fischembryonen bioverfügbaren Form vorlag. Bereits 142 mg natives Sediment pro ml Kunstwasser bewirkten eine Mortalität von 12 % (24 h) bzw. 40 % (144 h). Eine verlängerte Expositionsdauer steigerte die Empfindlichkeit des Fischeitests deutlich (Abb. 4.30)

Für das Sediment des hinteren, temporär trockenfallenden Bereiches der Flachwasserzone konnte somit ein hohes ökotoxikologisches Schädigungspotenzial festgestellt werden (Abb. 4.29 bis 4.31).

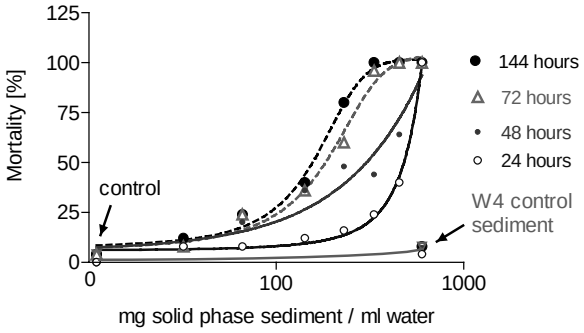


Abb. 4.30. Toxische Wirkung des nativen Sedimentes der Flachwasserzone (Eberbach 2) im Fischeitest mit *Danio rerio* mit jeweils 25 Fischeiern in Abhängigkeit von Sedimenteinwaage und Expositionsdauer. Datengrundlage: Rudolf (2000).

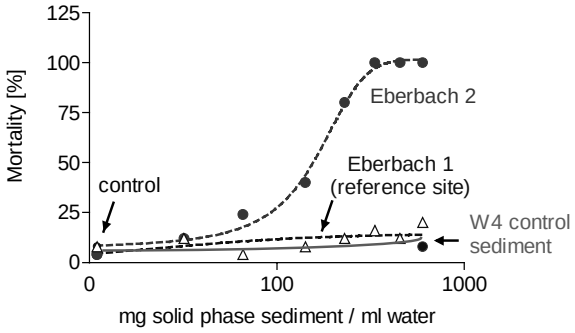


Abb. 4.31. Embryotoxische Wirkung der nativen Sedimente der Flachwasserzone im Fischeitest nach einer verlängerten Expositionszeit von 144 h. Als Kontrollsediment wurde 3 g Quarzmehl der Siebklasse W4 benutzt. Datengrundlage: Rudolf (2000).

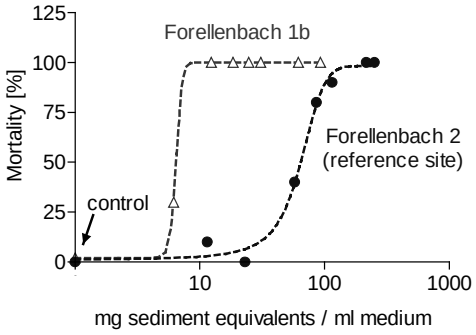


Abb. 4.32. Vergleich der Toxizität acetonischer Sedimentextrakte des Forellenbaches bei Heidelberg nach einer Kläranlageneinleitung (Forellenbach 1b) mit dem Referenzstandort (Forellenbach 2) im Fischeitest mit *Danio rerio* nach 50-stündiger Exposition von 20 Fischeiern. Control: Kunstwasserkontrollen, aus Hollert et al. (2000).

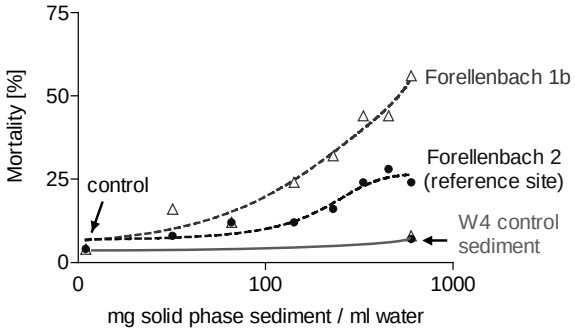


Abb. 4.33. Vergleich der toxischen Wirkung der nativen Sedimente des Forellenbaches im Fischeitest mit *Danio rerio* mit jeweils 25 Fischeiern nach 144 h Expositionsdauer. Die beiden untersuchten Sedimente glichen sich hinsichtlich der Korngrößenverteilung. Als Kontrollsediment wurde 375 mg Quarzmehl der Siebklasse W4 pro ml Kunstwasser benutzt. Control: Kunstwasserkontrollen.

Das Porenwasser von **Forellenbach** 1 und 1b wirkte mit einer Mortalität von 20 bzw. 25 % eindeutig toxisch (Abb. 4.29 und 4.34). Die Mortalität, die durch das Porenwasser des Referenzstandortes Forellenbach 2 hervorgerufen wurde, ist allerdings mit 15 % nur geringfügig niedriger. Die geringe Embryotoxizität des Porenwassers Forellenbach 3 überraschte in Anbetracht der hohen nachgewiesenen Schwermetallbelastung (Abschnitt 4.5.5). Am Standort Forellenbach 4 konnte keine embryotoxische Wirkung für das Porenwasser nachgewiesen werden.

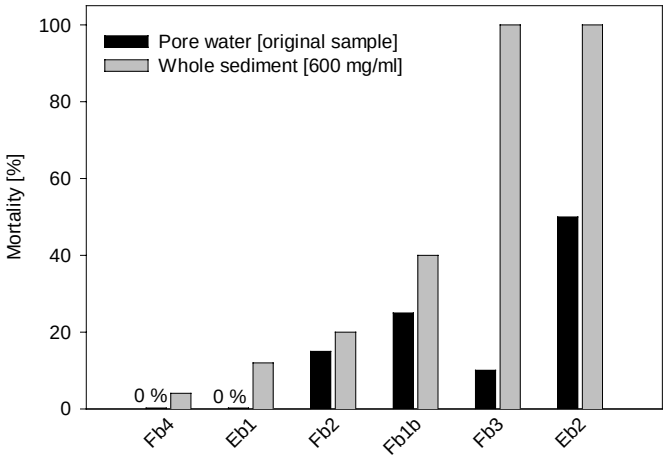


Abb. 4.34. Vergleich der Mortalität der Expositionsphasen Porenwasser (unverdünnte Orginalprobe) und natives Sediment (Höchstkonzentration von 600 mg/ml) für die Standorte Eberbach (Eb) und Forellenbach (Fb), modifiziert nach Rudolf (2000).

Im Gegensatz zum geringen Toxizitätsunterschied der Porenwässer (Faktor 2) wirkten die acetonischen Sedimentextrakte des Forellenbaches 1 und 1b um Größenordnungen toxischer als die Referenzprobe (Faktor 10 für die EC_{50}, Abb. 4.32).
Organische Sedimentextrakte sind dem Vorwurf ausgesetzt, die potentielle Toxizität zu untersuchen und von der tatsächlichen Bioverfügbarkeit weit entfernt zu sein (Ahlf 1995, Burton 1991, Hollert et al. 1999a, g, Zimmer & Ahlf 1994). Für eine Bewertung der dargestellten Befunde aus den Untersuchungen mit organischen Sedimentextrakten gilt es daher deren ökologische Relevanz kritisch zu hinterfragen: Abb. 4.33 zeigt die Befunde des Fischeitests mit nativen Sedimenten, dem bei Sedimentuntersuchungen zweifelsohne eine hohe Aussagekraft für das Schutzgut Fische zukommt, da er mit der Exposition von Fischeiern auf Sedimenten eine tatsächliche Gegebenheit im Lebenszyklus dieser Wirbeltiere simuliert, die *a priori* auch einen Einfluss auf die Populationsebene hat. Für die nativen Sedimente des Forellenbaches (Abb. 4.33 und 34) konnten große Unterschiede in der embryotoxischen Wirkung detektiert werden. Während für die Referenz Fb2 und den Regenerationsstandort Fb4 nur geringe bzw. keine Mortalität nachgewiesen werden konnte, tötete das Sediment nach der Kläranlageneinleitung (Fb1b) 40 % und das Sediment nach dem Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3) sogar 100 % der Embryonen bei der untersuchten Höchstkonzentration von 600 mg/ml. Ein Vergleich der Toxizität der Sedimente des Forellenbaches bei Verwendung verschiedener Expositionspfade (Abb. 4.34) zeigt, dass im Fischeitest mit *Danio rerio* die alleinige Verwendung der Testphase Porenwasser das tatsächlich bioverfügbare Schadstoffpotenzial (ermittelt mit nativen Sedimenten) deutlich unterbewertet. So schädigte das Porenwasser des Standortes Fb3 die Embryonen zu nur 15 %, wogegen das native Sediment die Embryonen zu 100 % schädigte.
Auch bei den Standorten Fb1b und Fb2 konnte eine höhere Toxizität für die nativen Sedimente nachgewiesen werden. Somit geht von den lipophilen Verbindungen ein nicht unerheblicher Anteil des tatsächlich bioverfügbaren (!) Schädigungspotenzials aus. Dieser Befund verdeutlicht erneut, dass die bioverfügbare Toxizität keinesfalls über die alleinige Verwendung von Porenwasser bestimmt werden kann, da sonst drastische Fehleinschätzungen des bioverfügbaren Schädigungspotenzials erfolgen können (Hollert et al. 2000d). Insbesondere die derzeit gültige Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (BfG 2000), die für die ökotoxikologische Untersuchung von Sedimenten ausschließlich die Expositionspfade Porenwasser und Eluat einsetzt, erscheint vor diesem Hintergrund unzureichend.
Abb. 4.35 zeigt eine Regressionsgerade der EC_{20}-Werte der Expositionspfade acetonischer Extrakt und natives Sediment. Obgleich aufgrund der aufwendigen Durchführung des Fischeitests nur 6 Sediment-

proben als natives Sediment getestet wurden, konnte mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson 0,98 und einem Rang-Korrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,98 eine sehr gute Übereinstimmung der Embryotoxizität ermittelt werden. Auf der Basis der untersuchten Proben scheint die Verwendung von acetonischen Extrakten bei etwa achtfach niedrigeren Sedimentkonzentrationen vergleichbare Ergebnisse zumindest bezüglich eines Rankings der Embryotoxizität zu erbringen. Daher kann für ein Routine-Screening die Verwendung des Expositionspfades acetonischer Extrakt zu einem ersten Abschätzen der Toxizität und das native Sediment für die Überprüfung des tatsächlich bioverfügbaren Schädigungspotenzials empfohlen werden.

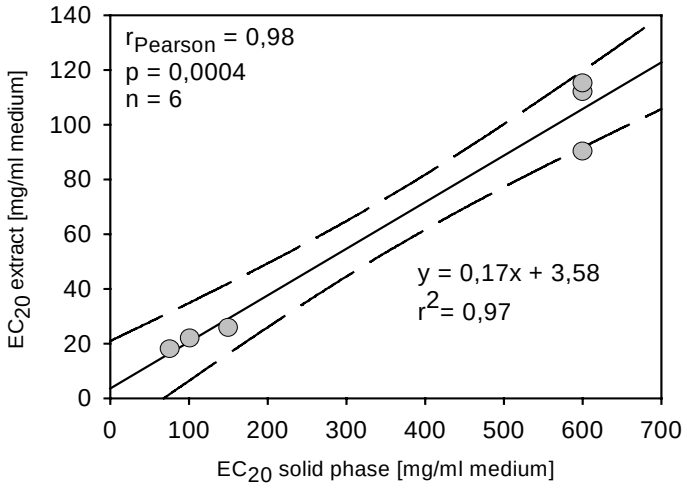


Abb. 4.35. Korrelation der LC_{20}-Werte der Expositionsphasen acetonischer Extrakt und natives Sediment im Fischeitest mit *Danio rerio*. Datengrundlage für die nativen Sedimente: Rudolf (2000).

Abb. 4.36 zeigt die Tagesschlupfraten von *Danio rerio* nach Exposition gegenüber der Höchstkonzentration von 600 mg/ml nativem Sediment. Im Kontrollansatz mit ISO-Kunstwasser schlüpften 8 % der Tiere verfrüht (< 3 Tage), 88 % der Tiere am dritten Tag, und für keines der Tiere konnte ein Spätschlupf (> 4 Tage) festgestellt werden. Durch die niedrige Mortalität und der zur Kunstwasserkontrolle analogen Verteilung bei den Tagesschlupfraten konnte für den Quarzsand der Siebklasse W4 eine nur geringe Toxizität detektiert werden. Abgesehen vom Sediment Fb4, dem Regenerationstandort des Forellenbaches, veränderten alle untersuchten nativen Sedimentproben die Tagesschlupfraten deutlich. Obwohl für die beiden Sedimente Fb2 und Fb4 nur eine geringe Mortalität nachgewiesen werden konnte, zeigt die Verteilung der Tagesschlupfraten ein eindeutiges embryotoxisches Schädigungspotenzial für den Referenzstandort Fb2 des Forellenbaches an: Während bei allen anderen Sedimenten die Larven an den Tagen 2 und 3 schlüpften, konnte im nativen Sediment dieser Probe für 60 % der Eier (beziehungsweise für 79 % der geschlüpften Eier) ein verspäteter Schlupftermin (Tag 4-6) festgestellt werden (Abb. 4.36).

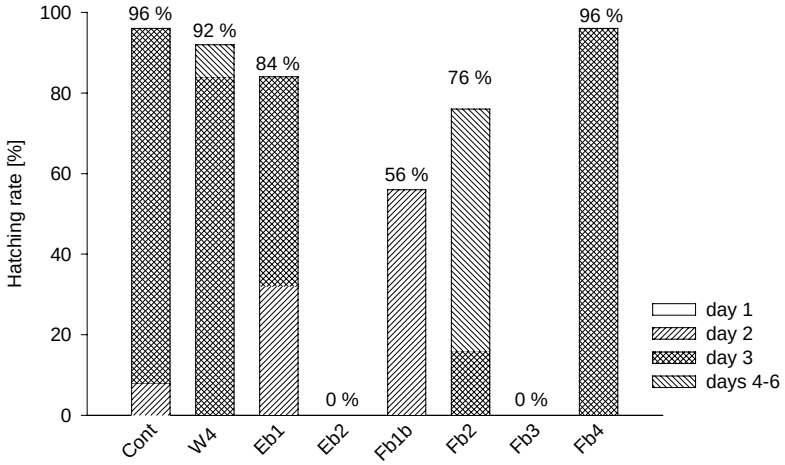


Abb. 4.36. Tagesschlupfraten von *Danio rerio* bei Exposition gegenüber 600 mg/ml nativem Sediment der Triadestandorte an der Flachwasserzone (Eb) und am Forellenbach (Fb), ISO-Kunstwasser (Cont) und Quarzsand der Siebklasse W4 (W4). Datengrundlage: Rudolf (2000).

Das Sediment des Standortes Fb2 unterschied sich bei den chemisch-analytischen Untersuchungen (Abschnitt 4.5) vor allem durch seine hohen PCB-Gehalte von den anderen untersuchten Sedimenten.

Für PCBs konnten sowohl Mortalität als auch verringerte Schlüpferfolge in *Early Life-Stage-Tests* mit verschiedenen Fisch-Spezies nachgewiesen werden (Billsson et al. 1998, Matta et al. 1997, Olsson et al. 1999b, Westerlund et al. 2000). Verspätete Schlupftermine konnte auch Strmac (1999) bei der Exposition gegenüber acetonischen Sedimentextrakten aus der stark mit PCBs belasteten Körsch in einem verlängerten *Early Life-Stage*-Test mit *Danio rerio* nachweisen.
Das Sediment des Regenerationsstandortes Fb4 glich bei der Verteilung der Tagesschlupfraten weitgehend dem ISO-Kontrollwasser, so dass dieses Sediment nicht nur bezüglich der Mortalität, sondern auch bei diesem Parameter einen geringeren Effekt bei den Embryonen zeigte als das Kontrollsediment aus Quarzsand. Dieser Befund zeigt an, dass auch in stark industrialisierten Gebieten durchaus Freilandsedimentproben ohne embryotoxisches Schädigungspotenzial im Fischeitest mit *Danio rerio* vorgefunden werden können.
Die Befunde verdeutlichen die gute Eignung des Fischeitests mit *Danio rerio* zur Untersuchung von komplexen Umweltproben und speziell von partikulär gebundenen Schadstoffen (Ensenbach 1998, 1999, Hollert et al. 2000d). Da die Fischeier auch mit der Expositionsphase natives Sediment untersucht werden können, kann eine differenzierte Bewertung des embryotoxischen Potenzials erreicht werden. Obgleich die Empfindlichkeit des Fischeitests durch eine Verlängerung der Expositionszeit zum *Early Life-Stage*-Test deutlich gesteigert werden konnte, zeigt diese Studie, dass bereits eine Exposition im Fischeitest über 48 h, die noch nicht als Tierversuch einzustufen ist (Amtsblatt der EG L 358/1 vom 18.12.1986 und Bundesgesetzblatt Z 1998A vom 11.12.1990), eine eindeutige Bewertung der embryotoxischen Wirkung partikulär gebundener Schadstoffe ermöglicht.

4.7.4 Akuter Cytotoxizitätstest mit RTG-2-Zellen

Tabelle 4.13 gibt einen Überblick über die Cytotoxizität der verschiedenen Expositionsphasen der Sedimente im akuten Zelltest mit der permanenten Zelllinie RTG-2. Abb. 4.37 zeigt die zelltoxische Wirkung der acetonischen Sedimentextrakte in Abhängigkeit von exogener Bioaktivierung mit Hilfe von S9-Mix aus ß-Naphthoflavon/Phenobarbital-induzierten Ratten. Bei sieben der untersuchten zwölf

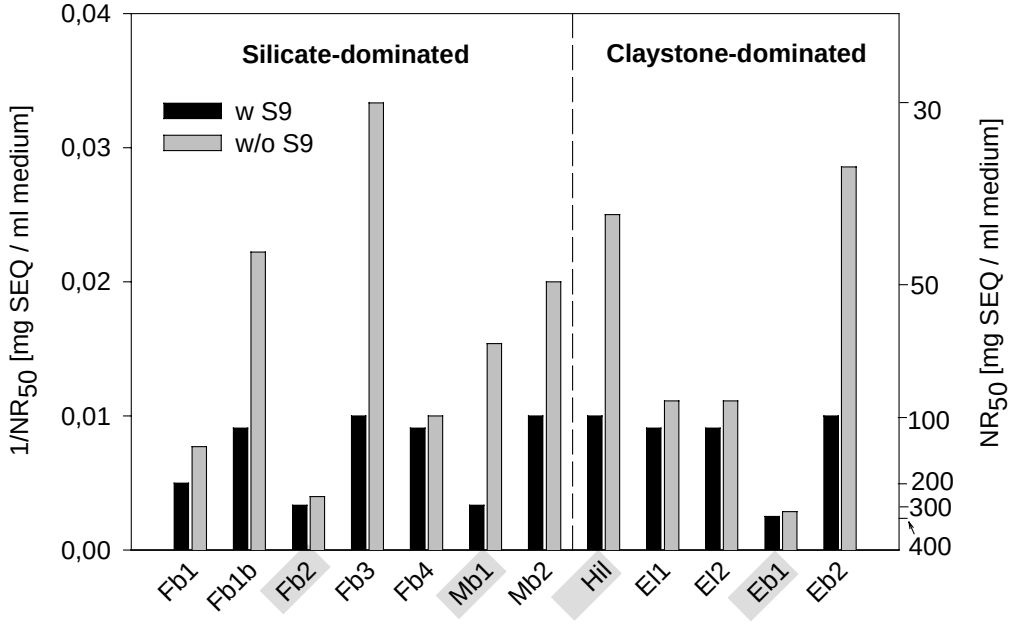


Abb. 4.37. Cytotoxizität von acetonischen Sedimentextrakten der Sedimentbewertungstriade im akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen in Abhängigkeit von exogener S9-Supplementierung und geologischem Einzugsgebiet. Die NR_{50}-Werte werden als mg trockenes Sedimentäquivalent (SEQ) pro ml Testmedium angegeben: Die Referenzstandorte sind jeweils grau unterlegt.

Sedimentextrakte wirkte der Ansatz ohne S9-Supplementierung cytotoxischer, in 5 Fällen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dieser Befund zeigt, dass in den organischen Extrakten nur ein geringer Anteil der cytotoxischen Wirkung auf solche Stoffe zurückgeführt werden kann, die einer Aktivierung durch das P450-System bedürfen (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a). Die geringere Cytotoxizität der supplementierten Ansätze bei den Extrakten der Standorte Fb1, Fb1b, Fb3, Mb1, Mb2, Hil und Eb2 weist auf eine Detoxifizierung der lipophileren Sedimentinhaltsstoffe durch die Biotransformationsenzyme des S9 hin (Braunbeck et al. 1997b, Elliott et al. 1992, Fry 1982, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1996, Hollert et al. 2000a, Segner 1998, Zahn et al. 1996), könnte aber auch die Folge einer Adsorption von Sedimentinhaltsstoffen an den S9-Proteinen (De Maagd et al. 1998) sein, die zu einer effektiven Erniedrigung der Konzentration cytotoxischer wirksamer Substanzen im Testansatz führen kann.

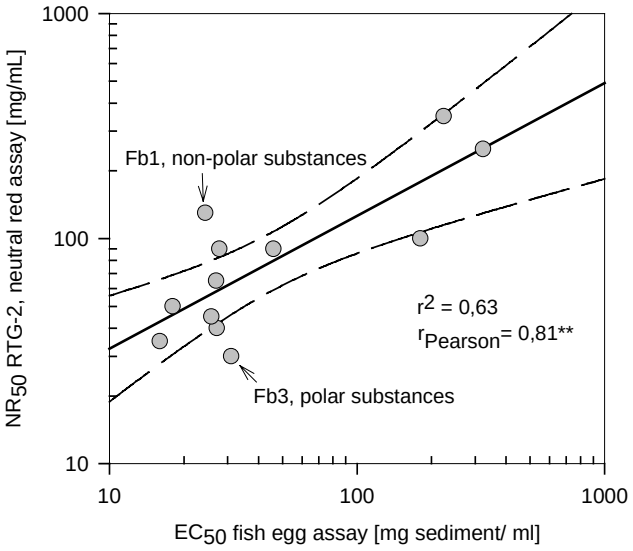


Abb. 4.38. Korrelation der cytotoxischen Wirkung von acetonischen Sedimentextrakten im Neutralrot-Assay und der embryotoxischen Wirkung im Fischeitest mit *Danio rerio* nach jeweils 48 h Expositionsdauer. Eine Korrelationsanalyse nach Pearson ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,81.

Unabhängig vom geologischen Charakter des Einzugsgebietes konnten für die Extrakte aus den Dosis-Wirkungs-Beziehungen NR_{50}-Werte von 35 bis zu 400 mg Sedimenttrockengewicht / ml Medium ermittelt werden. Abgesehen vom Standort Hilsbach (Hil) konnte für die Referenzstandorte jeweils das geringste cytotoxische Schädigungspotenzial ermittelt werden. Die größten Zunahmen im Vergleich zum Referenzstandort ließen sich mit einem Faktor 10 beim NR_{50} für die Standorte Fb3 am Forellenbach und für den hinteren, temporär trockenfallenden Standort Eb2 an der Flachwasserzone feststellen. Die sehr hohe Cytotoxizität dieser acetonischen Extrakte im akuten Zelltest korreliert mit einer ebenfalls sehr hohen embryotoxischen Wirksamkeit der nativen Sedimente im Fischeitest mit *Danio rerio*. Dieser Befund verdeutlicht, dass die im akuten Zelltest ermittelte Cytotoxizität acetonischer Extrakte durchaus eine Relevanz für das Ökosytem Flachwasserzone hat. Die ermittelten EC_{50}-Werte der acetonischen Extrakte im Fischeitest mit *Danio rerio* und dem akuten Zelltest korrelierten mit Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,62 (Zelltest mit S9-Mix) und 0,81 (Zelltest ohne S9, Abb. 4.38), wobei bei beiden Ansätzen der Fischeitest deutlich sensitiver reagierte. Bei den beiden Standorten, bei denen die EC_{50} außerhalb des 95% Konfidenzintervalles lagen, zeigte in einem Fall der akute Zelltest im Ansatz ohne S9 eine hohe Toxizität, so dass eine Dominanz von polaren Substanzen abzuleiten ist (Fb3, Abb. 4.38). Dieser Befund korreliert sehr gut mit der hohen Schwermetallbelastung, die für das Porenwasser dieses Standorts nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 4.5.5). Im anderen Fall (Fb1) ergab der akute Zelltest im Ansatz ohne S9 eine deutlich geringere Toxizität, so dass in diesem Extrakt hohe Konzentrationen unpolarerer Substanzen anzunehmen sind, die einer Aktivierung durch das P450-System benötigen. Durch die hohe Korrelation des akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen mit dem Fischeitest mit *Danio rerio* kann der Fischzelltest sehr gut für Routineuntersuchungen (Braunbeck et al. 1997b, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000c, Neumann-Hensel et al. 2000a) oder für spezielle Fragestellungen mit großen Probenzahlen, etwa bei komplexen Bioassay-dirigierten Fraktionierungen (Abschnitt 6; Hollert et al. 2000d), eingesetzt werden, bei denen die etwas niedrigere Empfindlichkeit nicht stört (Hollert et al. 1999b).

4.7.5 Algenhemmtest

Um die ökotoxikologische Wirkung ausgewählter Sedimentproben gegenüber Primärproduzenten zu überprüfen, wurden 6 Sedimenteluate freundlicherweise von Herrn Gratzer (TU Hamburg-Harburg) im Algenhemmtest mit *Pseudokirchneriella subkapitata* untersucht, der einen weiteren Bestandteil der von Zimmer & Ahlf (1994) vorgestellten und von Gratzer & Ahlf (1999a) validierten Biotestbatterie darstellt. Der Algenhemmtest mit Eluaten wird auch seitens der Bundesanstalt für Gewässerkunde im Rahmen der Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB-WSV) als Biotest angewendet (BfG 2000). Der Test wurde in Anlehnung an DIN 38 412, Teil 33 (1989) durchgeführt. Abb. 4.39 zeigt die Algentoxizität der untersuchten Eluate. Während für den Standort Hilsbach im Elsenzgebiet (Hil) eine hohe Algentoxizität ermittelt werden konnte, die aus einem Eintrag von Pestiziden aus dem stark landwirtschaftlich geprägten Einzugsgebiet resultieren könnte (Assmann 1998), wirkten die Eluate des Forellenbaches unterschiedlich: Für die Referenzprobe und den Regenrationsstandort konnte eine leichte Algentoxizität ermittelt werden, wogegen die Eluate der Sedimente nach der Kläranlageneinleitung (Fb1 und Fb1b) und das Sediment am Standort des Zusammenflusses der beiden Fließgewässer (Fb3) das Wachstum der Primärproduzenten in einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung förderten. Die Wachstumsförderung könnte aus der starken Eutrophierung des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung durch Makronährstoffe resultieren, die in hohen Konzentrationen gemessen werden konnten (Tab. 4.5). Während Makronährstoffe über eine wässrige Elution gut in die wässrige Phase überführt werden können, werden lipophile Schadstoffe, die zu großen Teilen für das Schadstoffpotenzial des Forellenbaches verantwortlich sind, nur zum Teil erfasst.

Die Befunde verdeutlichen, dass über die alleinige Verwendung eines Biotests zur Bewertung der Sedimenttoxizität gegenüber Primärproduzenten keinesfalls die allgemeine Toxizität ermittelt werden

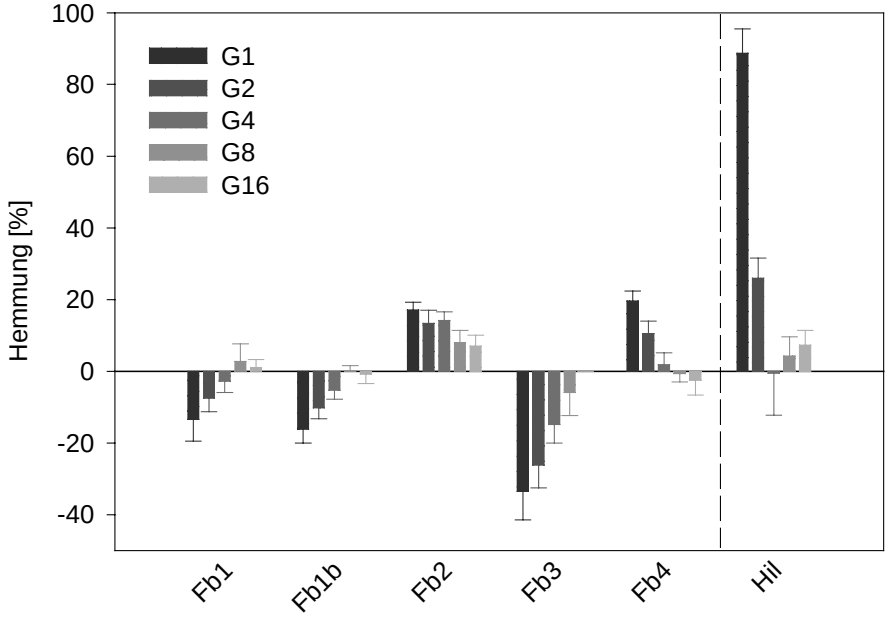


Abb. 4.39. Algentoxizität von ausgewählten Sedimenteluaten der Sedimenttriade im Algenhemmtest mit *Pseudokirchneriella subkapitata*. Die Verdünnungsstufen des Orginaleluates (Methode bei Gratzer und Ahlf 1999) werden nach der G-Systematik (DIN 38412 Teil 31, 1989) als ganzzahlige Volumenverhältnisse einer Mischung des Eluates mit Verdünnungswasser angegeben. Datengrundlage: Herr Gratzer, unveröffentlicht.

kann (Steinberg et al. 1996). Zudem haben Untersuchungen von Feiler & Krebs (1999) mit Hilfe eines kombinierten Einsatzes verschiedener Pflanzenbiotests gezeigt, dass die alleinige Verwendung des Algenhemmtests nicht ausreicht, alle pflanzentoxische Substanzen in Sedimenten zu erfassen.

4.7.6 Comet-Assay

Die gentoxische Wirksamkeit der Sediment- und Wasserproben wurde mit dem Comet-Assay und der permanenten Zelllinie RTG-2 in Abhängigkeit von exogener Supplementierung mit biotransformationskompetenten S9-Mix untersucht. In Abb. 4.40 ist als ein Beispiel die gentoxische Wirkung von wässrigen Eluaten zweier Sedimente aus der Flachwasserzone bei Eberbach im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen dargestellt. Zum Ausgleich der geringen Biotransformationskapazität der RTG-2-Zellen wurden die Proben mit und ohne S9-Supplementation untersucht. Das Eluat des Sedimentes aus dem vorderen Bereich der Flachwasserzone (Eb1) wirkte nur im Ansatz mit S9-Mix gentoxisch, wogegen das Eluat des temporär trockenfallenden Sedimentes (Eb2) im Ansatz mit und ohne S9 eine deutliche gentoxische Wirkung mit Induktionsfaktoren von 3 besaß (Abb. 4.41). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich Wirksamkeit im Ansatz ohne S9-Supplementierung könnte das temporäre Trockenfallen des Sedimentes aus dem hinteren Bereich der Flachwasserzone mit einer ständigen Oxidation sein, das bei den Schwermetallen zu einer chemischen Transformation von schwerwasserlöslichen zu leichter wasserlöslichen Metallbindungsspezies führen kann (Calmano et al. 1991, Martin et al. 1996). Eine Transformation zu polareren, besser wasserlöslichen Derivaten durch oxidative Prozesse ist auch für organische Verbindungen bekannt (Letzel et al. 1999). Dieser Befund deutet an, dass das temporäre Remobilisieren und Trockenfallen der Sedimente des Standortes Eb2 nicht nur zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit der toxischen und embryotoxischen Substanzen (Abschnitte 4.7.3 und 4.7.4) sondern auch der gentoxischen Verbindungen führen kann. Der ermittelten gentoxischen Wirksamkeit des wässrigen Eluates Eb2 kommt eine hohe Relevanz für die Bewertung des Zustandes der Flachwasserzone zu, da bei einer gentoxischen Wirksamkeit *a priori* auch die Möglichkeit eines Effektes auf Populationsebene angenommen werden muss (Borzsonyi et al. 1984, de Maagd 2000, Depledge 1998, Metcalfe et al. 1990), und diese über die Korrelation mit Veränderungen von Organismen im Freiland auch mehrfach gezeigt werden konnten (Balch et al. 1995,

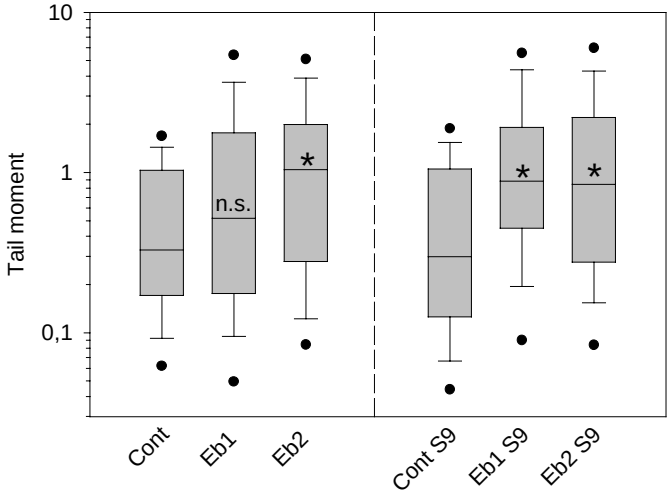
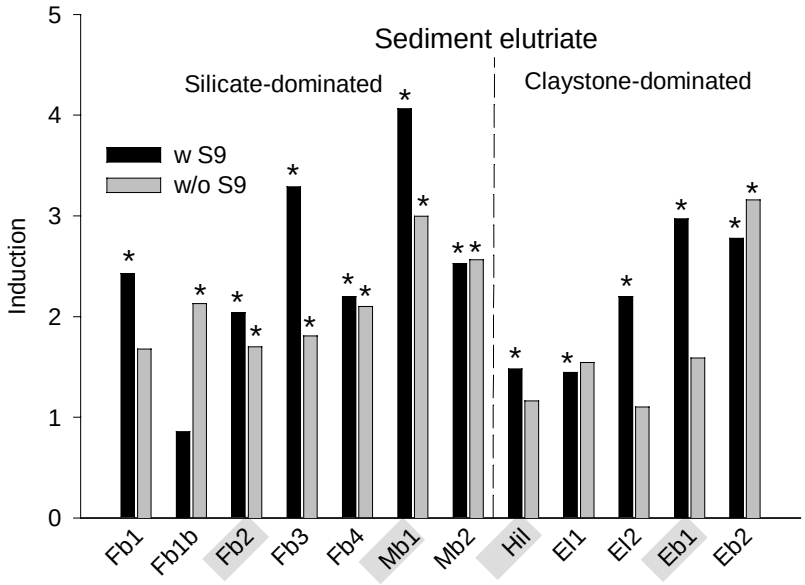
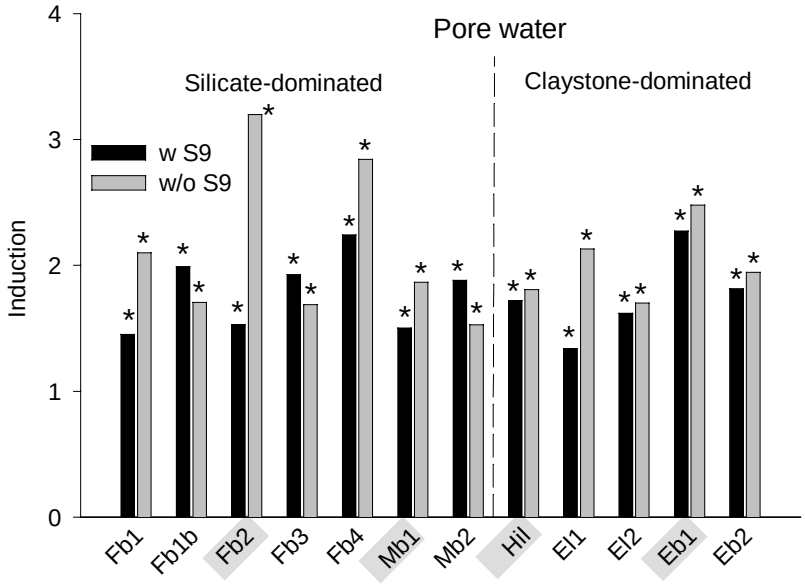


Abb. 4.40. Gentoxische Wirkung von wässrigen Eluaten der Flachwasserzone bei Eberbach im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen in Abhängigkeit von S9-Supplementierung. Die Mediane der Tail moments aus jeweils 100 Messungen, die 25- und 75-Prozentperzentile (Begrenzungen der grauen Boxen), die Standardabweichungen sowie 5- und 95- Prozentperzentile (•) sind markiert. Die Proben, die sich nach einer einfaktoriellen Varianzanalyse und einem anschließenden *Post hoc*-Test nach Dunnett mit $p < 0,05$ von der Kontrolle (cont) unterschieden, sind mit * gekennzeichnet. N.s.: nicht signifikant. Datengrundlage: Karaus (1999).





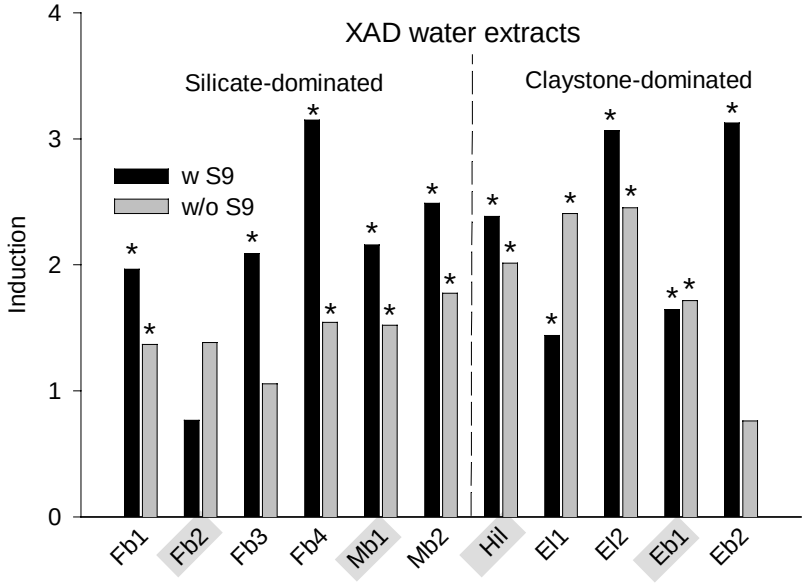


Abb. 4.41. Gentoxische Wirkung von Sedimenteluaten und –porenwässern sowie XAD-Wasserextrakten im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen, dargestellt als Induktionsraten. Zum Ausgleich der geringen Biotransformationskapazität der RTG-2-Zellen wurde der Comet-Assay mit (w S9) und ohne (w/o S9) S9-Supplementierung durchgeführt. Die jeweiligen Kontrollstandorte sind grau unterlegt. Für die mit * markierten Proben konnte eine signifikante Genotoxizität im Comet-Assay ermittelt werden (*Post hoc*-Test nach Dunnett $p < 0{,}05$). Datengrundlage: Karaus (1999).

Kemble et al. 1994, Metcalfe et al. 1990, Mitchelmore et al. 1998, Pascoe et al. 1994, Van Veld et al. 1992, Vogelbein & Fournie 1994, Vogelbein et al. 1990). In Abb. 4.41 sind die Ergebnisse der Untersuchung von wässrigen Eluaten, Porenwässern und XAD-Oberflächenwasserextrakten im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen vergleichend dargestellt. Es ist auffällig, dass für die Mehrzahl der untersuchten Proben eine deutliche gentoxische Wirksamkeit der Proben nachgewiesen werden konnte. Bei den Sedimenteluaten konnte neben der Flachwasserzone auch für die Standorte Fb1 und Fb3 nach der Kläranlageneinleitung am Forellenbach und für den Oberlauf des Mühlbaches (Mb1) eine hohe gentoxische Wirksamkeit in den S9-supplementierten Ansätzen festgestellt werden. Die hohe gentoxische Belastung des Standortes Mb1 könnte aus partikulär gebundenen organischen Luftschadstoffe (Clonfero 1997, Lewtas 1988) aus der stark industrialisierten Region Mannheim / Ludwigshafen resultieren, in deren direkter Abluftfahne der Mühlbach gelegen ist. Für urbane Luftstäube konnten eine gentoxische Wirkung im Comet-Assay mit menschlichen Leukozyten und Blutzellen (Poli et al. 1999, Sram et al. 1999) und mit zahlreichen anderen Genotoxiztitäts- und Mutagenitätstests nachgewiesen werden (Übersichten bei Clonfero 1997, Erdinger et al. 1997, Lewtas 1988). Während in acetonischen Extrakten mit Hilfe des Comet-Assays keine signifikanten gentoxische Wirksamkeit im Comet-Assay nachgewiesen werden konnte (Daten nicht dargestellt), induzierten einige Porenwässer Induktionsfaktoren bis über 3. Die geringe gentoxische Wirksamkeit der Extrakte könnte zum Teil aus einer Maskierung der gentoxischen Wirksamkeit durch zelltoxische Effekte bewirkt worden sein, die durch eine Bioassay-dirigierte Fraktionierung und dem Endpunkt Mutagenität im Ames-Test für die acetonischen Extrakte experimentell nachgewiesen werden konnte und in Abschnitt 4.7.7 detaillierter diskutiert wird.

4.7.7 Ames-Test

Die Mutagenität von acetonischen Sedimentextrakten und XAD-Oberflächenwasserextrakten wurde im Ames-Test mit den Stämmen TA 98 und TA 100 (mit und ohne S9-Supplementierung) und YG 1021 untersucht. Tab. 4.10 gibt einen Überblick über die ermittelten Induktionsfaktoren.

Die meisten untersuchten acetonischen Extrakte besaßen eine geringe bis mäßige mutagene Wirksamkeit. In einigen Fällen, etwa beim Forellenbach nach der Kläranlageneinleitung, konnten umgekehrt U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden: Während bei hohen Extraktkonzentrationen geringe Induktionsfaktoren vorherrschten oder zum Teil sogar eine Abnahme des Induktionsfaktors gegenüber der Kontrolle festgestellt werden konnte, nahm die Mutagenität bei geringeren Extraktkonzentrationen zunächst signifikant zu und im weiteren Verlauf der Dosis-Wirkungskurve wieder ab (Abb. 4.42).

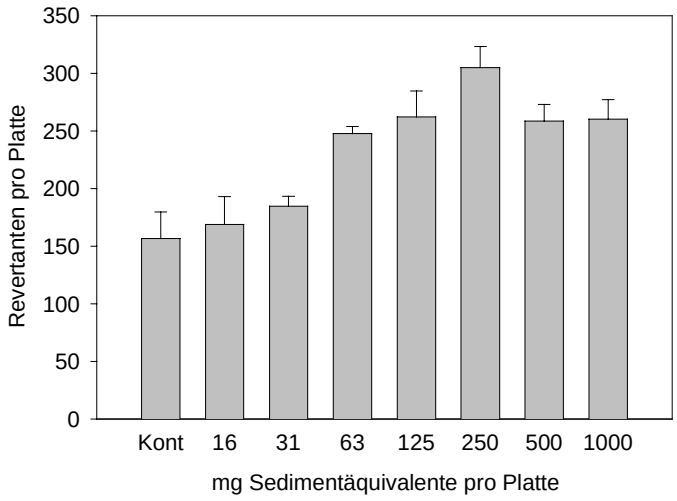


Abb. 4.42. U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung eines acetonischen Gesamtextraktes des Sedimentes Fb1 im Ames-Test (Stamm TA 100 mit S9-Supplementierung). Kont = Kontrolle. Die Proben mit statistisch signifikanter Mutagenität im Dunnett-Test ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die invers U-förmigen Dosis-Wirkungskurven können durch eine Überlagerung und Maskierung der Mutagenität durch eine

akut bakterientoxische Wirkung bei hohen Extraktkonzentrationen erklärt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden acetonische Extrakte der Standorte Forellenbach 1, 1b, 3 und 4 mit Hilfe einer Bioassay-dirigierten Fraktionierung nach pH-Wert (Hollert et al. 2000a) in Teilfraktionen mit neutralen, basischen, schwach und stark sauren Inhaltsstoffe aufgetrennt, um akut toxische und mutagene Substanzen zu trennen und die mutagenen Substanzen näher zu identifizieren. Der überwiegende Anteil der mutagenen Wirkung konnte in den neutralen Fraktionen detektiert werden. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Neutralfraktionen bestätigen die Hypothese einer möglichen Maskierung der Mutagenität aquatischer organischer Sedimentextrakte durch akute Toxizität (Abb. 4.43): Während die acetonischen Gesamtextrakte des Forellenbaches 1 mit einem Induktionsfaktor von bis zu 1,9 nur mäßig mutagen wirkten, konnte für die Neutralfraktionen der Säure-Base-Trennung ein Induktionsfaktor von 6 (!) bestimmt werden. Abb. 4.43 zeigt zudem den Verlauf der Mutagenität der neutralen Fraktionen von der Einleitungsstelle der Kläranlage in den Forellenbach (F1) bis zum durch Regeneration geprägten Standort Forellenbach 4 (F4): In der Neutralfraktion des Standortes Forellenbach 4 konnte keine Mutagenität nachgewiesen werden.

Aufgrund der hohen Mutagenität des Sedimentes Forellenbach 1 wurde dieses in Kooperation mit Herrn Dr. Brack (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle) in einer komplexeren Bioassay-dirigierten Fraktionierung (Säulenchromatographie und HPLC) weiter untersucht, um die toxikologisch problematischen Substanzklassen bzw. Substanzen zu identifizieren (Abschnitt 6).

Die Abbildungen 4.44 und 45 zeigen, dass nicht nur für die Sedimentextrakte sondern auch für einige XAD-Extrakte von Oberflächenwasserproben eine mutagene Wirkung nachgewiesen werden konnte. Im Stamm TA 98 mit S9-Supplementierung (Abb. 4.44) wirkten die Extrakte Forellenbach 3 und Eberbach 1 in Dosis-Wirkungs-Beziehungen mutagen. Der XAD-Extrakt des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung wirkte in den beiden höchsten Konzentrationen (Äquivalentkonzentrationen von 500 und 250 ml Wasser pro Ames-Platte) bakterientoxisch. Alle Verdünnungsstufen des Extraktes Fb1 von 1:4 bis zu 1:32 induzierten eine signifikante Mutagenität, so dass selbst für die geringe Äquivalentkonzentration von 16 ml pro Ames-Platte (entspricht einer nur vierfachen Aufkonzentrierung des nativen Wassers im optimierten Ames-Test nach Dürr 2001) eine signifikante Mutagenität nachgewiesen werden konnte. Im Ames-Test mit dem Stamm YG 1021, der verstärkt das Enzym Nitroreduktase exprimiert, konnten für die Extrakte von Forellenbach 1, 3 und 4, Mühlbach 1 und 2 sowie Eberbach 1 eine mutagene Wirkung bestimmt werden. Ein Erhöhung der Mutagenität im Stamm YG 1021 gegenüber TA 98 ohne S9 (Tab. 4.10) zeigt, dass in den Proben Fb1, Fb2, Mb2 und Eb2 Nitroverbindungen wie Nitroarene und aromatische Amine für einen signifikanten Anteil der mutagenen Wirkung verantwortlich gemacht werden können (Cerna et al. 1996, Sayato et al. 1990, Sundvall et al. 1984).

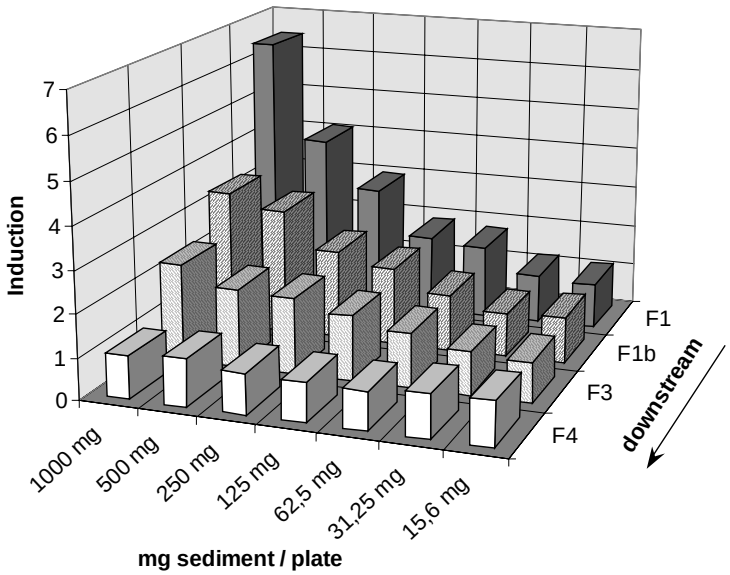


Abb. 4.43. Befunde einer bioassay-dirigierten Fraktionierung acetonischer Sedimentextrakte des Forellenbaches bei Heidelberg nach pH-Wert mit anschließender Überprüfung der mutagenen Wirksamkeit der neutralen Teilfraktionen im Ames-Test. Während von den basischen, den leicht und stark sauren Inhaltsstoffe keine oder nur eine geringe mutagene Wirksamkeit ausging, bewirkten die neutralen Fraktionen Induktionsfaktoren bis zu 6,5 im Ames-Test mit dem Stamm TA98 ohne S9-Supplementierung.

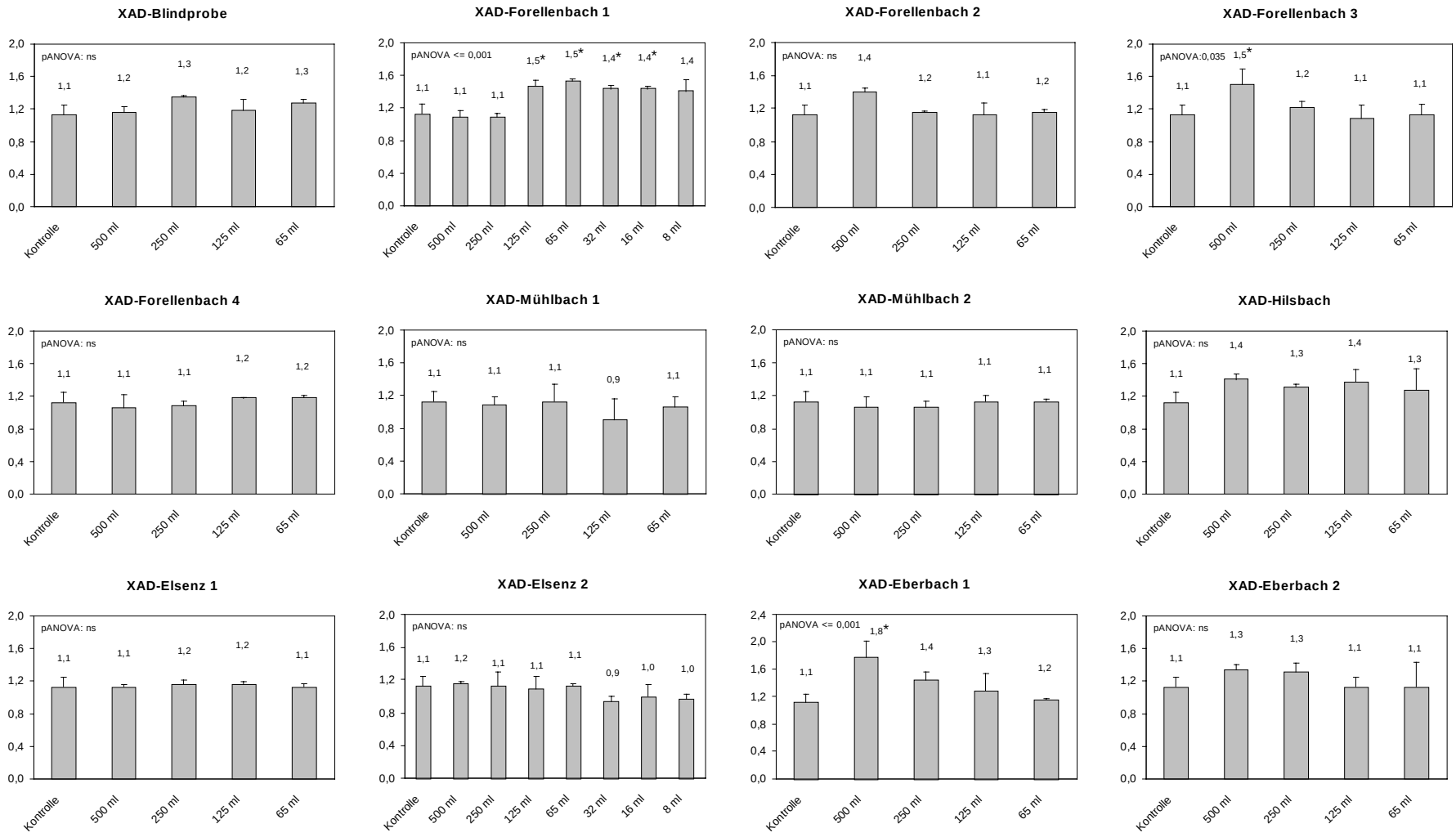


Abb. 4.44. Mutagene Wirkung von XAD-Oberflächenwasserextrakten der Integrierten Sedimentbewertung im Ames-Test (Stamm TA 98 mit exogener S9-Supplementierung). Auf den Ordinaten sind die Volumina an nativen Wasser angegeben, die den jeweils untersuchten Extraktverdünnungen entsprechen. Die Kontrollansätzen wurden mit 10 Replika und einzelnen Konzentrationen mit 3 Ansätzen untersucht. Es sind die Mediane der Induktionsfaktoren und die Standardabweichungen dargestellt. Die Konzentrationen, die sich in einem *Post hoc*-Test nach einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit $p < 0,05$ von der Kontrolle unterschieden sind mit * gekennzeichnet. Bei den mit ns gekennzeichneten Proben zeigte eine ANOVA keine signifikanten Unterschiede an.

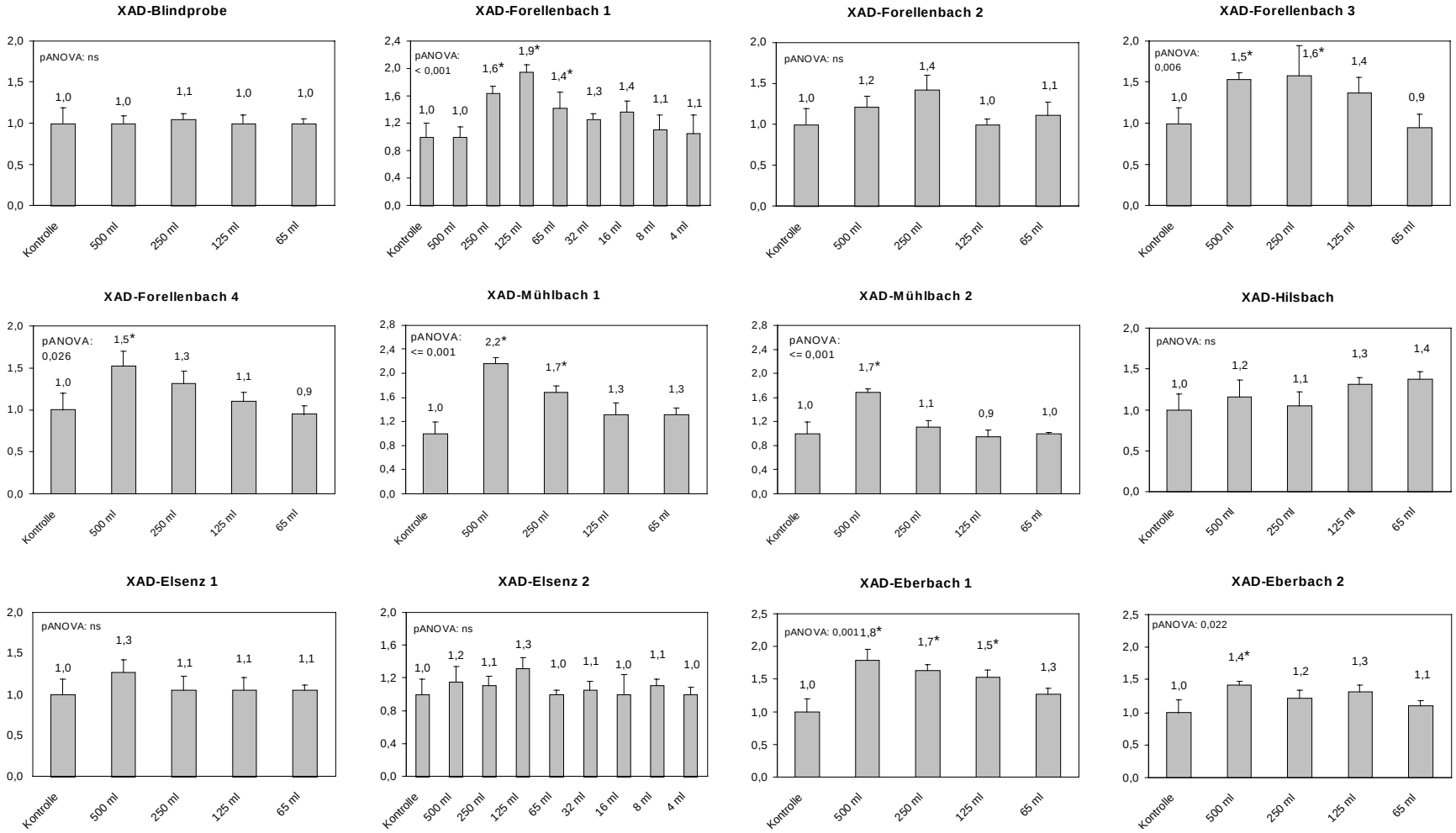


Abb. 4.45. Mutagene Wirkung von XAD-Oberflächenwasserextrakten der Integrierten Sedimentbewertung im Ames-Test (Stamm YG 1021). Auf den Ordinaten sind die Volumina an nativen Wasser angegeben, die den jeweils untersuchten Extraktverdünnungen entsprechen. Die Kontrollansätzen wurden mit 10 Replika und einzelnen Konzentrationen mit 3 Ansätzen untersucht. Es sind die Mediane der Induktionsfaktoren und die Standardabweichungen dargestellt. Die Konzentrationen, die sich in einem *Post hoc*-Test nach einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit $p < 0,05$ von der Kontrolle unterschieden sind mit * gekennzeichnet. Bei den mit ns gekennzeichneten Proben zeigte eine ANOVA keine signifikanten Unterschiede an.

4.7.8 Endokrine Wirksamkeit

Die xenoöstrogene Belastung von XAD-Wasserextrakten, organischen Extrakten und Porenwässer wurde mit dem Biomarker Vitellogenin-mRNA-Induktion im nicht-radioaktiven Dot-Blot/RNAse-Protection-Assay mit Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle untersucht. Große Teile der praktischen Untersuchungen wurden im Rahmen von Diplomarbeiten durchgeführt (Siebert 1999, Wetterauer 2001).

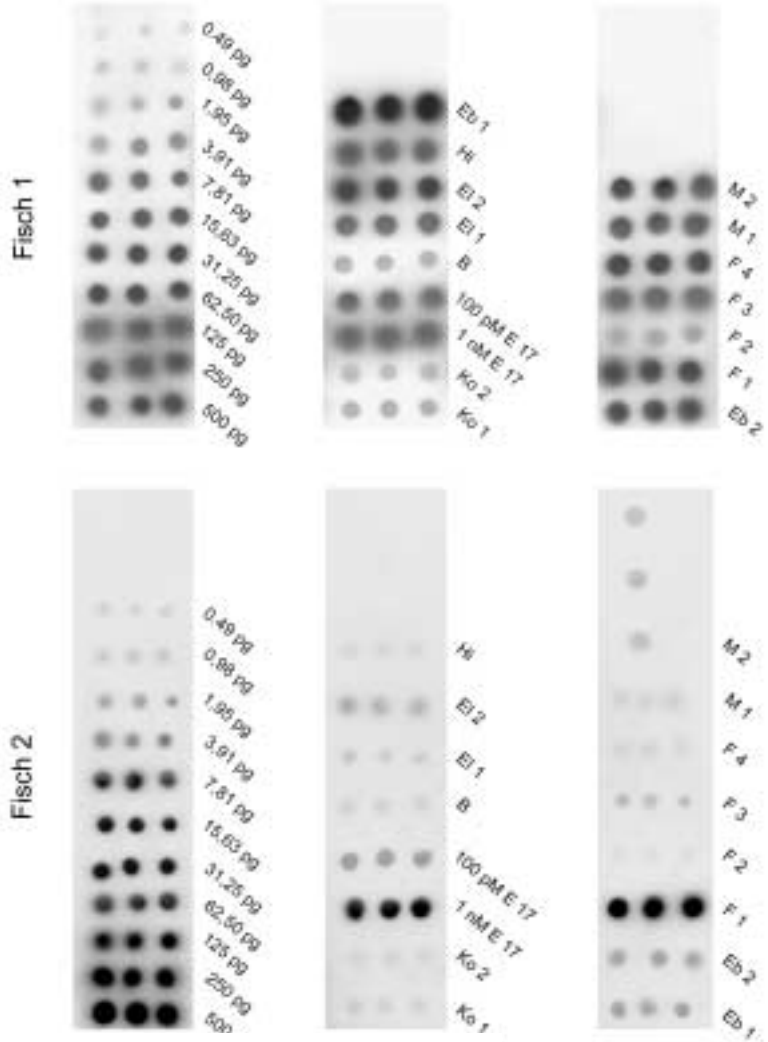
XAD-Oberflächenwasserextrakte

Die nativen Oberflächenwasserproben wurden zur Schwebstoffentfernung und Keimreduzierung mit Glasfaserfiltern filtriert und mit Hilfe von XAD-Harzen um den Faktor 10.000 aufkonzentriert. Die in DMSO rückgelösten Extrakte wurden im Dot-Blot-Assay mit einer 30-fachen Aufkonzentrierung in 2 unabhängigen Experimenten mit Primärhepatocyten aus jeweils einem Spenderfisch untersucht. Abb. 4.46 zeigt die Dot-Blots der über 96 h mit den XAD-Extrakten exponierten Primärhepatocyten. Die Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA erfolgte mit Hilfe von Vitellogenin-Standards, die von Herrn Islinger hergestellt (Islinger et al. 1999b) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Bei beiden verwendeten Spenderfischen induzierten einige der Extrakte eine vergleichbare Menge Vitellogenin-mRNA wie die mitgeführte Positivkontrolle von 1 nM 17ß-Estradiol. Die densitometrische Auswertung (Abb. 4.47) zeigt die Vitellogenin-mRNA-Induktion beider Versuchsfische in pg/µg Gesamt-RNA, wobei Fisch 1 durchweg empfindlicher reagierte als Fisch 2. Dies verdeutlicht die individuelle Variabilität von *In vitro*-Experimenten mit isolierten Hepatocyten (Braunbeck 1998, Braunbeck et al. 1995b), so dass für ein routinemäßiges Screening prinzipiell mindestens zwei Fische herangezogen werden sollten.

Bei beiden Ansätzen induzierte der Wasserextrakt F1 des Forellenbachs eine so starke Vitellogenin-mRNA-Induktion wie die mitgeführte Positivkontrolle von 1 nM 17ß-Estradiol. Am Standort Elsenz 1 wurde durch Fisch 2 ein Vitellogeningehalt von 4,1 pg/µg Gesamt-RNA ermittelt, wohingegen Fisch 1 mit 823 pg/µg Gesamt-RNA um den Faktor 200 stärker reagierte. Abgesehen vom Referenzstandort des Forellenbaches (Forellenbach 2) bewirkten alle anderen XAD-Extrakte bei Fisch 1 eine statistisch signifikante Vitellogenin-mRNA-Induktion, die deutlich oberhalb des Blindwertes (XAD-Extrakt aus Heidelberger Trinkwasser) lag. Als stark belastet erwiesen sich Elsenz 2 (4533 pg/µg Gesamt-RNA bzw. 100 pM E2-Äquivalentfaktor von 18,4), Eberbach 1 (Äquivalentfaktor 12,8) und Forellenbach 1 (Äquivalentfaktor 23,5). Bei Fisch 2 zeigten dagegen lediglich einige Extrakte eine signifikante Vitellogenin-mRNA-Induktion mit E2-Äquivalentfaktoren bis zu 1 (Elsenz 2, Eberbach 1, Eberbach 2, Forellenbach 1 und Mühlbach 2), aber lediglich der Standort Forellenbach 1 erreichte eine Vitellogenin-mRNA-Induktion (E2-Äquivalentfaktor von 18), die der mitgeführten Positivkontrolle von 1 nM 17ß-Estradiol glich.

17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen. Abb. 4.47 verdeutlicht, dass mit der Darstellung der Vitellogenin-mRNA-Gehalte als Äquivalentfaktor einer Positivkontrolle (in diesem Falle Induktionsfaktoren bezogen auf Positivkontrolle 100 pM 17 ß-Estradiol) die Variabilität zwischen den einzelnen Zellkulturansätzen verrechnet werden und eine höhere Vergleichbarkeit der Befunde verschiedener Testansätze erzielt werden kann. Eine solche relative Bezugsgröße ist bei anderen Bioassays wie etwa der EROD-Induktion mit 2,3,7,8-TCDD-Äquivalenten schon lange gebräuchlich (Brack et al. 2000, Engwall et al. 1994, 1997a, b, Huuskonen et al. 1998, Van den Berg et al. 1998), wurde aber bei Bioassays zur xenoöstrogenen Aktivität bisher nur vereinzelt eingesetzt (Engwall et al. 1998b, Körner et al. 2000). Insbesondere für die Erarbeitung einer einfachen Bewertungsstrategie für aquatische Systeme besitzt die Darstellung der gesamten xenoöstrogenen Wirksamkeit als Äquivalentkonzentration des starken endokrinen Disruptors 17ß-Estradiol eine hohe Praktikabilität, da auch Ergebnisse verschiedener Biotestsysteme direkt miteinander verglichen werden können (Hilscherova et al. 2000).

XAD-Oberflächenwasserextrakte



Acetonische Sedimentextrakte

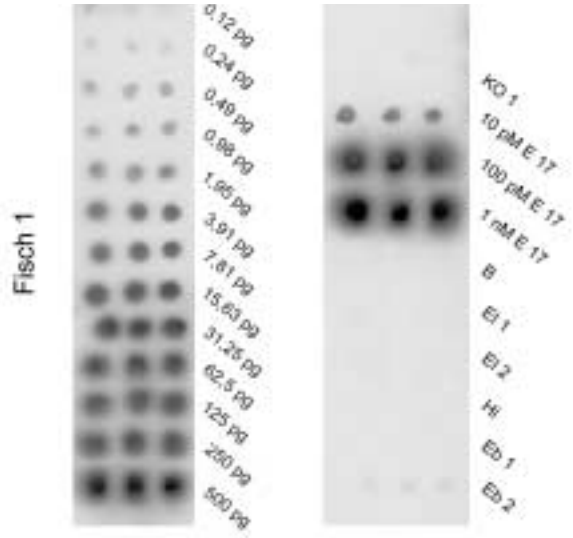
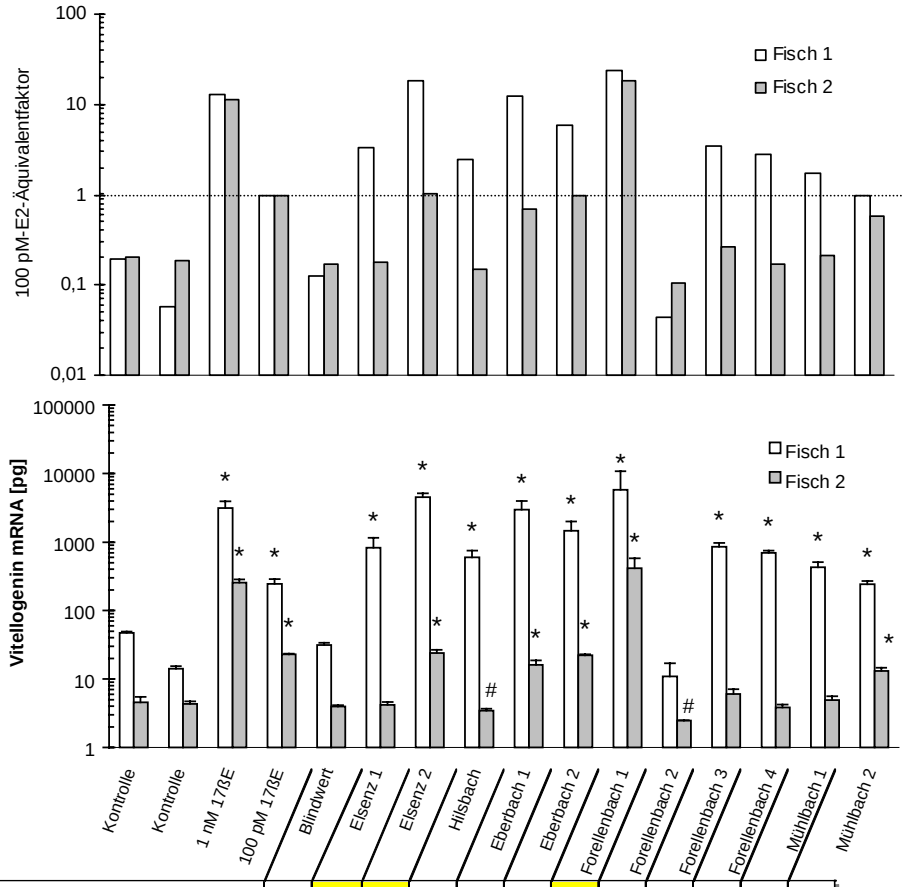


Abb. 4.46. (Xeno-)östrogenes Schädigungspotenzial von XAD-Wasserextrakten (Aufkonzentrierungsfaktor: 30) und acetonischen Sedimentextrakten im nicht radioaktiven Dot-Blot/RPA mit isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. Es wurde die Induktion der Vitellogenin-mRNA (Biomarker für (xeno-)östrogene Wirkung) in Primärhepatocyten von zwei Fischen nachgewiesen. Links ist jeweils ein Vitellogenin-mRNA-Standard für die densitometrische Quantifizierung aufgetragen. In der mittleren Spalte ist die Vitellogenin-mRNA-Induktion durch Kontrollen (Ko1, Ko2; 0,15% DMSO in M199-Medium), von einer XAD-Harz-Blindprobe (B) und von den Positivkontrollen 10, pM 100 pM und 1 nM 17β-Estradiol dargestellt. Modifiziert nach Siebert (1999).



	Kontrolle	Kontrolle	1 nM 17ßE	100 pM 17ßE	Blindwert	Elsenz 1	Elsenz 2	Hilsbach	Eberbach 1	Eberbach 2	Forellenbach 1	Forellenbach 2	Forellenbach 3	Forellenbach 4	Mühlbach 1	Mühlbach 2
techn. Octylphenol Isomer 1[ng/L]	<NG				9,5	9,6	6,5	<NG	<BG	13,6	<NG	5,1	<BG	<BG	<BG	
techn. Octylphenol Isomer 2 [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG<	<NG	
techn. Nonylphenol Summe [ng/L]	1,9				4,6	19,1	5,7	8,6	14,4	48,0	6,7	9,0	6,6	15,9	7,7	
Bisphenol A [ng/L]	3,7				>BG	71,1	15,6	8,4	27,4	86,7	9,4	10,7	2,3	>NG	4,3	
Diethylstilbestrol Isomer 1 [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Diethylstilbestrol Isomer 2 [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Hexestrol [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Androsteron [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	2,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Estron [ng/L]	<NG				<NG	8,1	<NG	1,2	<NG	2,5	<NG	<NG	<NG	<NG	0,8	
Estradiol [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Mestranol [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
2-Hydroxyestron [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Ethinylestradiol [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	
Estriol [ng/L]	<NG				<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	

Abb. 4.47. Endokrines Schädigungspotenzial von XAD-Wasserextrakten (Aufkonzentrierungsfaktor: 30) im Dot-Blot-Assay mit isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. Es wurde die Induktion von Vitellogenin-mRNA (Biomarker für endokrine Wirkung) im nicht radioaktiven Dot-Blot nachgewiesen und densiometrisch ausgewertet. Die Vitellogenin-mRNA-Konzentrationen sind in der Einheit pg Vg-mRNA pro µg Gesamt-RNA und als Induktionsfaktor bezogen auf die Positivkontrolle 100 pM angegeben. Die mit * gekennzeichneten Proben bewirkten eine statistisch signifikante Erhöhung, die mit # gekennzeichneten eine Verminderung der RNA-Konzentration im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle (U-Test nach Mann-Withney, $p<0,05$). Im unteren Teil der Abbildung sind die Befunde einer organischen Spurenanalyse der Wasserproben auf endokrin wirksame Substanzen nach On-line-Silylierung im GC-MS-MS (Methode nach Holtey-Weber et al. 1999) dargestellt. Bei den grau hinterlegten Proben konnten Konzentration ermittelt werden, die mindestens viermal höher als der Blindwert (Leitungswasser Heidelberg) waren. Die Nachweisgrenzen betrugen für Estron 0,25 ng/L; für Diethylstilbestrol Isomer 2, Androsteron, Estradiol und Estriol 0,5 ng/L; für Bisphenol A und Hexestrol 1 ng/L; für technisches Octylphenol, Isomer 1& 2 und Diethylstilbestrol Isomer 1 2,5 ng/L; für technisches Nonylphenol 4 ng/L; für Mestranol, 2-Hydroxyestron und Ethinylestradiol 5 ng/L. Datengrundlage: Siebert (1999), Holtey-Weber (2001). Modifiziert nach Hollert et al. (1999).

Zahlreiche untersuchte Oberflächenextrakte besaßen eine endokrine Wirksamkeit vergleichbar der mitgeführten Positivkontrolle von 1 nM 17ß-Estradiol, die einer Konzentration von 270 ng/L im Testansatz entspricht. Berücksichtigt man die dreißigfache Aufkonzentrierung der Wasserextrakte und nimmt als Wiederfindungsrate des XAD-Harzes 80 % (vgl. Zietz & Pfeifer 2000) an, kann für das native Oberflächenwasser des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung eine 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentration von 26,7 ng/L (20,9 ng/L für Fisch 2) für die gelösten Wasserinhaltsstoffe, im Vergleich zu unter 0,1 ng/L für die Referenz Forellenbach 2 berechnet werden (Abb. 4.48). Auch diese Äquivalentkonzentration dürfte das endokrinen Belastungspotenzial der Wasserprobe unterbewerten, da partikulär gebundene endokrine Schadstoffe durch die Glasfaserfiltration zuvor abgetrennt und daher im Biotest nicht erfasst wurden. Gerade für die etwas unpolareren endokrinen Schadstoffe, wie etwa die Phtalate und die Alkylphenole, ist anzunehmen, dass ein erheblicher Anteil partikulär gebunden vorliegen dürfte (Bätscher et al. 1999, Khim et al. 1999c, Servos 1999). An MCF-7-ERE-*luc*-Zellen konnte gezeigt werden, dass Schwebstoffe aus dem Abfluss einer Zellstofffabrik in Finnland eine vergleichbare endokrine Wirksamkeit besaßen wie die gelösten Wasserinhaltsstoffe (Koistinen et al. 1998).

Der Einfluss der Kläranlage Eppingen auf die endokrine Belastungssituation der Elsenz kann durch den direkten Vergleich der Vitellogenin-Induktion durch die XAD-Extrakte der Standorte Elsenz 1 und 2 ermittelt werden, da zwischen den beiden Probennahmestandorten keine weiteren Einleitungen erfolgen und die Oberflächenwasserproben im kurzen Zeitabstand entnommen wurden. Eine Berechnung der 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen ergab bei einer konservativen Berechnung (Daten des empfindlicheren Fisches) eine Zunahme von 3,8 auf 20,9 ng/L für die nativen Wasserproben, gemessen nicht etwa direkt nach der Kläranlageneinleitung, sondern etwa 100 m stromabwärts (Abb. 4.48). Dieser Befund dokumentiert, dass bei Fließgewässern kleiner und mittlerer Größe aus Kläranlageneinleitungen drastische Belastungen des gesamten Vorfluters resultieren können (Körner et al. 2000).

Bei einer Untersuchung von 66 filtrierten Abwasserproben von Kläranlagen aus dem Berner Mittelland (Schweiz) konnten mit dem Dot-Blot-Assay vergleichbare, zum Teil aber auch wesentlich höhere endokrine Wirksamkeiten ermittelt werden (Hollert et al. 2000c, e, Pawlowski et al. 2000). Für einzelne Abwasserproben ließen sich im Dot-Blot-Assay 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen von über 95 ng/L (!) nachweisen. Abb. 4.43 verdeutlicht, dass nicht nur für die Wasserextrakte nach Kläranlageneinleitungen (Elsenz 2, Forellenbach 1) sondern auch für das Oberflächenwasser des Neckars (Eberbach 1) ein E2-Äquivalentfaktor über 12 ermittelt werden konnte, der einer 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentration von 13,7 ng/L für das native Wasser entspricht.

Zur Überprüfung der hier durchgeführten Berechnungen kann auf Basis der 100 pM E2-Äquivalentfaktoren aus dem Bioassay die 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentration der mitgeführten Positivkontrolle 1 nM E2 (=270 ng/L) berechnet werden. Eine solche Berechnung ergab 347 ng/L für den Fisch 1 und 303 ng/L für den Fisch 2, so dass von einer hohen Reproduzierbarkeit der Methode und – bei den eingesetzten Fischen – von einer relativ linearen Zunahme der E2-Äquivalentfaktoren und –konzentrationen im Konzentrationsbereich von 100 pM bis 1 nM 17ß-Estradiol ausgegangen werden kann (vgl. auch Islinger et al. 1999b). Die geringe endokrine Aktivität der Blindproben (XAD-Extrakt aus 20 L Leitungswasser des Hygiene-Institutes, Heidelberg) zeigt, dass aus der Aufarbeitung der Proben im Labor und speziell aus der Verwendung eines XAD-Harzes keine endokrine Wirksamkeit im Dot-Blot-Assay resultierte.

Vergleich Bio-TEQs versus Chem-TEQs. Analog zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit kann mit Hilfe des Toxicity equivalency factor-Konzeptes (TEF, Van den Berg et al. 1998) versucht werden, den Anteil der chemisch-analytisch gemessenen Substanzen an der gesamten xenoöstrogenen Wirksamkeit zu berechnen. Die TEFs wurden konservativ aus Literaturdaten errechnet, d.h. wenn keine substanzspezifischen Daten aus dem eigenen Testsystem zur Verfügung standen, wurde die stärkste bekannte Wirksamkeit aus anderen *In vitro*-Bioassays zu Grunde gelegt. Die TEFs wurden auf die LOEC für

17ß-Estradiol im jeweiligen Testsystem bezogen. Im Vergleich zu den detaillierten Datengrundlagen zur Berechnung von TCDD-TEFs bei dioxin-ähnlicher Wirkung steht die Entwicklung des TEF-Konzeptes bei endokrinen Substanzen noch am Anfang, so dass die erhaltenen Daten mi Vorsicht zu interpretieren sind und eher einen semiquantitativen Charakter besitzen. Die LOEC für 17ß-Estradiol betrug im nicht-radioaktiven Dot/Blot-RNAse-Protection-Assay $1x10^{-9}$ M (=1) (Islinger et al. 1999b). Als TEFs für andere endokrin wirksame Substanzen ergaben sich im Einzelnen: Ethinylestradiol 1,3 (Pawlowski 1998), Estron $1x10^{-2}$ (Soto et al. 1995), op´-DDT $2x10^{-3}$ (Wetterauer 2001), Octylphenol $1x10^{-3}$ (Bätscher et al. 1999, Soto et al. 1995), Nonylphenol, Bisphenol A $1x10^{-4}$ (Islinger et al. 1999b), PCBs $1x10^{-5}$ (Petit et al. 1997), Benzylbutylphthalat $5x10^{-6}$ (Pawlowski 1998), Atrazin $2x10^{-6}$ (Petit et al. 1997), Benzylbutylphthalat und Diethylhexylphthalat $1x10^{-6}$ (Petit et al. 1997).
Eine Gegenüberstellung der auf 17ß-Estradiol bezogenen endokrinen Aktivitäten im Biotest und der chemisch analytisch ermittelten TEQs zeigte mit Korrelationskoeffizienten von 0,85 (Pearson) und 0,82 (Spearman) eine sehr gute Korrelation zwischen den Befunden (Abb. 4.48), so dass sowohl mit der chemischen Analytik als auch dem Bioassay das gleiche Ranking der Proben bezüglich Ihres endokrinen Schädigungspotenzials erreicht wurde. Dennoch konnten bei den meisten Proben weniger als 1 % und maximal 14 % der endokrinen Aktivität mit Hilfe der chemischen Analysen erklärt werden. Würde man bei der Berechnung der Chem-TEQs für die Steroide, die eine starke endokrine Aktivität (TEFs von 1,3 bis 10^{-2}) besitzen, die Nachweisgrenzen der chemischen Analysen von Hol-

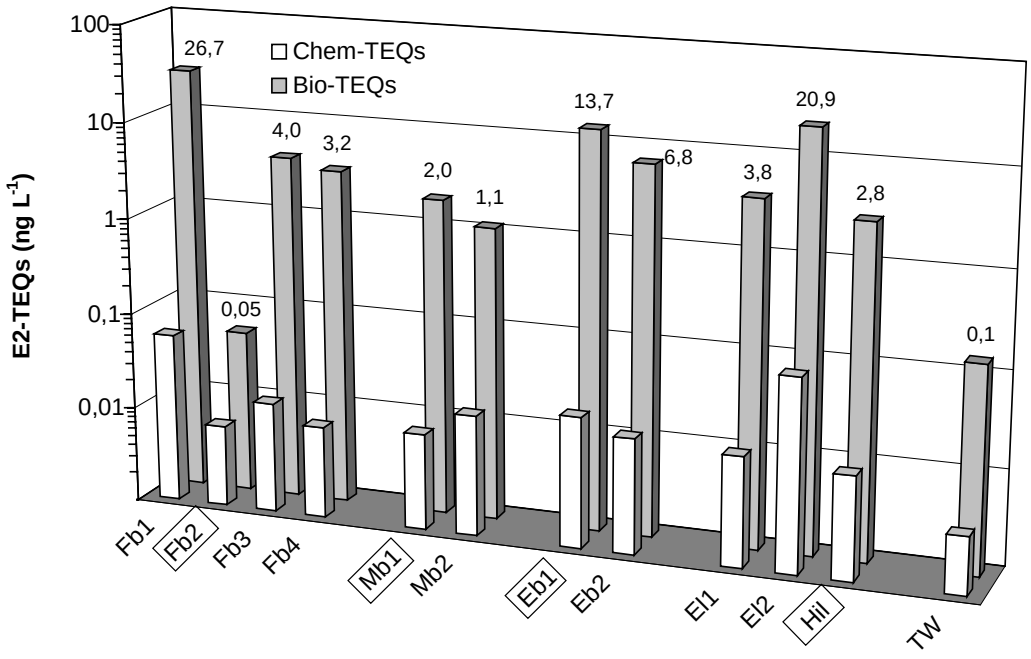


Abb. 4.48. Vergleich der endokrinen Wirksamkeit von XAD-Oberflächenwasserextrakten der Triade im Dot-Blot-Assay (Bio-TEQs), dargestellt als 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen in ng/L für die nativen Wasserproben, und der chemisch ermittelten 17ß-Estradiol-TEQs (Chem-TEQs). Für die Berechnungen der Bio-TEQs wurden die Vitellogenin-mRNA-Gehalte aus Hepatocyten des empfindlicher reagierenden Fisches 1 zugrunde gelegt. Als Datengrundlage für die Berechnung der chemischen TEQs dienten Analysenergebnisse von Herrn Holtey-Weber (Hygiene-Institut Bonn) für die nativen Wasserproben. Die Chem-TEQs ergaben sich aus der Summe der Konzentrationen endokrin wirksamer Schadstoffe multipliziert mit der auf 17ß-Estradiol bezogenen östrogenen Potenz der Substanzen (TEF). Sie stellen den Anteil der nachgewiesenen endokrinen Wirksamkeit dar, der mit den Befunden aus den chemischen Analysen erklärt werden kann. Die Referenzstandorte der Triade sind markiert. TW: Blindprobe aus Leitungswasser des Hygiene-Institutes der Universität Heidelberg.

tey-Weber (2001) zugrunde legen, könnten maximal 14 % der endokrinen Aktivität der stark belasteten Standorte nach den Kläranlagen und der Flachwasserzone erklärt werden, dafür würden aber die Chem-TEQs für den gering belasteten Referenzstandort (Forellenbach 2) und die Blindprobe ein Vielfaches der tatsächlichen biologischen Wirksamkeit (Bio-TEQ) betragen. Dieser Befund zeigt, dass selbst bei umfassenden chemischen Analysen nur Teile der tatsächlichen endokrinen Wirksamkeit (ermittelt durch biologische Wirktests) vorausgesagt werden können und daher Bioassays für die Bewertung des endokrinen Schädigungspotenzials von Umweltproben unbedingt notwendig sind (Ankley et al. 1998, Islinger et al. 1999b, Lutz & Kloas 1999, Matthiessen & Sumpter 1998). Die Befunde zeigen weiterhin, dass bei den *gelösten* Wasserinhaltsstoffen durch die relativ hohen Konzentrationen von Pestiziden, Alkylphenolen, Bisphenol A, Phtalaten und PCBs nur ein Bruchteil der tatsächlichen endokrinen Aktivität im Bioassay erklärt werden konnte. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen chemischer Analytik und Bioassay könnte weiterhin in einer additiven oder möglichen synergistischen Wirkung der östrogenen Substanzen liegen (Hilscherova et al. 2000). Nicht identifizierte bzw. quantifizierte Steroide und ihre Abbauprodukte könnten aufgrund Ihrer hohen TEF einen beträchtlichen Anteil an der endokrinen Aktivität der untersuchten Wasserproben besitzen. Kritisch sei angemerkt, dass von Holtey-Weber (2001) nur die freien Steroide nachgewiesen wurden. Es ist aber bekannt, dass natürliche und synthetische Östrogene wie beispielsweise 17α-Ethinylestradiol und Mestranol aus Kontrazeptiva und Hormonbehandlungen überwiegend als Hydroxy-Metaboliten oder in Form von Konjungaten (Glukuroniden, Sulfaten) ausgeschieden werden (Bätscher et al. 1999, Gülden et al. 1997). Während sich die Konjungate aufgrund der Aufkonzentrierungsmethode nicht erfassen ließen, konnten die Konzentrationen von 2-Hydroxyestron aufgrund eines Störpeaks weder im GC/MS noch im GC/MS-MS erfasst werden (Holtey-Weber 2001).

Eine chemisch-analytische Untersuchung von 116 deutschen Oberflächenwasserproben und 53 Abwasserproben durch das Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (Schmallenberg) hat insgesamt sehr gute Übereinstimmungen mit den Analysen von Holtey-Weber (2001) gezeigt. In den meisten Fällen (80-97 % aller Proben) wurden die Östrogene Ethinylestradiol, Mestranol, Estron und Estriol unter der Nachweisgrenze von jeweils 1 ng/L detektiert (Küchler et al. 2001, Wenzel et al. 1998). Für einige Proben ließen sich jedoch hohe Konzentrationen der Steroide nachweisen: Estradiol konnte zum Beispiel in 6 Oberflächenproben mit einem Median von 1,9 ng/l und einem Maximum von 29,1 ng/L nachgewiesen werden, Ethinylestradiol in 7 Oberflächenproben mit 3,4 ng/L (Median) und 42,9 ng/L (Maximum). Sitosterol ließ sich in fast allen untersuchten Proben in Konzentrationen bis zu 1405 ng/L (Oberflächenwasser, Median 319 ng/L) und bis zu 7105 ng/L (Abwasserproben, Median 590 ng/L) detektieren. Auch die von Wenzel ermittelten Konzentrationen der Chemikalien Nonylphenol, Octylphenol und Bisphenol A (persönliche Mitteilung, Frau Dr. Wenzel) stimmten gut mit den Messungen von Holtey-Weber (2001) überein.

Im Gegensatz zur dioxin-ähnlichen Aktivität gibt es für endokrin wirksame Schadstoffe bisher nur wenige Arbeiten, die sich mit der Ermittlung des Anteils bestimmter chemisch quantifizierter Substanzen an der Summe der Effekte aus den Bioassays beschäftigten. Analog zu dieser Studie konnten für die von der Fraunhofer-Gesellschaft untersuchten Oberflächenwasser- und Abwasserproben im Hefe-Östrogenrezeptor-Assay zum Teil endokrine Belastungen mit Estradiol-Äquvalenten gefunden werden, die deutlich über den Analysenwerten lagen (persönliche Mitteilung, Frau Dr. Wenzel). Durrer (1999) untersuchte die endokrine Aktivität von Flüssig-Flüssig-Extrakten, die aus Sammelproben verschiedener Vor- und Nachklärbecken von 8 Schweizer Abwassereinigungsanlagen hergestellt wurden, mittels des Parameters Zellproliferation im E-Screen-Assay und immunoradiometrische Bestimmung des östrogen induzierten Proteins pS2 mit der transformierten Zelllinie MCF7-BUS. Dabei konnte er bei allen untersuchten Proben eine endokrine Aktivität feststellen, die bei der Zellproliferationsrate von 19 % bis zu 64 % der mitgeführten Positivkontrolle 5 nM 17 ß-Estradiol reichte. Eine chemische Analyse der stark endokrin wirksamen Abwasserprobe der Kläranlage Bühl durch die EAWAG ergab eine Nonylphenolkonzentration von 2 µg/L, so dass etwa 17 % des östrogenen

Effektes des Wasserextraktes auf 4-Nonylphenol zurückgeführt werden konnte (Durrer 1999). Am Beispiel einer süddeutschen kommunalen Kläranlage konnte gezeigt werden, dass die endokrine Aktivität von Wasserproben im E-Screen-Assay durch die Abwasserbehandlung um etwa 90 % reduziert wurde und dass neun untersuchte endokrin wirksame Phenolderivate zwischen 0,7 und 4,3 % der endokrinen Aktivität des Kläranlagenauslaufes bewirkten (Körner et al. 2000).
Bioassay-dirigierte Untersuchungen von Abwasserproben kommunaler Kläranlagen in Großbritannien hinsichtlich östrogen wirksamer Substanzen zeigten das Auftreten und die endokrine Wirksamkeit der Hormone 17ß-Estradiol und Estron in allen untersuchten Proben (Desbrow et al. 1998). Ihre Konzentrationen lagen zwischen 1 ng/L und 50 bzw. 80 ng/L. Des weiteren wurde an einigen Standorten Ethinylestradiol als weiteres starkes Östrogen in Konzentrationen von 0,2 bis 7,0 ng/L gefunden.

Acetonische Extrakte
Abb. 4.46 zeigt die endokrine Wirksamkeit von acetonischen Extrakten der Sedimentbewertungstriade, die aufgrund der hohen Cytotoxizität jeweils als NOEC der akuten Zelltests mit RTG-2-Zellen in Konzentrationen von 2,6 bis zu 36,5 mg Sedimentäquivalent pro ml Testansatz im Dot-Blot-Assay untersucht wurden. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Ansätzen mit Hepatocyten aus zwei Spenderfischen untersucht. Obwohl die Hepatocyten schon ab einer Konzentration der Positivkontrolle von 10 pM 17ß-Estradiol Vitellogenin-mRNA exprimierten, konnte nur für das Extrakt des hinteren Abschnittes der Flachwasserzone eine signifikant erhöhte mRNA-Induktion ermittelt werden. Die geringe endokrine Wirksamkeit der acetonischen Extrakte überraschte aufgrund der teilweise stark erhöhten Konzentrationen bei den chemischen Analysen (Abschnitt 4.5.6). Als mögliche Gründe für die geringe endokrine Wirksamkeit der Sedimentextrakte im Dot-Blot-Assay kommen (1) eine Maskierung der endokrinen Aktivität durch cytotoxische Effekte (Beck & Karbe 2000, Hilscherova et al. 2000, Koistinen et al. 1998), (2) eine unzureichende Effizienz des verwendeten Lösungsmittels Aceton (Beck & Karbe 2000) oder (3) eine antiöstrogene Wirksamkeit bestimmter Sedimentinhaltsstoffe (Arcaro et al. 1999, Gagne et al. 1999) in Frage.
Da im Sediment des Forellenbaches deutlich erhöhte Konzentrationen endokrin wirksamer Substanzen mit chemischer Analytik nachgewiesen werden konnten (Abschnitt 4.5.6), wurde dieses Sediment für eine weitere Methodenstudie mit dem Dot-Blot-Assay verwendet.

Bioassay-dirigierte Fraktionierung
Zur Überprüfung einer eventuellen Maskierung der endokrinen Wirksamkeit durch cytotoxische Effekte und zu einer näheren Identifizierung der endokrinen Inhaltsstoffe wurden die Fraktionen einer Flüssig/Flüssig-Fraktionierung nach pH-Wert (aus einem acetonischen Extrakt, Abschnitt 2.2.5) und die Fraktionen F3, F4ac, F4alk und FΣ einer säulenchromatographischen Auftrennung eines Gesamtextraktes des Sedimentes Fb1 (aus einem Dichlormethan-Extrakt, Abschnitt 2.2.6) im Dot-Blot-Assay untersucht (Wetterauer 2001). Während für die neutralen, stark und schwach sauren sowie basischen Fraktionen der Flüssig/Flüssig-Fraktionierung sowie für die säulen-chromatographischen Fraktionen F3, F4ac, F4alk keine endokrine Wirksamkeit im Dot-Blot-Assay nachgewiesen werden konnte, bewirkte die Summe aller Alumina-Fraktionen (FΣ) eine deutliche mRNA-Induktion (Wetterauer 2001). Die Probe FΣ zeigte in zwei unabhängigen Ansätzen 31 % und 63 % des endokrinen Effektes der mitgeführten Positivkontrolle von 1nM 17ß-Estradiol, so dass eine 17ß-Estradioläquivalentkonzentration von 84 und 173 ng/L für den Testansatz berechnet werden konnte. Da die Fraktion aufgrund ihrer Cytotoxizität erst mit einer 1:200-Verdünnung untersucht werden konnte, ergab sich eine 17ß-Estradioläquivalentkonzentration von 16,7 bzw. 34,5 µg/L (!) für das unverdünnte Extrakt (Konzentration von 10 g Trockengewichts-Sedimentäquivalente pro ml DMSO).
Diese Teilstudie konnte somit die Hypothese bestätigen, dass cytotoxische Inhaltsstoffe eine endokrine Aktivität maskieren können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Flüssig/Flüssig-Fraktionierung nach pH-Wert (aus einem acetonischen Extrakt) nicht geeignet ist, die cytotoxischen von den

endokrinen Inhaltsstoffen abzutrennen. Im Gegensatz dazu eignete sich eine säulenchromatographische Auftrennung eines Dichlormethan-Extraktes in Kombination mit dem Dot-Blot-Assay, um die endokrine Belastung nachzuweisen. Da nur die Subfraktionen F3, F4ac, F4alk untersucht wurden und diese keine endokrine Wirkung zeigten, sind die experimentell nicht untersuchten Fraktionen F1 (Aliphaten) und F2 (unpolare Aromaten) als Hauptträger für die endokrine Wirkung des Forellenbachsedimentes zu vermuten.

Verwendung des Lösungsmittels Methanol. Die Arbeitshypothese einer unzureichenden Extraktionseffizienz des Lösungsmittels Aceton für endokrine *In vitro*-Untersuchungen wurde in einer weiteren Teilstudie untersucht (Wetterauer 2001). Dazu wurden Soxhlet-Extrakte des Sedimentes Forellenbach 1 mit den Lösungsmitteln Aceton und Methanol hergestellt und in einer Konzentration von 50 mg Sedimentrockengewicht-Äquivalenten pro ml Testansatz im Dot-Blot-Assay untersucht. Während für das acetonische Extrakt wiederholt keine endokrine Wirkung nachgewiesen werden konnte,

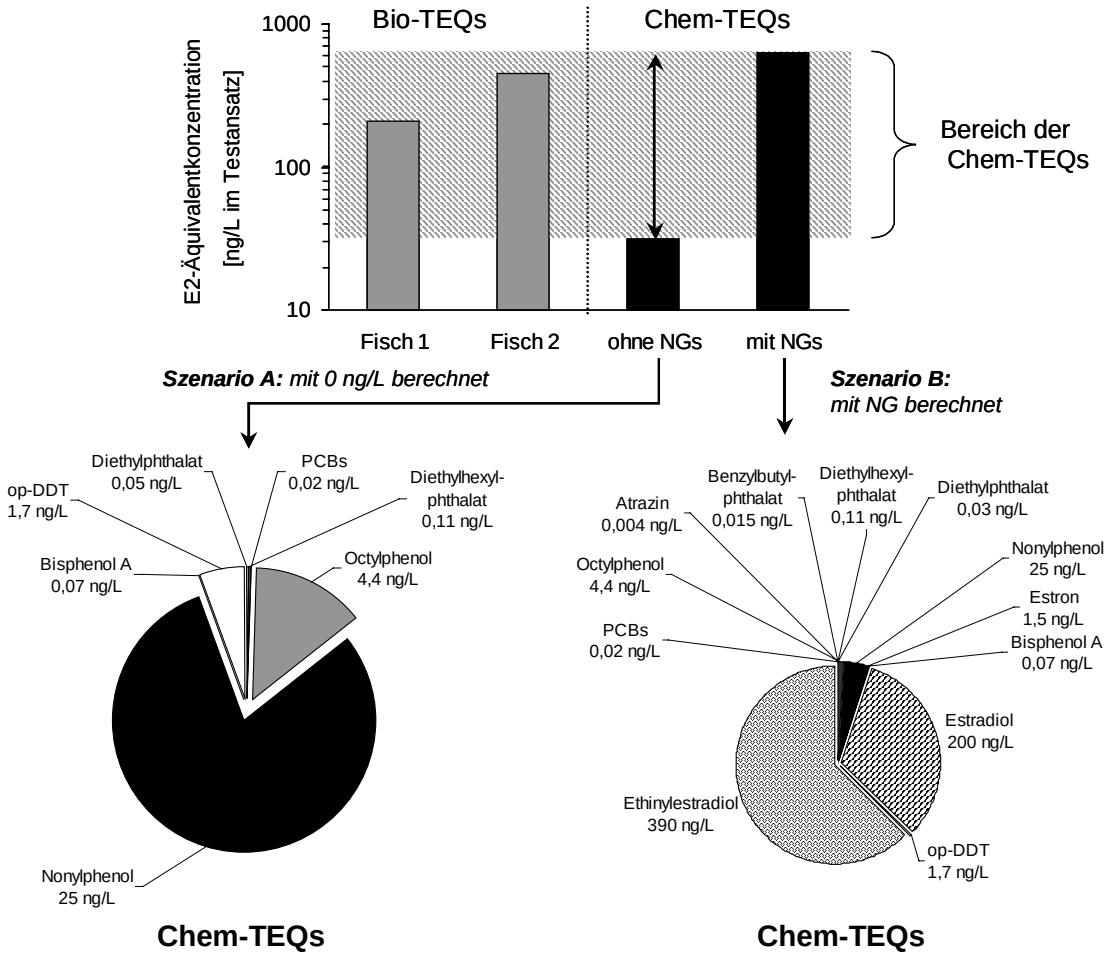


Abb. 4.49. Vergleich der endokrinen Wirksamkeit (Bio-TEQs) eines methanolischen Sedimentextraktes des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung (Fb1) im Dot-Blot-Assay, dargestellt als 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen in ng/L für den Testansatz, und der chemisch ermittelten TEQs (Chem-TEQs). Die Chem-TEQs wurden als ng 17ß-Estradioläquivalente pro ml Testansatz im Dot-Blot angegeben (1:400-Verdünnung des Extraktes), um einen direkten Vergleich mit den Bio-TEQs zu ermöglichen. Für die Berechnungen der Bio-TEQs wurden die Vitellogenin-mRNA-Gehalte aus Hepatocyten zweier Fische zugrunde gelegt (Wetterauer 2001). Datengrundlage für die Berechnung der chemischen TEQs: Holtey-Weber (2001) und Dürr (unveröffentlicht; für die Summe der PCBs und *op´*-DDT). Die Chem-TEQs stellen den Anteil der nachgewiesenen endokrinen Wirksamkeit dar, der mit den Befunden aus den chemischen Analysen erklärt werden kann. Die Chem-TEQs wurden für das Szenario A mit Konzentrationen von 0 ng/L für Substanzen unter der Nachweisgrenze (NG) und bei Szenario B (Worst-Case) mit den NGs (Tab. 4.8) berechnet. Im unteren Teil der Abbildung ist der relative Anteil und der Betrag der nachgewiesenen Substanzen an der Summe der Chem-TEQs dargestellt.

induzierte das methanolische Extrakt bei Hepatocytenkulturen aus zwei unabhängigen Testfischen (1:400-Verdünnung) mit 210 und 456 ng 17ß-Estradioläquivalenten pro L Testmedium (Abb. 4.49) zudem stärker Vitellogenin-mRNA als die Summe FΣ der Alumina-Fraktionierung. Somit scheint Methanol als Lösungsmittel für endokrine Bioassays eine größere Extraktionseffizienz als Aceton und Dichlormethan zu besitzen (Beck & Karbe 2000, Beck et al. 1999). Die dokumentierten Effekte könnten nicht nur durch die absolute Extraktionseffizienz bezüglich endokrin wirksamer Substanzen, sondern auch durch das relative Verhältnis der Extraktionseffizienzen der cytotoxischen zu den endokrin wirksamen Substanzen begründet sein.

Die Hypothese einer Maskierung der endokrinen Aktivität organischer Sedimentextrakte bei *In vitro*-Bioassays durch eine cytotoxische Wirkung der Sedimentinhaltsstoffe wurde inzwischen auch durch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Beck & Karbe 2000, Hilscherova et al. 2000, Khim et al. 1999b, Koistinen et al. 1998). Es konnte analog zu den eigenen Befunden im Dot-Blot mit dem Lösungsmittel Methanol auch mit der Zelllinie MCF7-luc gezeigt werden, dass durch die Verwendung des polareren Extraktionsgemisches Dichlormethan/Methanol das endokrine Schädigungspotenzial besser abgebildet werden kann (Beck & Karbe 2000). Dies kann einerseits mit einer geringeren cytotoxischen Wirksamkeit polarerer Extrakte erklärt werden (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a), aber auch die schlechtere Effizienz polarerer Lösungsmittel für die Extraktion von PAHs könnte von Bedeutung sein, da für diese eine antiöstrogene Wirksamkeit bekannt ist (Arcaro et al. 1999, Gagne et al. 1999), die zu einer kompetitiven Konkurrenz zwischen östrogene und antiöstrogene Sedimentinhaltsstoffen führt (Gagne et al. 1999). Erste Untersuchungen zeigen, dass sich die Entfernung elementaren Schwefels durch eine Behandlung mit Kupfer (Khim et al. 1999b) oder Tetrabutylammoniumsulfid (Legler 2001) mit einer anschließenden Aufreinigung und Fraktionierung mit Florisil-Säulenchromatographie (Khim et al. 1999c) oder Silicagel (Johansson 1999) eignet, um die organischen Extrakte aufzubereiten.

Vergleich von Bio- und Chem-TEQs. Abb. 4.49 zeigt einen Vergleich der Bio-TEQs des methanolischen Extraktes vom Sediment Forellenbach 1 mit den Chem-TEQs aus der chemischen Analytik endokrin wirksamer Substanzen (Datengrundlage: Holtey-Weber 200; Summe der PCBs und *op´*-DDT: Dürr, unveröffentlicht). Die Daten aus Biotest und chemischer Analytik wurden jeweils in ng/L als 17ß-Estradioläquivalentkonzentrationen im Testmedium des Dot-Blots angegeben. Während bei den Bio-TEQs der Unterschied zwischen den 17ß-Estradioläquivalentkonzentrationen auf unterschiedliche Sensitivitäten der Spenderfische zurückzuführen ist, konnten für die Chem-TEQs, je nach Modus der Berechnung, erhebliche Unterschiede ermittelt werden. Das optimistische und sicherlich das Schadstoffpotenzial unterbewertende Szenario A „Alle endokrin wirksamen Substanzen, die unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 4.8) detektiert wurden, sind in der Probe nicht existent“, führt zu den links dargestellten Chem-TEQs („ohne NGs“). Im Gegensatz dazu stellt „mit NGs“ ein Worst-case-Szenario (Szenario B) dar, bei dem davon ausgegangen wurde, dass alle Substanzen, die unter der Nachweisgrenze detektiert wurden, in einer Konzentration vorkommen, die asymptotisch gegen die Nachweisgrenze strebt. Der reale Wert der Chem-TEQs liegt *a priori* zwischen diesen beiden Extremen. Dieser Befund verdeutlicht, dass aufgrund von hohen Nachweisgrenzen insbesondere für Steroide (hohe TEFs), eine Abschätzung der Chem-TEQs mit großen Ungenauigkeiten verbunden ist: Selbst die Inter-Assay-Schwankungen des Dot-Blots zwischen verschiedenen Spenderfischen (Faktor 2-2,5) relativieren sich in Anbetracht der großen möglichen Spannbreite der realen Chem-TEQs (Faktor 20).

Abb. 4.49 zeigt weiterhin die relative Verteilungen und die Beiträge der einzelnen endokrin wirkenden Substanzen an der Summe der Chem-TEQs: Bei Annahme des Szenarios A konnte nur ein Anteil von durchschnittlich 9,4 % (6,9 % bei Fisch 1 bzw. 14,9 % bei Fisch 2) der biologischen Wirksamkeit durch die chemisch (über der Nachweisgrenze) detektierten Substanzen erklärt werden. Insbesondere für Nonylphenol konnte ein Beitrag von 25 ng/L E2-Äquivalenten (EE) an der tatsächlichen biologischen Wirkung (Bio-TEQs) von durchschnittlich 333 ng/L EE berechnet werden. Während die

nachgewiesenen Konzentrationen an Octylphenol (4,4 ng/L EE) und *op´*-DDT (1,7 ng/L EE) noch einen geringen Einfluss auf die Höhe des Bio-TEQs besitzen, geht von den Phtalaten, die in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Tab. 4.8), nur ein minimaler Beitrag (jeweils unter 0,1 ng/L EE) zur biologischen Wirksamkeit aus. Der hier nachgewiesene deutliche Beitrag von Alkylphenolen (29,4 ng/L = 8,8 %) an der gesamten endokrinen Wirksamkeit von sedimentgebundenen Inhaltsstoffen im Bioassay stimmt gut mit den Befunden einer Bioassay-dirigierten Fraktionierung und Massenbilanzierung an Sedimenten der Masan-Bay und des Lake Shihwa in Korea durch Khim et al. (1999a, b, c) überein, die weniger als 20 % der Wirksamkeit verschiedener Fraktionen in MVLN-Zellen durch Alkylphenole erklären konnten. Dieser Befund verdeutlicht, dass Alkylphenole bei den sedimentassoziierten endokrinen Schadstoffen einen größeren Beitrag zur endokrinen Wirksamkeit zu liefern scheinen als bei den untersuchten Wasserproben.
Bei Annahme des Szenarios B würde das tatsächliche endokrine Schädigungspotenzial aus den Bioassays mit 197 % (Fisch 1) und 137 % (Fisch 2) der nachgewiesenen Bio-TEQs überschätzt, so dass zumindestens einige der analysierte Steroide deutlich unterhalb der Nachweisgrenzen vorzukommen scheinen. Dennoch zeigt Szenario B, dass Steroide selbst knapp unterhalb der Nachweisgrenze einen großen Beitrag zur endokrinen Wirksamkeit von Sedimentextrakten besitzen können: Würden 17ß-Estradiol und Ethinylestradiol in die Massen-Bilanzierung mit ihren Nachweisgrenzen eingesetzt, wären sie für 32 % bzw. 62,6 % der Chem-TEQs verantwortlich und würden bereits eine höhere Vitellogenin-mRNA-Induktion als die biologisch nachgewiesene des Forellenbach-Extraktes bewirken.

Porenwasser

Die unfiltrierten Porenwasserproben der Sedimentbewertungstriade wurden im Dot-Blot-Assay mit den Hepatocyten eines Spenderfisches mit einer 48-stündigen Exposition untersucht, um eine mikrobielle Kontamination der Hepatocyten durch eine längere Expositionszeit der unsterilen Proben zu vermeiden. Da nur eine begrenzte Menge an Porenwasser zur Verfügung stand, musste auf eine Testwiederholung verzichtet werden, so dass die Befunde unter Vorbehalt zu interpretieren sind. Als Testkonzentrationen wurden 1:4-Verdünnungen und in einem Fall (durch eine höhere Cytotoxizität der Probe Fb3) eine 1:8-Verdünnung des nativen Porenwassers untersucht. Alle untersuchten Porenwässer führten im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Induktion (Abb. 4.50). Insgesamt reagierten die Hepatocyten des Spenderfisches unempfindlicher als bei den oben dargestellten Versuchen. Die niedrig dosierte Positivkontrolle von 100 pM E2 bewirkte zwar eine statistisch signifikante Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Induktion gegenüber der Kontrolle, bei Berechnung der Äquivalentkonzentrationen ergab sich aber auch für die Kontrolle eine rechnerische E2-Äquivalentkonzentration von 11 ng/L. Um das endokrine Schädigungspotenzial der Porenwässer nicht zu überschätzen, wurden daher die E2-Äquivalentkonzentrationen der Porenwässer um diesen Hintergrundwert bereinigt. Es konnten für die nativen Porenwasserproben

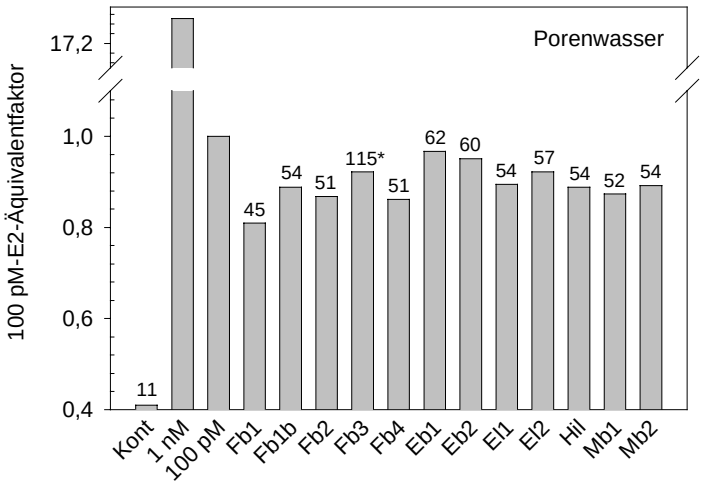


Abb. 4.50. Endokrine Belastung von Porenwässern der Sedimentbewertungstriade im Dot-Blot-Assay. Die Vitellogenin-mRNA-Induktion ist als Äquivalentfaktor der Positivkontrolle 100 pM 17ß-Estradiol dargestellt. Die Zahlenwerte entsprechen den auf das unverdünnte Porenwasser bezogenen 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen in ng/L. Zu ihrer Ermittlung wurde der Wert der Kontrolle jeweils subtrahiert. * Für das Porenwasser Fb3 ergab sich die höhere E2-Äquivalentkonzentration durch die stärkere Verdünnung im Bioassay.

dennoch 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen von 45 bis zu 115 ng/L berechnet werden. Somit konnte im Porenwasser der untersuchten Sedimente eine relative Aufkonzentrierung der endokrin wirksamen Substanzen im Vergleich zum Oberflächenwasser nachgewiesen werden. In Anbetracht der hohen Verfügbarkeit und der zum Teil direkten Exposition von Jugendstadien von Fischen in Sedimenten stimmen die ermittelten 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen bedenklich, da in *Life-Cycle*-Experimenten bereits ab Ethinylestradiol- und 17ß-Estradiol-Konzentrationen von 1 bis 100 ng/L bei *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* und *Oryzias latipes* eine Vitellogenin-Induktion *in vivo* aber auch Verschiebungen bei den Geschlechterverhältnissen nachgewiesen werden konnten (Islinger 2001, Bieberstein 2000, Knörr 2000, Routledge et al. 1998).

Zur ökologischen Relevanz dieser Befunde

Die Hypothese einer möglichen Beeinträchtigung des Fortpflanzungsverhaltens zahlreicher Spezies und insbesondere von Fischen durch endokrin wirksame Umweltschadstoffe wurde durch zahlreiche Studien überprüft (Übersichten bei Ankley et al. 1998, Bätscher et al. 1999, Gülden et al. 1997, Islinger 2001, Islinger et al. 1999a, Schrenk-Bergt & Steinberg 1999, Vos et al. 2000). Obgleich labornahe Studien das endokrine Potenzial zahlreicher Monosubstanzen bestätigen, und andere Studien eine enge Assoziation zwischen Reproduktions- und Entwicklungsstörungen und endokrinen Umweltschadstoffen im Freiland nachweisen konnten, stellt die Überprüfung und Abschätzung der ökologischen Relevanz der Befunde aus chemischer Analytik und Bioassays zur endokrinen Aktivität nach wie vor ein Problem dar (Arcand-Hoy & Benson 1998, Bätscher et al. 1999, Cooper & Kavlock 1997, Vos et al. 2000).

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass für die gelösten Wasserinhaltsstoffe, aber auch für das Sedimentporenwasser eine eindeutige endokrine Wirksamkeit mit dem Biomarker Vitellogenin-mRNA-Induktion *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Für die grundsätzliche Bewertung des endokrinen Potenzials von Xenobiotica in der Umwelt sind *In vivo*-Untersuchungen unerlässlich, da nur die Belastung eines intakten Organismus Aufschluss über Bioakkumulation, metabolische Umsetzung und Exkretion von Xenoöstrogenen geben kann (Islinger 2001). Ein Vergleich der Sensitivitäten der Vitellogenin-mRNA-Induktion im eingesetzten Testsystem zu *In vivo*-Untersuchungen und Schadstoffkonzentrationen in der Umwelt zeigte, dass die Induktion der Vitellogeninsynthese durchaus mit der Ausprägung von populationsrelevanten Schädigungen in Fischen korrelierbar erscheint (Islinger 2001). Während Nonylphenol in Regenbogenforelle, Zebrabärbling und Medaka in Konzentrationen zwischen 8,5 und 25 µg/L eine Vitellogenin-Induktion *in vivo* bewirkte, konnte die Entwicklung von Testis-Ova und ein Rückgang des Befruchtungserfolges bei Medaka bzw. Zebrabärbling ab einer Nonylphenolkonzentration von 10-20 µg/L nachgewiesen werden (Übersicht über die einzelnen Studien bei Islinger 2001, Knörr 2000, Bieberstein 2000). Im Gegensatz dazu konnte für das natürliche Östrogen 17ß-Estradiol ab 20 ng/L und für das synthetische 17α-Ethinylestradiol ab 2,5 ng/L eine Vitellogenin-Induktion beim Zebrabärbling *in vivo* nachgewiesen werden (Islinger 2001). Aufgrund dieser niedrigen LOEC aus *In vivo*-Untersuchungen kann insbesondere für die Steroide und ihre Metaboliten eine mögliche ökologische Relevanz bei den untersuchten Fließgewässern angenommen werden (Desbrow et al. 1998, Routledge et al. 1998).

Bjerselius et al. (1999) konnten in Laborversuchen mit Goldfischen zeigen, dass effektive Konzentrationen von 0,4 µg/L 17ß-Estradiol signifikante Veränderung des männlichen Reproduktionsverhaltens bewirkten. Weiterhin induzierte das Abwasser eines Kläranlagen-Auslaufes in Borås (Schweden), in dem bis zu 40 ng/L 17ß-Estradiol nachgewiesen werden konnte, gegenüber Kontrollwasser ebenfalls signifikante Verhaltensänderungen bei Goldfischen und Regenbogenforellen (Bjerselius et al. 2000). Für Verhaltensänderungen beim Reproduktionsverhalten männlicher Fische, die durch östrogen wirksame Stoffe verursacht werden, kann *a priori* eine Relevanz auf der Ebene der Population angenommen werden, da sich die statistische Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Reproduktion verringert (Bayley et al. 1999).

4.7.9 Dioxin-ähnliche Wirksamkeit

Der Biomarker EROD-Induktion (in embryonaler Organkultur mit Hühnerlebern) konnte als Nachweis für dioxin-ähnliche Wirksamkeit während zwei Forschungsaufenthalten in den Jahren 1999 und 2000 am Department of Environmental Toxicology der Universität Uppsala und an der Universität Örebro (Schweden) unter Anleitung von Herrn Dr. Magnus Engwall erlernt und an acetonischen Sedimentextrakten und Flüssig/Flüssig-Fraktionen der Triade durchgeführt werden.

EROD-Assay und berechnete Bio-TEQs

Für alle untersuchten Sedimentextrakte konnte eine EROD-Induktion im embryonalen Hühnerleber-Assay nachgewiesen werden, wobei große Unterschiede in der Stärke der EROD-Induktion auftraten. Abb. 4.51 zeigt die sigmoidale Dosis-Wirkungskurve für die Monosubstanz 2,3,7,8-TCDD, die als stärkster bekannter EROD-Induzierer bei der Untersuchung der Sedimentextrakte in einer Konzentration von $1x10^{-9}$ M als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Da die absolute EROD-Induktion zwischen verschiedenen Assays variieren kann, wurde für jedes Extrakt der EC_{25TCDD}-Wert ermittelt, der die Sedimentkonzentration angibt, bei der 25 % der maximal möglichen EROD-Induktion (durch die Positivkontrolle $1x10^{-9}$ M TCDD) erreicht wurde.

Für das Sediment nach der Kläranlageneinleitung am Forellenbach (Abb. 4.45) konnte mit einem EC_{25TCDD}-Wert von 0,2 mg Sedimentäquivalent pro ml Medium eine 50-fach stärkere EROD-Induktion im Vergleich zum Referenzstandort Forellenbach 2 (Fb2, 10 mg/ml) ermittelt werden. Während das Extrakt nach dem Zusammenfluss der zwei Fließgewässerabschnitte (Forellenbach 3, Fb3) eine vergleichbare dioxin-ähnliche Wirksamkeit wie der Forellenbach 1 besaß, konnte im Unterlauf eine weitgehende Regeneration (Forellenbach 4, Fb4) ermittelt werden.

Abb. 4.52 zeigt eine Übersicht über die EROD-Induktion von den anderen Fließgewässerstandorten aus dem Einzugsgebiet des Neckars. Die Dosis-Wirkungskurven im Elsenzgebiet zeigen, dass die Kläranlage Eppingen keinen Einfluss auf die (hohe) EROD-Aktivität der Sedimentextrakte hatte. Bei

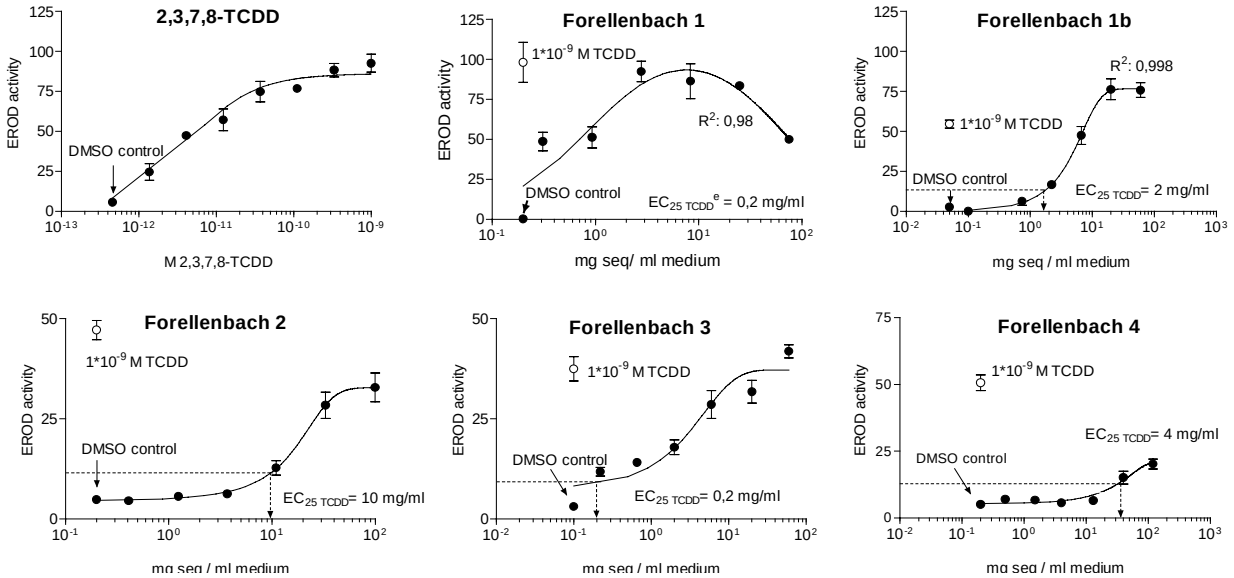


Abb. 4.51. Dosis-Wirkungskurven für die EROD-Induktion von 2,3,7,8-TCDD und acetonischer Sedimentextrakte des Forellenbaches in embryonaler Hühnerleberkultur *in vitro*. Die EROD-Aktivitäten sind angegeben als pmol x mg $Leber^{-1}$ x min^{-1} und bezogen auf Sedimentäquivalente (mg seq/ml medium: mg extrahiertes trockenes Sediment pro ml Testmedium). Der EC_{25TCDD} wurde berechnet als die Konzentration, die 25 % der maximalen EROD-Induktion durch 1 x 10^{-9} M TCDD bewirkte. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung aus 6 Lebern.

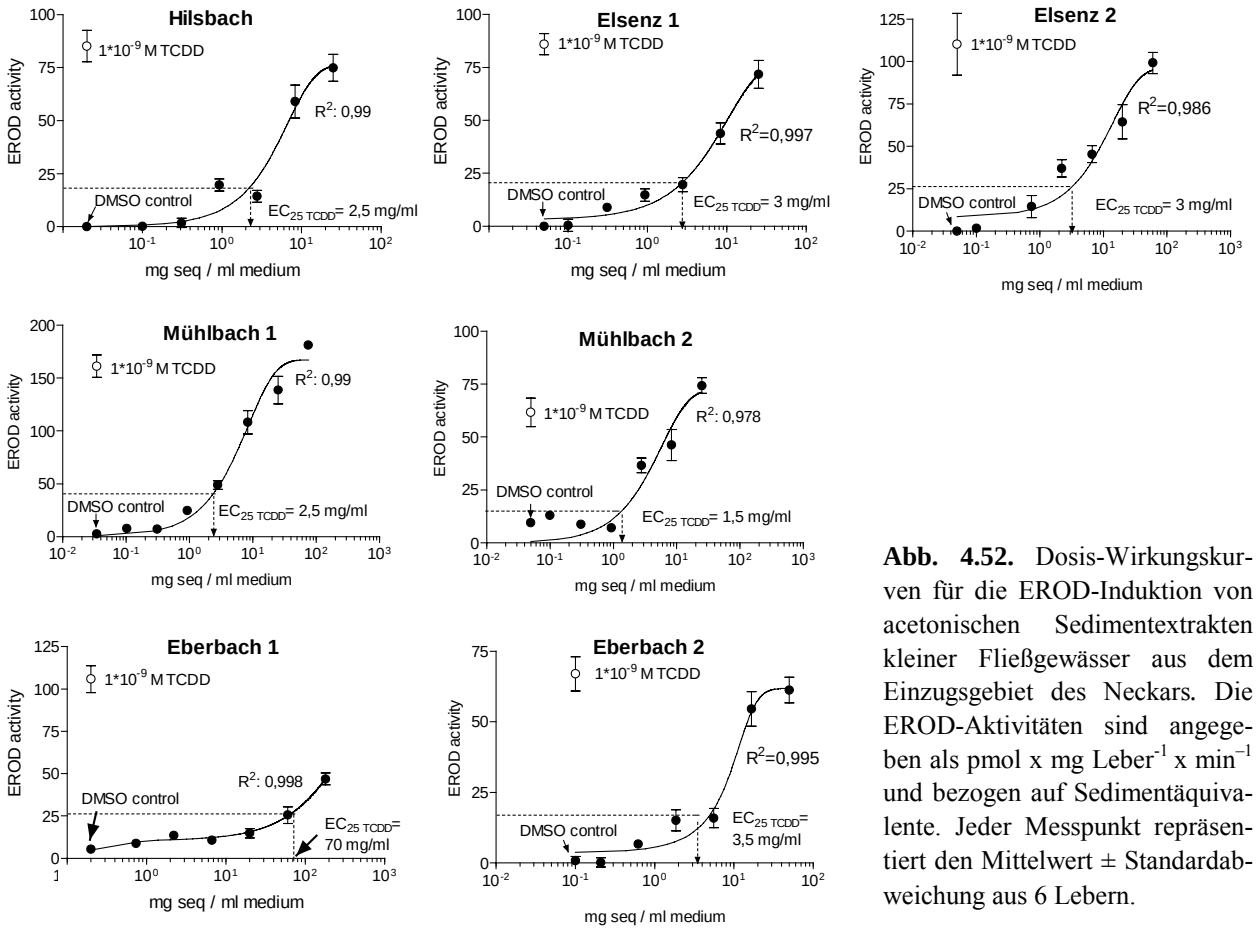


Abb. 4.52. Dosis-Wirkungskurven für die EROD-Induktion von acetonischen Sedimentextrakten kleiner Fließgewässer aus dem Einzugsgebiet des Neckars. Die EROD-Aktivitäten sind angegeben als pmol x mg Leber^{-1} x min^{-1} und bezogen auf Sedimentäquivalente. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung aus 6 Lebern.

der Flachwasserzone Eberbach konnte eine starke Zunahme der EROD-Induktion für das Sediment des temporär trockenfallenden Standortes (Eberbach 2) im Vergleich zur Referenz am Übergang zum Neckar (Eberbach 1) bestimmt werden.

Mit Hilfe des Toxicity equivalency factors-Konzeptes (TEF, Safe 1990, Van den Berg et al. 1998) wurde versucht, den Anteil der chemisch-analytisch gemessenen Substanzen (TEQ) an der gesamten dioxin-ähnlichen Wirksamkeit (Bio-TEQ) zu berechnen. Die Bio-TEQs wurden aus den EC_{25TCDD}-Werten nach Engwall et al. (1996) ermittelt und sind in Abb. 4.53 dargestellt. Die Konzentrationen sind auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff (o.c.) bezogen, da PCBs, PCDDs/Fs, PAHs und andere hydrophobe Verbindungen eng assoziiert mit dem Kohlenstoffanteil des Sedimentes vorkommen (Di Toro et al. 1991). Für die EROD-induzierenden Substanzen des Extraktes Forellenbach 1 konnten 930 ng Bio-TEQs/g organischen Kohlstoff ermittelt werden. Diese Konzentration war 310 mal höher als die Bio-TEQ-Konzentrationen des See Järnsjön im Südosten Schwedens (3 ng Bio-TEQs/g o.c.), der bezüglich dioxin-ähnlichen Substanzen einen Hot-Spot in Skandinavien darstellt. Die Hintergrundkonzentration in einem Referenzseensystem stromaufwärts des Järnsjön betrug 0,03 ng Bio-TEQs/g. o.c. (Engwall et al. 1996). Auch für die anderen Proben aus dem Einzugsgebiet des Neckars konnten im Vergleich zu schwedischen Sedimenten hohe Belastungen mit dioxin-ähnlichen Substanzen ermittelt werden.

PAHs und Bestimmung der Chem-TEQs

Die Konzentrationen von PAHs, PCBs und PCDDs/Fs sind in Tab 4.8 und Abb. 4.11-12 dargestellt. Um den Anteil der analysierten PAHs an der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit der Extrakte im Biotest zu bestimmen, wurden die EROD-Induktionen verschiedener PAHs in embryonalen Hühnerleber-Assay aus früheren Untersuchungen herangezogen (Engwall et al. 1999). Die EROD-Induktion dieser PAHs

betrug im Vergleich zu TCDD (= Toxicity equivalency factor, TEF) für Benzo(k)fluoranthen (B(k)F) 1.1 x 10^{-6}, Indeno(1,2,3-c,d)pyren 9.9 x 10^{-7}, Benzo(b)fluoranthen 5.5 x 10^{-7}, Benzo(a)pyren 2.1 x 10^{-7}, Benzo(g,h,i)perylen <7.5 x 10^{-8} und Fluoranthen <7.5 x 10^{-8} (Engwall et al. 1999). Um auch solche PAHs für die Berechnung der PAH-Toxizitätsäquivalente (PAH-TEQs) nutzen zu können, für die bisher noch keine TEFs existieren, wurde für die verbleibenden PAHs eine vergleichbare EROD-Induktion wie für Benzo(k)fluoranthen angenommen (Engwall et al. 1999). Frühere EROD-Untersuchungen mit embryonalen Hühnerleberkulturen zeigten, dass die meisten PAHs eine geringere EROD-Induktion als Benzo(k)fluoranthen bewirken (Brunstrom et al. 1995, Engwall et al. 1999). Die PAH-Toxizitätsäquivalente (PAH-TEQs) wurden berechnet, indem die chemisch analysierten Konzentrationen der PAHs mit den jeweiligen TEFs multipliziert und alle Einzelkonzentrationen zu PAH-TEQ summiert wurden. Die PCB-TEQs und PCDD/F-TEQs wurden analog zu den PAH-TEQs berechnet. Als TEFs wurden 0,11 für PCB #126 (Engwall et al. 1999), 0,01 für PCB #169 (Van den Berg et al. 1998), 0,0001 für die PCBs #114, #156 und 157 (Van den Berg et al. 1998), 0,0005 für PCB #77, 0,0003 für PCB #105, 0,00003 für PCB #118 (Engwall et al. 1999) und 0,00001 für die PCBs # 123, #167 und #189 (Van den Berg et al. 1998) eingesetzt. Analysierte PCBs, für die keine Wirkdaten zur Verfügung standen, wurden mit einem TEF von 0,0001 in die Berechnungen einbezogen. Für die Berechnung der PCDD/F-TEQs wurden die WHO-TEFs benutzt (Van den Berg et al. 1998).

In Abb. 4.53 ist ein Vergleich der EROD-Induktion im Bioassay (Bio-TEQs) und der jeweiligen Toxizitätsäquivalente der PAHs, PCDDs/Fs und PCBs dargestellt. Mit den analysierten PAHs, PCDDs/Fs und PCBs konnten zwischen 0,51 % und 107 % der tatsächlichen EROD-Induktion (Bio-TEQs) erklärt werden. Während die Summe der analysierten lipophilen Substanzen die dioxin-ähnliche Wirksamkeit des Extraktes Forellenbach 2 vollständig erklären, konnte für die Extrakte Fb1b, Mb2, Eb1 und El2 zwischen 16 und 22 % der biologischen Wirksamkeit und für alle anderen Extrakte weniger als 4 %

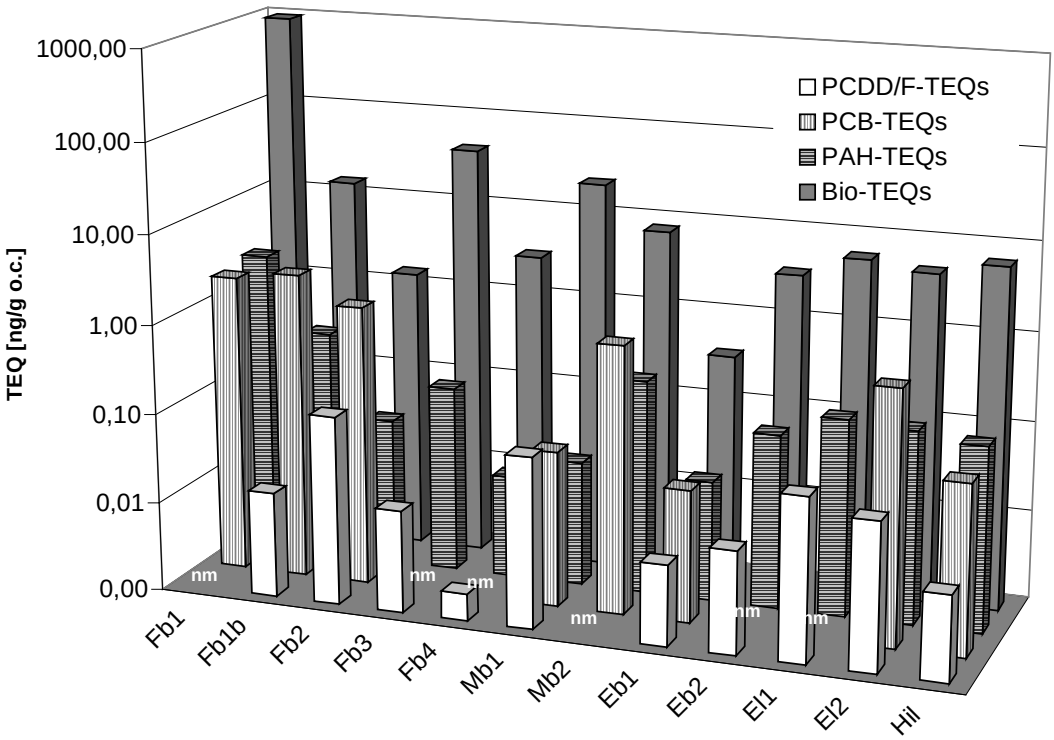


Abb. 4.53. Vergleich der mit Hilfe des embryonalen Hühnerleber-Assay bestimmten Bio-TEQs und analytischen TEQs für 18 PAHs, 17 PCDDs/Fs und 49 PCBs, nm: die Konzentrationen konnten aufgrund von Matrixeffekten nicht quantifiziert werden, o.c. Organischer Kohlenstoffgehalt. Alle Daten sind mit einer logarithmischen Skalierung dargestellt.

der dioxin-ähnlichen Wirkung erklärt werden. Da für Substanzen mit unbekannter EROD-Wirksamkeit eine konservative Bestimmung der TEFs erfolgte, die von einer vermeintlichen dioxin-ähnlichen Wirksamkeit ausging, wurde das tatsächliche Schädigungspotenzial der Extrakte *a priori* überbewertet. Trotz der Überbewertung konnte mit Hilfe der chemischen TEQs bei den drei hochkontaminierten Proben Fb1, Fb3 und Mb1 mit 0,5 bis 0,7 % nur ein Bruchteil der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit erklärt werden. Dieser Befund verdeutlicht, dass selbst mit einem detaillierten chemischen Analysenprogramm keine Bewertung der dioxin-ähnlichen Wirkung erreicht werden kann. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass aus der alleinigen Verwendung der chemischen Analytik in einigen Fällen drastische Fehleinschätzungen des dioxin-ähnlichen Potenzials erfolgen können: So induzierte das Extrakt des Mühlbaches im Oberlauf (Mb1) trotz seiner geringen Konzentrationen an PAHs, PCBs und PCDDs/Fs siebenfach stärker EROD als die Sedimente des schwedischen Belastungsschwerpunktes Järnsjön (Engwall et al. 1996).
Bei dieser Abschätzung sei kritisch angemerkt, dass für die Sedimente Fb1 und Mb2 aufgrund von Verunreinigungen und Matrixeffekten keine PCDDs/Fs sowie für Fb3, Fb4, Eb1 und Eb2 keine PCBs quantifiziert werden konnten (persönliche Mitteilung, Dr. van Bavel Universität Umeå). Für das Sediment Fb1 konnte mit Hilfe einer Bioassay-dirigierten Fraktionierung mit HPLC und nachfolgenden EROD-Analysen mit der Zelllinie RTL-W1 die enorme dioxin-ähnliche Wirksamkeit bestätigt und dennoch ein signifikanter Beitrag der PCBs und PCDDs/Fs an der gesamten dioxin-ähnlichen Wirksamkeit ausgeschlossen werden (Abschnitt 6).
Die Befunde verdeutlichen, dass insbesondere bei den hochkontaminierten Sedimenten Fb1, Fb3 und Mb1 andere Substanzen als die analysierten PAHs, PCBs und PCDDs/Fs für die dioxin-ähnliche Wirksamkeit verantwortlich gemacht werden müssen. Es sei angemerkt, dass in Umweltproben oftmals mehr als hundert PAHs nachgewiesen werden können (persönliche Mitteilung, Dr. van Bavel, Universität Umeå). Für einige dieser PAHs kann eine Affinität zum Ah-Rezeptor und damit die Fähigkeit zur EROD-Induktion angenommen werden. Bioassay-dirigierte Fraktionierungen mariner Sedimente haben gezeigt, dass nur ein kleiner Teil der EROD-Induktion in Fraktionen mit polyaromatischen Inhaltsstoffe auf die analysierten 16 PAHs (Prioritätenliste der Amerikanischen Umweltbehörde, EPA) zurückgeführt werden konnte (Engwall et al. 1997a, b, 1998a). Obwohl keine komplette Identifikation der unbekannten EROD-induzierenden Substanzen verfügbar ist, ist es bekannt, dass zahlreiche andere substituierte und nicht-substituierte polyaromatische Hydrokarbonsäuren Ah-Rezeptor-Liganden sind und EROD zu induzieren vermögen. Nitroaromaten sind beispielweise für Ihre Affinität zum Ah-Rezeptor bekannt (Toftgård et al. 1985), chlorsubstituierte PAHs sind gegenüber einer Biodegradation stabiler als die ursprünglichen PAHs und konnten in Abgasen von Kraftfahrzeugen, Emissionen von kommunalen Verbrennungsanlagen und urbanen Luftproben nachgewiesen werden (Haglund et al. 1987, Nilsson & Ostman 1993, Oehme et al. 1987, Östman & Nilsson 1992). Chloriertes Chrysen besitzt eine starke EROD-induzierende Wirksamkeit in embryonaler Hühnerleberkultur und ist nur einen Faktor 50.000 weniger wirksam als TCDD (Gustafsson et al. 1994). Auch andere diaromatische Verbindungen könnten zur beobachteten EROD-Induktion beitragen. Es ist weiterhin bekannt, dass polychlorierte Naphtalene EROD induzieren können (Engwall et al. 1994). Beispiele für weitere Substanzen, die eine hohe Affinität zum Ah-Rezeptor besitzen, sind Indolcarbazole, heterozyklische Amine (Kleman & Gustafsson 1996) und Tryptophan-Derivate (Schrenk et al. 1999). Indol[3,2-b]carbazol (ICZ) ist ein starker EROD-Induktor, der während der Oligomerisierung von Indol-3-carbinol (I3C), einem Abbauprodukt des Glucobrassicins entsteht, das wiederum bei landwirtschaftlicher Nutzung von Brassicaceen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Da niedrige Konzentrationen von ICZ konnten auch in Extrakten aus menschlichem Kot nachgewiesen werden (Kwon et al. 1994), wäre es denkbar, dass solche Substanzen über Kläranlageneinleitungen in den Forellenbach geleitet wurden und einen Beitrag zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit der Probe Fb1 leisteten.

Bioassay-dirigierte Fraktionierung nach pH-Wert

Um nähere Informationen über die Identität der unbekannten EROD-induzierenden Substanzen in den Gesamtextrakten zu erhalten, wurde eine Flüssig/flüssig-Extraktion durchgeführt (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a). Die Fraktionen der Sedimente des Forellenbaches bewirkten eine unterschiedlich starke EROD-Induktion (Abb. 4.54). Ein Vergleich der Bio-TEQs des acetonischen Gesamtextraktes und der Fraktionen der Bioassay-dirigierten Fraktionierung nach pH-Wert zeigte, dass ein großer Anteil der EROD-Induktion des Gesamtextraktes durch neutrale Substanzen induziert wurde (Abb. 4.54). Auch für die stark sauren (Na_2CO_3-Fraktion) und die schwach sauren Inhaltsstoffe (NaOH-Fraktion) konnte eine deutliche EROD-Induktion ermittelt werden. Es sei kritisch angemerkt, dass die Summe der Bio-TEQs der einzelnen Fraktionen nicht die gesamten Bio-TEQs des Gesamtextraktes erklärte. Synergistische Effekte im Gesamtextrakt oder ein Verlust von EROD-induzierenden Substanzen während der Fraktionierung könnten für die geringere Aktivität verantwortlich sein (Brack et al. 2000).

Eine vergleichbare Verteilung der toxischen Wirksamkeit konnte für organische Extrakte mariner Sedimente mit dem Microtox-Assay (Ho & Quinn 1993b) und für acetonische Schwebstoffextrakte des Neckars im Neutralrot-Assay mit der permanenten Zelllinie RTG-2 (Hollert et al. 2000a) nachwiesen werden. Weiterhin konnte mit einer Flüssig/flüssig- und HPLC-Fraktionierung und dem Endpunkt Ames-Test gezeigt werden, dass saure Substanzen für den Hauptteil der mutagenen Wirksamkeit von partikulär gebundenen organischen Luftschadstoffen der Region Ludwigshafen/Mannheim verantwortlich gemacht werden können (Erdinger et al. 1997). Diese Studie zeigte weiterhin, dass polyzyklische und polyaromatische Hydrokarbonsäuren, die aus einer oxidativen Transformation von PAHs und PCBs stammen können, einen großen Anteil an der Gesamtmutagenität besaßen. Da die Kläranlage ein großes Einzugsgebiet am Kohlhof besitzt, das sich in der Abluftfahne der Region Heidelberg/Ludwigshafen befindet, kann neben der direkten Beeinträchtigung durch die Kläranlage auch ein indirekter Einfluss partikulär gebundener Luftschadstoffe auf die Sedimentqualität des Forellenbaches 1 angenommen werden. Daher könnten auch Teile der EROD-Aktivität in den sauren Fraktionen des Sedimentextraktes Fb1 durch eine oxidative Transformation von PCBs und PAHs erklärt werden (Hollert et al. 2001).

Zusammenfassend konnte mit einer einfachen Fraktionierungsmethode gezeigt werden, dass nicht nur die klassischen EROD-induzierenden Substanzen zur sehr hohen dioxin-ähnlichen Wirksamkeit des Sedimentextraktes Fb1 beitrugen. Dieser Befund stimmt mit denen früherer Studien überein, in denen

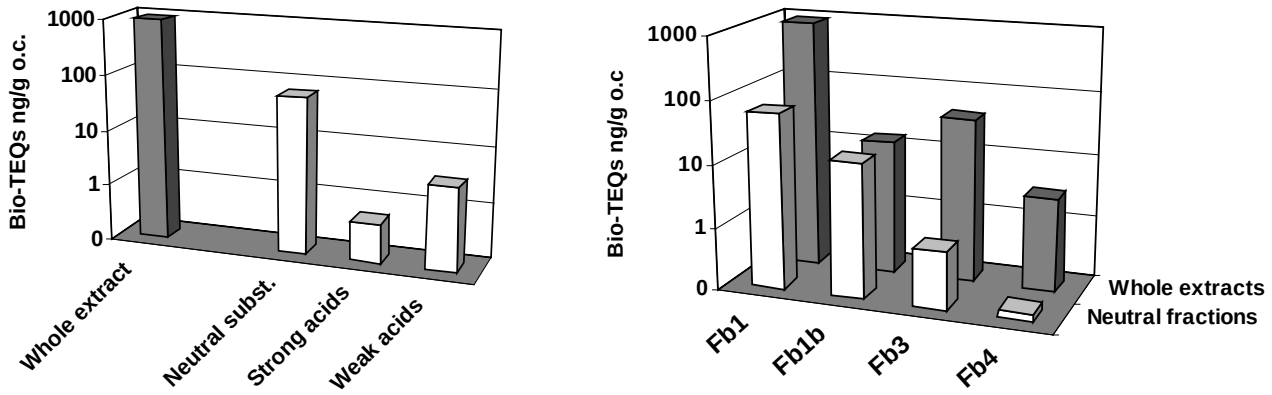


Abb. 4.54. Links: Vergleich der Bio-TEQs von Gesamtextrakten und Fraktionen einer Flüssig/flüssig-Extraktion nach pH-Wert des Sedimentes vom Standort Forellenbach 1. Die Bio-TEQs wurden mit Hilfe von EROD-Induktion in embryonaler Hühnerleberkultur bestimmt. **Rechts:** Vergleich der Bio-TEQs der Gesamtextrakte und Neutralfraktionen einer Säure-Base-Trennung verschiedener Standorte am Forellenbach.

polare Fraktionen eine signifikante EROD-Induktion bewirkten (Brack et al. 2000). Mit einer Flüssig/-flüssig-Extraktion kann keine nähere Identifizierung der problematischen Sedimentinhaltsstoffe erfolgen. Daher wurde in dieser Studie das Sediment mit der höchsten dioxin-ähnlichen Wirksamkeit (Fb1) als Modell für eine komplexere Bioassay-dirigierte Fraktionierung mit Säulenchromatographie und HPLC-Auftrennung und den Endpunkten EROD-Induktion in der permanenten Zelllinie RTL-W1 sowie Mutagenität im Ames-Test gewählt (Abschnitt 6).

Relevanz der EROD-Induktion für die Fließgewässerbiozönose und den Menschen

Chemikalien, die vergleichbare toxische Effekte wie TCDD bewirken, werden als dioxin-ähnlich wirksame Substanzen zusammengefasst und sind für ihre Embryotoxizität, Teratogenität, Immunotoxizität, sowie letale und karzinogene Wirkung bei vielen Spezies bekannt (Hilscherova et al. 2000, Van den Berg et al. 1998). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die biologische Wirkung von dioxin-ähnlichen Substanzen oftmals durch eine Bindung an den Ah-Rezeptor initiiert und mit einer Induktion von Cytochrom P4501A assoziiert ist (Hahn & Stegeman 1992, Hilscherova et al. 2000, Payne et al. 1987, Van den Berg et al. 1998). Der Nachweis von Cytochrom P4501A und des Biotransformationsenzymes EROD wird daher als ein Biomarker für dioxin-ähnliche Wirksamkeit von Umweltproben eingesetzt und ist in angelsächsischen Ländern (Hilscherova et al. 2000, Lee et al. 1993, Whyte et al. 1998) und Skandinavien (Brunström et al. 1995, Engwall et al. 1996, 1998a, Gok-

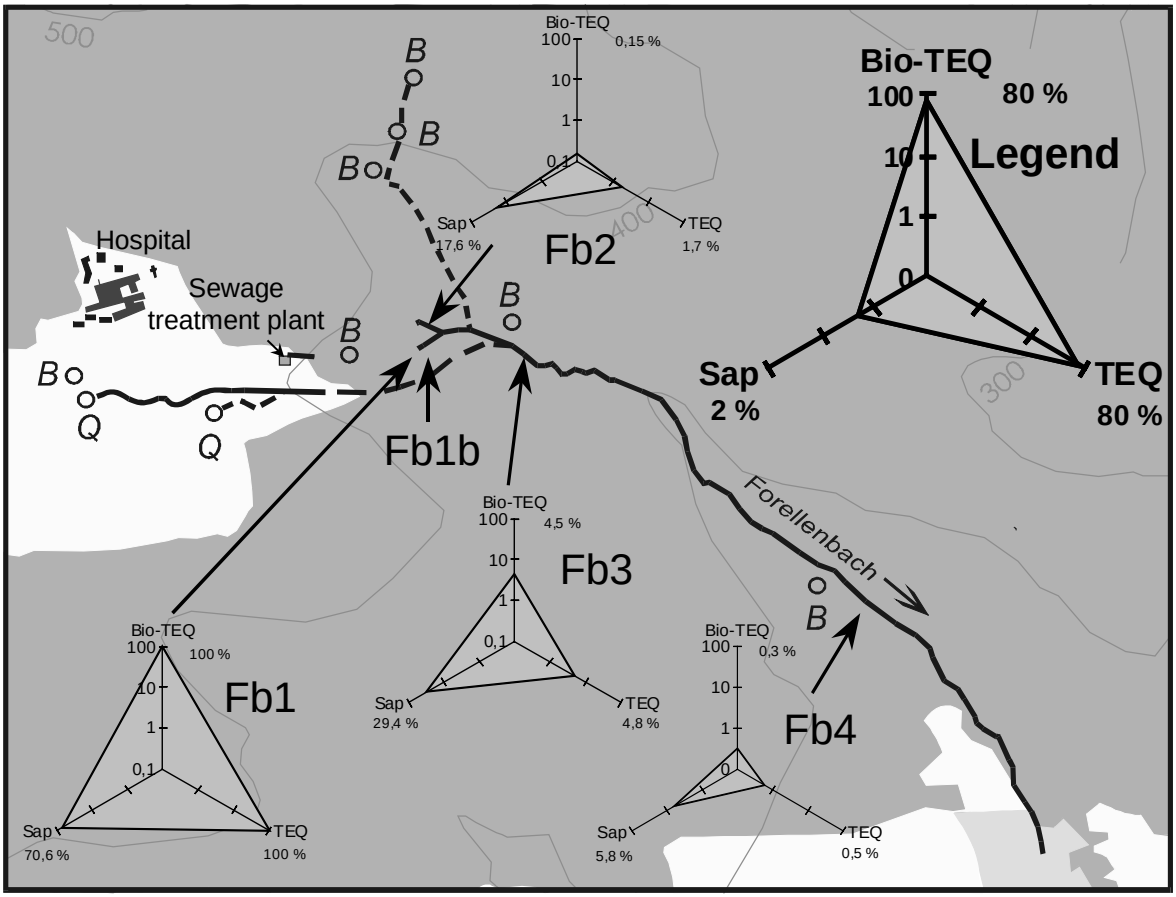


Abb. 4.55. Integrierte Bewertung des Forellenbaches nach dem Konzept von Chapman (1996). Die Befunde der Triade-Komponenten Sediment-Chemie (PAH-TEQs, TEQ), potenzielle Sedimenttoxizität (Bio-TEQ) und Veränderungen der Biozönose (Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste, SAP) sind in ihrer relativen Größe zwischen 0 % (geringster Befund) und 100 % (höchste Belastung) aufgetragen. Alle Daten sind logarithmisch dargestellt. Kartengrundlage: modifiziert nach Winn (2000).

soyr & Förlin 1992, Koistinen et al. 1998) aber auch von der World Health Organisation (Van den Berg et al. 1998) für ein Risk Assessment von Fließgewässern und Sedimenten anerkannt. Es sind aus kombinierten aquatischen Labor- und Feldstudien signifikante Korrelationen der Induktion von Cytochrom P4501A und histologischen Schädigungen bei Fischen bekannt (Goksoyer & Husoy 1998, Huggett et al. 1992, Payne et al. 1987).
Über die Korrelation von EROD-Induktion mit Störungen auf Populationsebene ist wenig bekannt, sie müssen aber *a priori* angenommen werden (Benson & DiGiulio 1992). Daher soll im folgenden Abschnitt dieser Studie eine vergleichende Gegenüberstellung von EROD-Befunden und Störungen von Makrozoobenthos-Biozönosen *in situ* versucht werden.
(1) Forellenbach. Die Überprüfung der ökologischen Relevanz der EROD-Untersuchungen des Sedimentes Fb1 erscheint vor dem Hintergrund der sehr hohen ermittelten Bio-TEQs besonders wichtig. Abb. 4.55 gibt einen Überblick über die Belastungssituation des Forellenbaches bezüglich der Triade-Komponenten Biotest (Bio-TEQ), Chemische Analytik (PAH-TEQ) und Veränderungen *in situ* (Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste) und wurde in Form von Triade-Plots nach Chapman (1990) dargestellt. Sowohl die Fläche als auch die Symmetrie der Dreiecke geben einen Überblick über Höhe und Muster der ökologischen und ökotoxikologischen Belastung. Hohe Werte bei allen Parametern ergeben beispielsweise ein großes gleichseitiges Dreieck. Der Standort Fb1 nach der Kläranlageneinleitung zeigte beispielsweise hohe PAH- und Bio-TEQs aber auch eine gestörte Zusammensetzung der Biozönose, wie der hohe Saprobienindex und der Ökotoxikologische Index nach Carmargo dokumentieren. Nach Chapman (1996) kann ein solcher Befund als eindeutiger Hinweis („weight-of-evidence“) für eine Schadstoff-induzierte Degradation eines Standortes interpretiert werden (Abschnitt 4.1). Die für den Standort Forellenbach 1 (Fb1) ermittelten Störungen der Biozönose dokumentieren die ökologische Relevanz der Befunde aus Biotests und chemischer Analyse. Nach Chapman (1996) sollte ein solches Ergebnis eine umfassendere Untersuchung des Standortes mit Methoden der Bioassay-dirigierten Fraktionierung (Ankley & Schubauer-Berigan 1995, Brack et al. 2000, Engwall et al. 1996) initiieren, um letztendlich die Identifizierung der problematischen Substanzen zu erreichen. Daher wurde das stark kontaminierte Sediment des Standortes Fb1 im Abschnitt 6 dieser Studie mit einer umfassenderen Bioassay-dirigierten Fraktionierung untersucht. Der Dreiecksplot Fb2 verdeutlicht die geringe Schadstoff-induzierte Degradation des Referenzstandortes am Forellenbach. Im Gegensatz dazu konnte für den Standort nach dem Zusammenfluss der beiden Fließgewässerabschnitte (Fb3) eine signifikante Degradation im Vergleich zur Referenz und für Fb4, einige Kilometer stromabwärts, eine deutliche Regeneration nachgewiesen werden.
(2) Andere Fließgewässerstandorte. Für die Mehrheit der untersuchten Standorte konnten Störungen in der Zusammensetzung der Biozönose gezeigt werden (Tab. 4.11). Im Elsenzgebiet konnten beispielsweise für alle untersuchten Fließgewässer hohe Bio,- PAH-, PCDD/F- und PCB-TEQs, aber große Unterschiede beim Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste festgestellt werden. Während der Saprobienindex und der Ökotoxikologische Index nur geringe Störungen beim Makrozoobenthos des Referenzstandortes Hil nachweisen konnte, zeigten die Elsenzstandorte El1 und El2 deutlich höhere Veränderungen *in situ*. Im Gegensatz zum Forellenbach resultierte aus der Einleitung der Kläranlage Eppingen keine Verschlechterung der (hohen) saprobiellen Belastung, wohl aber ein deutliches Ansteigen des Ökotoxikologischen Indexes. Während sehr hohe Bio-TEQs für den Standort Mb1 ermittelt werden konnten, ergaben die chemischen Analysen und Aufnahmen des Makrozoobenthos ein geringeres Belastungspotenzial. Nach Chapman (1996) sollte ein solches Ergebnis als ein Hinweis auf nicht-identifizierte Kontaminanten verstanden werden, die eine potenzielle Degradation des Standortes bewirken können. Als mögliche Gründe kommen Sediment-gebundene toxische Substanzen in Frage, die für die Organismen des Freilandes nicht direkt bioverfügbar sind, oder die Dominanz solcher Organismen, die nicht direkt dem Sediment exponiert sind.

Tab. 4.11. Vergleichende Übersicht über die ermittelten PAH- und Bio-TEQs sowie die Befunde der Untersuchungen *in situ* (Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste und Ökotoxikologischer Index nach Carmargo 1990). Die Daten sind dargestellt als Rohdaten und transformiert in eine Skala zwischen 0 % (niedrigste Belastung) und 100 % (höchste Belastung).

		Saprobic index		Ecotoxicological index		Bio-TEQs		PAH-TEQs	
	Site	Index	(%)	Index	(%)	ng/g o.c.	(%)	ng/g o.c.	(%)
Silicate dominated	Fb1	2,7	100,0	76,5	99,1	931,6	100,0	2,557	100,0
	Fb1b	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	14	1,4	0,379	14,4
	Fb2	1,8	25,0	73,5	95,2	1,4	0,0	0,044	1,2
	Fb3	2,0	41,7	29,4	38,1	42	4,3	0,124	4,3
	Fb4	1,6	8,3	0,0	0,0	3	0,2	0,014	0,0
	Mb1	1,5	0,0	0,0	0,0	22,5	2,27	0,025	0,4
	Mb2	2,6	91,7	77,2	100,0	7,7	0,68	0,251	9,3
Claystone-dominated	Hil	1,7	0,0	0,0	0,0	6,5	100,0	0,117	69,3
	El1	3,2	100,0	53,0	73,6	5,8	88,5	0,159	100
	El2	3,2	100,0	72,0	100,0	4,7	70,5	0,143	88,3
	Eb1	2,3	38,8	0,0	0,0	0,4	0	0,022	0
	Eb2	2,2	32,0	32,4	45,0	3,4	49,2	0,089	48,9

n.i. nicht untersucht, % Prozent der maximalen Belastung. Die Daten-Normalisierung für den Saprobienindex und den Ökotoxikologischen Index wurde in zwei Gruppen mit einer vergleichbaren Fließgewässer-Typologie durchgeführt. Die Standorte Fb1-Mb2 repräsentieren Fließgewässer mit Silikat-dominierten Einzugsgebieten, die Standorte Hil-Eb2 Löss-dominierte, eutrophere Fließgewässer. Um die TEQ-Daten mit den *In situ*-Daten korrelieren zu können, wurde die gleiche Normalisierung auch für die Bio-TEQs und PAH-TEQS durchgeführt. Die jeweiligen Referenzstandorte sind grau unterlegt.

Am Referenzstandort Eb1 der Neckar-Flachwasserzone konnten niedrige Bio-TEQs und niedrige PAH- und PCDD/F-TEQs korreliert werden (Tab. 4.11). Im Gegensatz dazu, konnten für den ständig remobilisierten Standort Eb2 sowohl höhere Bio-TEQs als auch PAH- und PCDD/F-TEQs nachgewiesen werden. Während der Saprobienindex keine Unterschiede in der Belastung nachweisen konnte, korrelierten die Befunde des Ökotoxikologischen Indexes gut mit den Befunden der biologischen Wirktests und der chemischen Analysen. Dieses Ergebnis kann durch eine vergleichbare Belastung der beiden Standorte bezüglich von Makroschadstoffen und einer, mit dem Ökotoxikologischen Index erfassbaren, Anreicherung von Mikroschadstoffen am Standort Eb2 erklärt werden (Hollert et al. 2001).
Ein Vergleich der beiden *In situ*-Indices ergab, dass die alleinige Erfassung der saprobiellen Belastung für die Bewertung der Störungen der Biozönosen nicht ausreicht. Vielmehr kann durch den gemeinsamen Einsatz des Saprobienindex und des ökotoxikologischen Index eine umfassende Analyse des Zustandes *in situ* erfolgen (siehe auch Abschnitt 4.6).

Ausblick

Diese Studie hat gezeigt, dass für zahlreiche Fließgewässer im Einzugsgebiet des Neckars ein hohes dioxin-ähnliches Schädigungspotenzial von den Sedimenten ausgeht, das in vielen Fällen auch mit hohen Belastungen an PAHs, PCBs und PCDDs/Fs korreliert werden konnte. Insbesondere für die

Standorte mit einer hohen dioxin-ähnlichen Wirksamkeit konnte die umfassende chemische Analytik nur einen geringen Anteil der Belastung identifizieren, so dass nur mit Hilfe von Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken eine nähere Identifizierung der wirksamen Substanzen erfolgen kann (Abschnitt 6). Der Vergleich der ermittelten Bio-TEQs mit Daten aus Schweden verdeutlicht das enorme Ausmaß der dioxin-ähnlichen Belastung in den untersuchten Fließgewässersedimenten des Neckareinzugsgebietes. Daher sollten in Zukunft Bioassays zur Bewertung der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit einen größeren Stellenwert nicht nur in der universitären Forschung, sondern insbesondere bei Untersuchungen zu Baggergutumlagerungen und Sedimentkartierungen durch Vollzugsbehörden erhalten.
Obwohl P4501A-vermittelte Toxizität auf für Invertebraten bekannt ist (Fossi et al. 1998, Porte & Escartin 1998) gibt es bisher keine größeren kombinierten Freiland- und Laborstudien, die die Relevanz des Biomarkers bezüglich Veränderungen aus Populationsebene und Biozönose umfassend untersuchen. Die hier dokumentierte gute Korrelation der Befunde aus Biotest und Freiland ist ein weiterer Hinweis für die hohe ökologische Relevanz von Untersuchungen des Biotransformationsenzymes. Es besteht hier erhöhter Forschungsbedarf für kombinierte Freilanduntersuchungen sowie *In vivo*- und *in vitro*-Studien.

5 Überprüfung verschiedener statistischer Bewertungsmethoden am Beispiel der Befunde einer Sedimenttriade

Zusammenfassung. *Während inzwischen zahlreiche Testverfahren zur Untersuchung von partikelgebunden Schadstoffen entwickelt und erprobt wurden, gibt es einen großen Forschungsbedarf bei der Aggregation der Daten und der Ableitung von ausreichend validierten Bewertungsstrategien. Am Beispiel des Datensatzes einer integrierten Untersuchung von 12 verschiedenen Fließgewässerstandorten im Einzugsgebietes des Neckars (Abschnitt 4) wurden in dieser Teilstudie verschiedene statistische Methoden zur Präsentation und Bewertung der Befunde, insbesondere vor dem Hintergrund ihrer Eignung für den gewässerrechtlichen Vollzug, überprüft. Dazu wurden Rangsummen-basierte Verfahren, Clusteranalysen, Hasse-Diagramm-Technik und ein Fuzzy Logic-basiertes Expertensystem eingesetzt. Die Ergebnisse dokumentieren die Vor- und Nachteil der verschiedenen Methoden für die Überprüfung und Klassifikation von Daten aus komplexen Datenmatrices. Rangsummen-basierte Verfahren und die Hasse-Diagramm-Technik erwiesen sich dabei als geeignete Methoden, um die Höhe und die Belastungsmuster des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials aufzuzeigen. Dennoch wird für den Einsatz dieser Bewertungsmethoden und die Interpretation der Ergebnisse ein umfassendes ökotoxikologisches und ökologisches Expertenwissen benötigt, das bei Entscheidungsfindungen im Gewässerrechtlichen Vollzug nicht immer vorausgesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu erwies sich die Fuzzy Logic als geeignet, ein einfach anzuwendendes und je nach Untersuchungsansatz zu modifizierendes ortsabhängiges Expertensystem zu erarbeiten, mit dem die ökotoxikologische Belastung von integrierten Untersuchungen umfassend bewertet werden konnte.*

Publikationen, die bisher aus dieser Teilstudie entstanden sind:
Hollert, H., Heise, S., Pudenz, S., Brüggemann, R., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 2000: Application of a sediment quality triad and different statistical approaches (Hasse diagrams and fuzzy logic) for the comparative evaluation of small streams. Ecotoxicology: submitted.

Einleitung. Integrierte Untersuchungen wie Sedimenttriaden (SQT) generieren umfassende Datenmatrices, die aufgrund der komplexen gegenseitigen Beziehungen zwischen den Variablen nicht einfach zu analysieren und zu interpretieren sind. Die Interpretation der Daten der einzelnen Komponenten einer Triade sollte jeweils im Sinne eines „weight of evidence“ erfolgen, der als Schlussfolgerung auf Basis aller zur Verfügung stehender Information definiert ist (DelValls et al. 1998c). Gegenwärtig werden drei verschiedene Ansätze zur Bewertung von Triade-Daten benutzt, die sich nicht gegenseitig ausschließen: Summen-Indices, Entscheidungsmatrices in Tabellenform (siehe Abschnitt 4.1) und multivariate Ansätze (Chapman 1996). Das Konzept der Aggregation der Daten einer Triade zu einfachen Indices mit Hilfe von dreieckigen Triade-Plots (Abschnitt 4.7.9) wurde von Chapman (2000) als ein Fehler früherer Studien kritisiert, da es zu einem substanziellen Verlust an Informationen führe und die Relevanz sowie räumliche Einflüsse nicht statistisch abgesichert ermittelt werden können. Bei neueren SQT-Studien werden oftmals multivariate Verfahren eingesetzt, um die einzelnen und kombinierten SQT-Komponenten zu aggregieren und zu bewerten (Chapman 1996, 2000, DelValls et al. 1998b, d, Green & Montagna 1996, Shin & Fong 1999). Die Befunde solcher komplexer Verfahren sind nicht einfach zu interpretieren und zu verstehen, insbesondere für Fachfremde in Behörden. Daher ist es ein Ziel dieser Teilstudie, verschiedene statistische Methoden (Rangsummen-basierte Verfahren, Clusteranalysen, Hasse-Diagramm-Technik und Fuzzy Logic) für Aggregation, Bewertung

und Präsentation der SQT-Daten (unter Berücksichtigung der Anforderungen einer Entscheidungsfindung in Umweltfragen) zu vergleichen. Ein Ranking der Befunde ist ein wichtiger erster Schritt im Risk-Assessment kontaminierter Standorte. Eine Möglichkeit stellen Rangsummen-basierte Verfahren für jeden untersuchten Einzelparameter dar, die im Anschluss mit verschiedenen Methoden zu einem einzigen oder wenigen Indices aggregiert werden (Canfield et al. 1994, Carr et al. 1996a, Chapman 1990, Gratzer & Ahlf 1999a). In dieser Studie wurden die SQT-Komponenten Toxizität, Makrozoobenthos und Chemische Analyse mit einem Rangsummen-basierten Verfahren modifiziert nach Canfield et al. (1994) berechnet (Abschnitt 2.7.3).

Der Verlust von Informationen, den die Verwendung von Rangsummen-basierten Verfahren mit sich bringt, kann durch die Verwendung der Hasse-Diagramm-Technik vermieden werden (Brüggemann & Halfon 1997). Die Hasse-Diagramm-Technik basiert auf der Theorie der partiellen Ordnungen (abbreviated "posets") und vermag die Informationen eines komplexen Ranking zu visualisieren (Übersicht bei Brüggemann et al. 1997). Bisher wurde die Hasse-Diagramm-Technik erst in wenigen Studien zum Ranking von kontaminierten Sedimenten (Brüggemann & Halfon 1997, Brüggemann et al. 1994, Gratzer & Ahlf 1999a, Heise et al. 2000) eingesetzt, wogegen sie bei SQT-Studien bisher wurde noch nicht angewendet wurde. Da bei der Untersuchung von großen Datenmatrices Hasse-Diagramme entstehen können, die durch die Fülle graphischer Repräsentationen unübersichtlich werden, wurde in dieser Studie eine Fuzzy-Clusterung eingesetzt, um die umfassende Datenmatrix zu reduzieren. Die Fuzzy Set-Theorie wurde von Zadeh (1965) entwickelt und vermag unsichere Datensätze, linguistische Beschreibungen („ungefähr so groß wie“) und Expertenwissen zu verrechnen. Im Vergleich zu konventionellen Methoden erlaubt die Fuzzy Logic einen deutlich wirkungsvolleren Umgang mit unpräzisen Daten und vagem Wissen. Die Hauptanwendungen der Fuzzy Logic in der ökologischen Forschung sind Datenanalysen, Entscheidungsfindungsprozesse und Expertenwissen-basierete Modellierungen (Salski et al. 1996). Nach dem International Council for the Exploration of the Sea

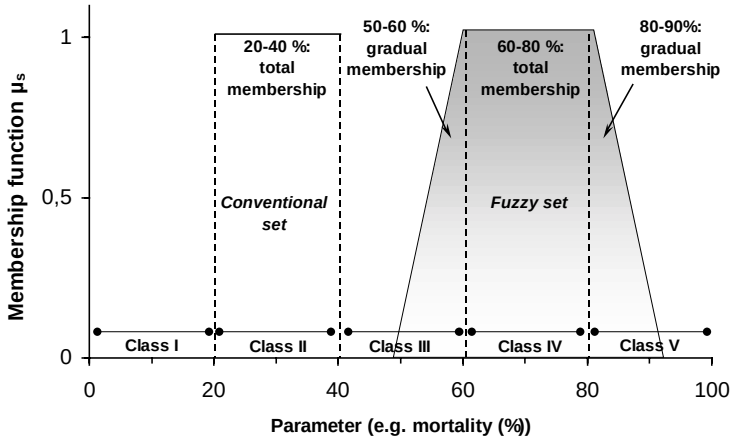


Abb. 5.1. Konventionelle Zugehörigkeitsfunktion und Fuzzy Set-Zugehörigkeitsfunktion. Normalerweise wird der Wert „1“ der Zugehörigkeitsfunktion für die Zahlen angenommen, die vollständig zur jeweiligen Klasse (z.B. 20 – 40 % Mortalität) gehören, wogegen „0“ für alle Zahlen angenommen wird, die nicht zur Klasse gehören. Im Gegensatz zur konventionellen Logik ist die Fuzzy set-Theorie durch graduelle Zugehörigkeitsfunktionen gekennzeichnet; 60 – 80 % Mortalität gehört beispielsweise vollständig zum Fuzzy set, wogegen die Daten 50 – 60 % and 80 – 90 % eine partielle Zugehörigkeit zur Fuzzy-Klasse 60 – 80% besitzen. Der Hauptvorteil der Fuzzy-Theorie ist somit, dass Daten nahe des Grenzwertes zweier Klassen in zwei verschiedene Klassen klassifiziert werden können.

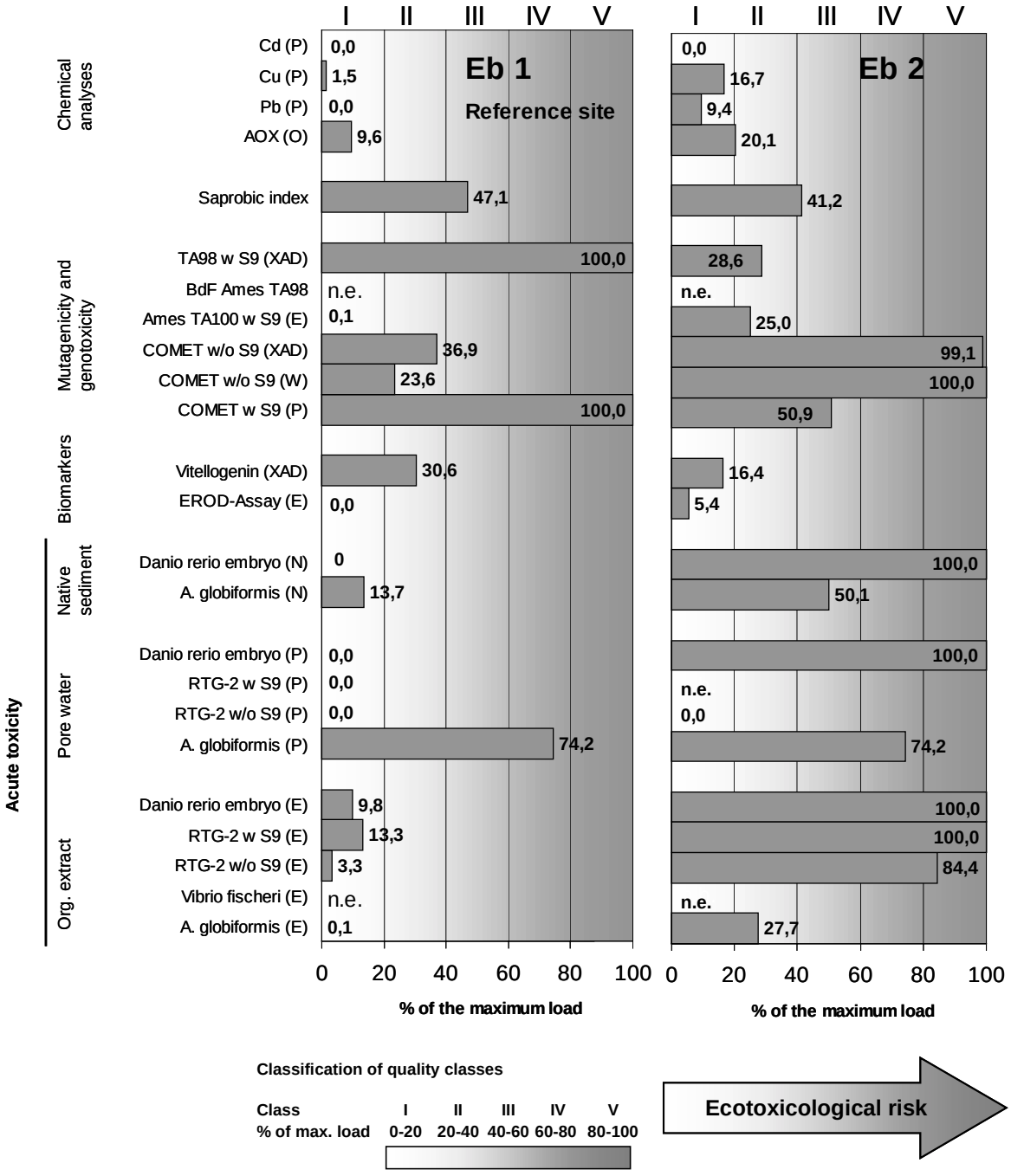


Abb. 5.2. Ergebnisse einer umfassenden Untersuchung von zwei Standorten einer Flachwasserzone mit Verbindung zum Neckar. Am Standort Eb2 ist der Wasserstand stark vom Schiffsverkehr auf dem Neckar beeinflusst, der zu einer ständigen Remobilisierung von Sedimenten und einem temporären Trockenfallen des Habitates mit einer Anreicherung von leichter austauschbaren Metallbindungsspezies im Sediment und im Wasser führt. Eb1 ist ein Referenzstandort mit einer vergleichbaren Korngröße wie Eb2, der sich nahe des Ausflusses der Flachwasserzone zum Neckar befindet. Die Daten wurden mit einem Rangsummen-basierten System berechnet, wobei alle Parameter proportional zwischen 1 % für den geringsten Effekt und 100 % für den höchsten Effekt skaliert wurden. Im Anschluss wurden die Daten nach zunehmender ökotoxikologischer Belastung in fünf Äquivalentklassen mit Vielfachen des Wertes 20 % als Klassengrenzen klassifiziert.

(ICES, 1999) besitzt die Fuzzy Logic ein sehr großes Potenzial bezüglich der Entwicklung von Bewertungssystemen für komplexe marine Datensätze. Derzeit wird die Fuzzy Logic für die Erarbeitung eines ortsunabhängigen Klassifikationssystems für Binnensedimente eingesetzt (Heise et al. 2000). Im Gegensatz zur scharfen Logik, nutzt die Fuzzy Logic unscharfe Zahlenbegriffe und Zugehörigkeitsfunktionen (Abschnitt 2.7.3). Mit Hilfe der Fuzzy Logic kann eine Klassifikation erarbeitet werden, bei der scharfe Grenzwerte durch ein fließendes Kontinuum eines Grenzwertbereiches ersetzt werden (Abb. 5.1).
Bei statistischen Berechnungen kann in der Fuzzy Logic mit unscharfen Zahlenwerten operiert werden, die eine graduelle Zugehörigkeit zu verschiedenen Klassen besitzen, so dass während der mathematischen Operationen nur wenige Informationen verloren gehen. Erst in einem letzten, sogenannten Defuzzyfizierungsschritt wird wieder eine absolute Zugehörigkeit zu nur einer Klasse ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Rangsummen-basierte Klassifikationsverfahren. Abb. 5.2 gibt eine Übersicht über die Güteklassen einer Flachwasserzone bei Eberbach, die mit Hilfe eines Rangsummen-basierten Klassifikationsverfahrens (Abschnitt 2.7.3) berechnet wurden. Diese Darstellungsweise erlaubt einen direkten Vergleich der ökotoxikologischen Belastung an den zwei Standorten der Flachwasserzone: Der Standort Eb2 besitzt eindeutig ein höheres Schädigungspotenzial als der Referenzstandort Eb1. Bei einigen untersuchten Parametern (z.B. Genotoxizität des Porenwassers im Comet-Assay und endokrines Potenzial von XAD-Wasserextrakten im Dot-Blot-Assay) konnte auch für den Referenzstandort eine geringe Güte nachgewiesen werden. Die Klassifikation zeigt einen deutlichen Unterschied in der embryotoxischen Wirkung zwischen den beiden Standorten: Während das Sediment des Referenzstandortes bei den drei untersuchten Expositionspfaden natives Sediment, wässriges Eluat und acetonischer Extrakt nur geringe Schädigungen bewirkte, konnte jeweils die höchste Belastung aller untersuchten Triadestandorte für den Standort Eb2 der Flachwasserzone ermittelt werden. Dieser Befund kann als mögliche Er-

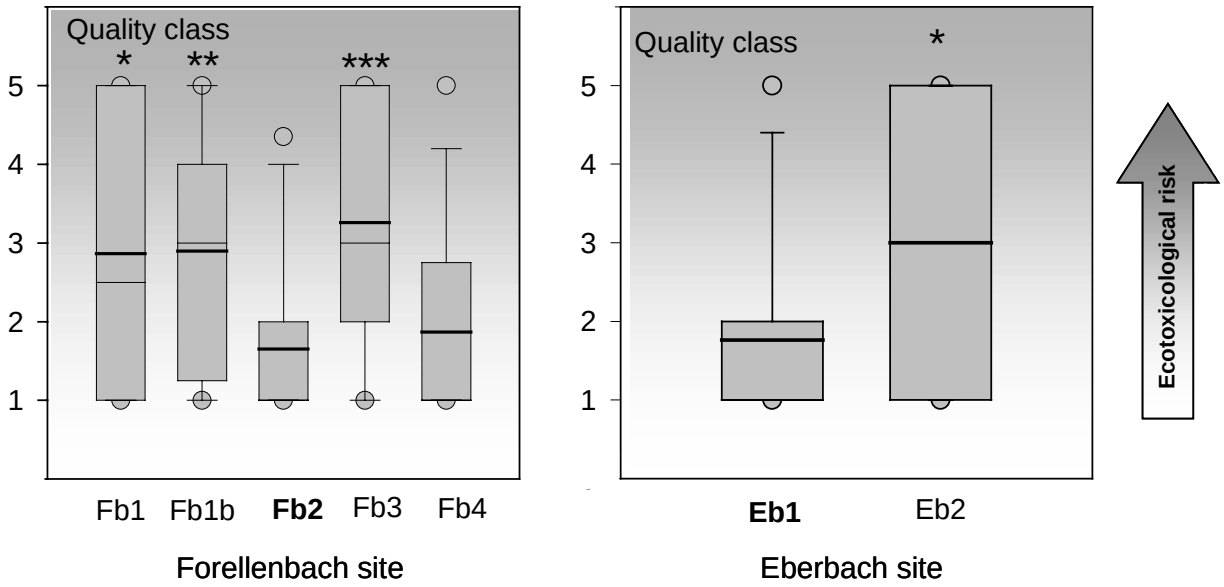


Abb. 5.3. Ergebnisse einer Aggregation der Güteklassen der einzelnen Parameter, die durch Berechnung des Medians, des Mittelwertes, der Standardabweichung und der 5 %, 25 %, 75 % und 95 % Perzentilen erhalten wurde. Die Referenzstandorte Eb1 und Fb1 sind fett dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Standorten wurden mit Hilfe eines Rang-Summen-Tests nach Mann-Withney untersucht. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

klärung für das Fehlen juveniler Fische am Standort Eb2 (Geier 1994, Hollert et al. 1999a), der ursprünglich als Laichrefugium konzipierten Flachwasserzone dienen. Als mögliche Erklärungen kommen Wasserstandsschwankungen durch vorbeifahrende Neckarschiffe in Frage, die zu einer ständigen Remobilisierung von Sedimenten und einem temporären Trockenfallen der Flachwasserzone führen, so dass z.B. eine Anreicherung leicht austauschbarer Metallbindungsspezies stattfinden kann (Song & Müller 1993, Abschnitt 4.5).
Abb. 5.2 zeigt, dass die Rangsummen-basierte Klassifikation eine übersichtliche Darstellung komplexer Datenmatrices erlaubt, bei der nur wenig Informationen zum Charakter des ermittelten Schädigungspotenzials verloren gehen. Eine Aggregation der Rangsummen-basierten Güteklassen, die durch Berechnung des Medians und anderer statistischer Kenngrößen durchgeführt wurde, illustriert signifikante Unterschiede zwischen den Referenzstandorten und den kontaminierten Standorten (Abb. 5.3). Die nur geringen Unterschiede zwischen dem Referenzstandort Fb2 am Forellenbach und dem Regenerationstandort Fb4 verdeutlichen die weitgehende ökologische und ökotoxikologische Regeneration des Forellenbaches im Unterlauf.

Clusteranalyse. Eine Clusteranalyse der Bioassays, chemischen Parameter und dem Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste identifizierte vier Cluster (A-D), die alle 12 Standorte der Triade enthielten (Abb. 5.4). Cluster C fasst die Fließgewässerstandorte mit einer geringen ökotoxikologischen Belastung zusammen und beinhaltet daher die Referenzstandorte Fb2, Mb1, Eb1 und den Regenerationsstandort Fb4. Die anderen Cluster beinhalten Probennahmestellen mit einem größeren Belastungspotenzial. Der Referenzstandort Hil ist in einem eigenen Cluster mit den anderen Standorten des Elsenzgebietes gruppiert. Die relativ hohe Belastung des Referenzstandortes Hil könnte auf die intensive Landwirtschaft oder den hohen Abwasseranteil im gesamten Einzugsgebiet der Elsenz zurückzuführen sein. Die Verteilung der kontaminierten Standorte in die Cluster ist eindeutig durch die geologische Situation im Einzugsgebiet beeinflusst: Alle kontaminierten Sandsteinstandorte (Fb1, Fb1b,

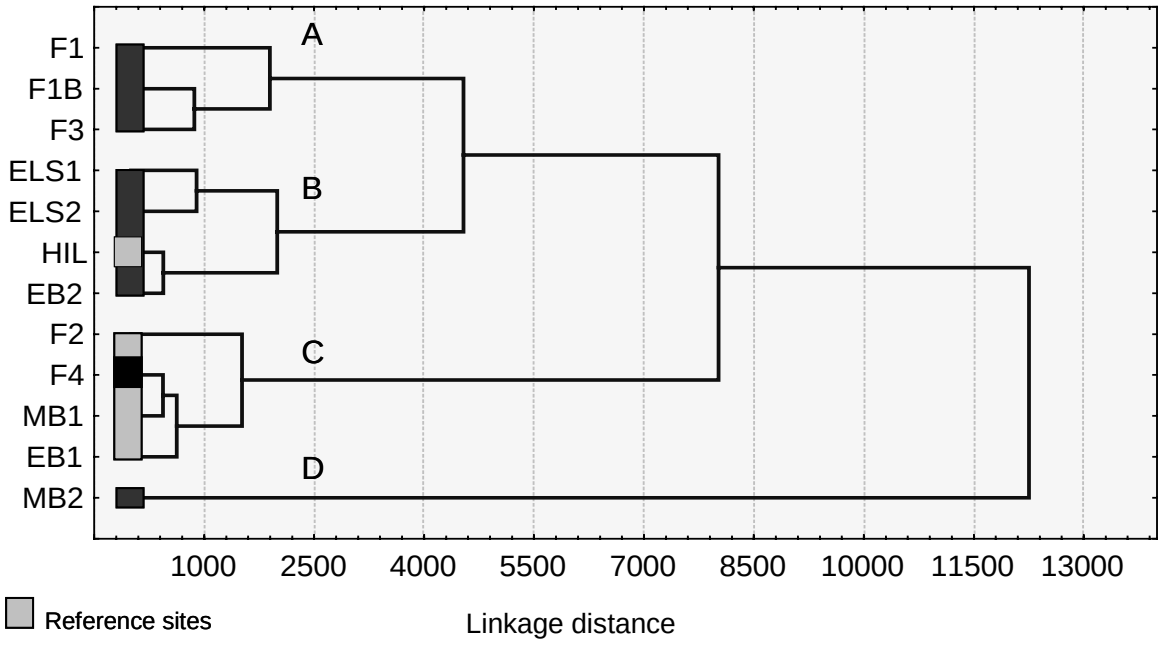


Abb. 5.4. Clusteranalyse (Complete Linkage, Euklidische Distanzen) der Befunde aus Bioassays, chemischen Analysen und *In situ*- Untersuchungen aller beprobten Standorte.

F3) und alle Löss-dominierten Standorte (El1, El2, Hil, Eb2) sind in einem Cluster gruppiert. Im Gegensatz dazu wurde der Unterlauf des Mühlbaches (Mb2) mit seinem gemischten Einzugsgebiet aus Buntsandstein, alluvialen Sedimenten und Löss in ein eigenes Cluster gruppiert. Dieser Befund verdeutlicht, dass vergleichbare Muster in Clustern in diesem Falle nicht nur vom ökotoxikologischen Schädigungspotenzial alleine abhängen. Zudem veranschaulicht der Einfluss des Einzugsgebietes auf die Ergebnisse der Clusteranalyse die Notwendigkeit von fließgewässertypologischen Klassifikationsverfahren (Braukmann & Pinter 1997a).

Fuzzy Logic-basiertes Expertensystem. Auf der Basis der Ergebnisse des Rangsummen-basierten Klassifikationssystems und der Clusteranalyse wurde eine Klassifikation erarbeitet, die die Höhe und die Belastungsmuster der Standorte möglichst gut repräsentiert. Diese Klassifikation (Tab. 5.1) wurde im Programm DataEngine in eine Regelbasis transformiert (Abschnitt 2.7.3), die als Grundlage für die späteren Berechnungen mit dem Fuzzy Logic-Expertensystem diente. Abb. 5.5 gibt einen Überblick über die Güteklassen, die mittels dieses Fuzzy Logic-Expertensystems berechnet wurden. Nicht nur die Referenzstandorte F2, Mb1, Hil, Eb1, sondern auch der Regenerationsstandort am Forellenbach (F4) wurden in Klassen mit geringer Belastung eingeteilt. Im Gegensatz dazu wurden alle anderen Standorte der SQT der Klasse 4 (stark belastet) zugeordnet. Der ausschließliche Einsatz von Daten von Bioassays mit dem Expositionspfad Porenwasser modifizierte die Fuzzy-Klassifikation leicht (Abb. 5.6): Während die Güteklassen von zwei Referenzstandorten (F2, Eb1) jeweils um einen Klasse zunahmen, zeigten die Standorte F3 und Mb1 eine geringere Belastung. Die Befunde veranschaulichen, dass Fuzzy Logic-basierte Expertensysteme ein praktikables Hilfsmittel darstellen, die Höhe und die Verteilung von partikelgebundenen Schadstoffen hinsichtlich verschiedener Expositionspfade zu untersuchen. Das Verfahren erlaubt genaue Differenzierung in der Entscheidungsfindung, da jeweils die ökologisch relevanten Szenarien benutzt werden können: Der Einsatz von wässrigen Eluaten ermöglicht beispielsweise eine Bewertung von Sedimenten vor dem Hintergrund einer Remobilisierung während Hochwasserereignissen (Hollert et al. 2000a) oder einer Verklappung von Sedimenten in Flüssen mit einer einhergehenden Oxidation (Burton 1991, Hollert et al. 2000d).

Tab. 5.1. Sedimentklassifikation, die auf Basis der Rangsummen-basierten Bewertungsmethode und der Clusteranalyse erarbeitet wurde. Die Regeln wurden in linguistische Variablen transformiert und als Basis für die Erarbeitung eines Fuzzy Logic-Expertensystems genutzt.

Güteklasse	Beschreibung
1 (unbelastet)	BIO-, SAP- & CHE-Index jeweils < 20 %; Summe $_{BIO, SAP, CHE}$ < 40 %
2 (gering belastet)	BIO-, SAP- & CHE-Index jeweils < 60 %; Summe $_{BIO, SAP, CHE}$ 40 % < x < 110 %
3 (mäßig belastet)	Ein Index: 50 % < x < 80 %, übrige Parameter jeweils < 80 %; Minimum $_{BIO, SAP, CHE}$ > 20 % und Summe $_{BIO, SAP, CHE}$ < 190 %
4 (stark belastet)	BIO-, SAP- oder CHE-Index > 80 %; Minimum $_{BIO, SAP, CHE}$ > 40 %; Summe $_{BIO, SAP, CHE}$ > 180 %

Der Index BIO basiert auf den Ergebnissen der *In vitro*-Bioassays und wurde während den Berechnungen variiert, um eine Einsicht in den Charakter des Schadstoffpotenzials zu erhalten. SAP: Saprobienindex nach der erweiterten Taxaliste (LAWA 1998), CHE: Chemischer Index, der aus 26 chemischen und limnochemischen Parametern berechnet wurde.

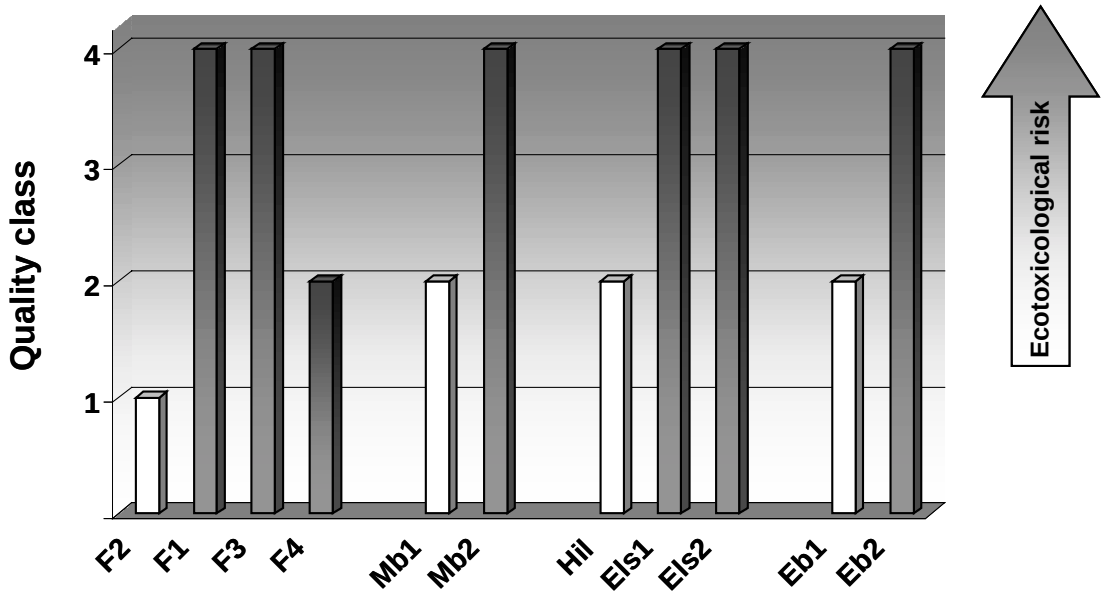


Abb. 5.5. Klassifikation der SQT-Standorte mit einem Fuzzy Logic-Expertensystem. Die Berechnungen wurden mit dem Index BIO mit Ergebnissen aus Bioassays durchgeführt (Natives Sediment*: Arthrobacter globiformis*, Porenwasser: *Danio rerio* und RTG-2-Zellen, Extrakt: *Danio rerio*, RTG-2-Zellen, *Arthrobacter globiformis*, EROD-Induktion in embryonaler Hühnerleberkultur), der Index CHE bestand aus 26 chemischen Parametern und SAP stellt das Ergebnis des Saprobienindex dar. Die Referenzstandorte sind als helle Balken dargestellt. Der Referenzstandort F2 wurde in die Klasse 1 eingeordnet, die anderen Referenzstandorte in die Klasse 2. Im Gegensatz dazu wurden alle anderen Standorte außer F4 als stark belastet identifiziert.

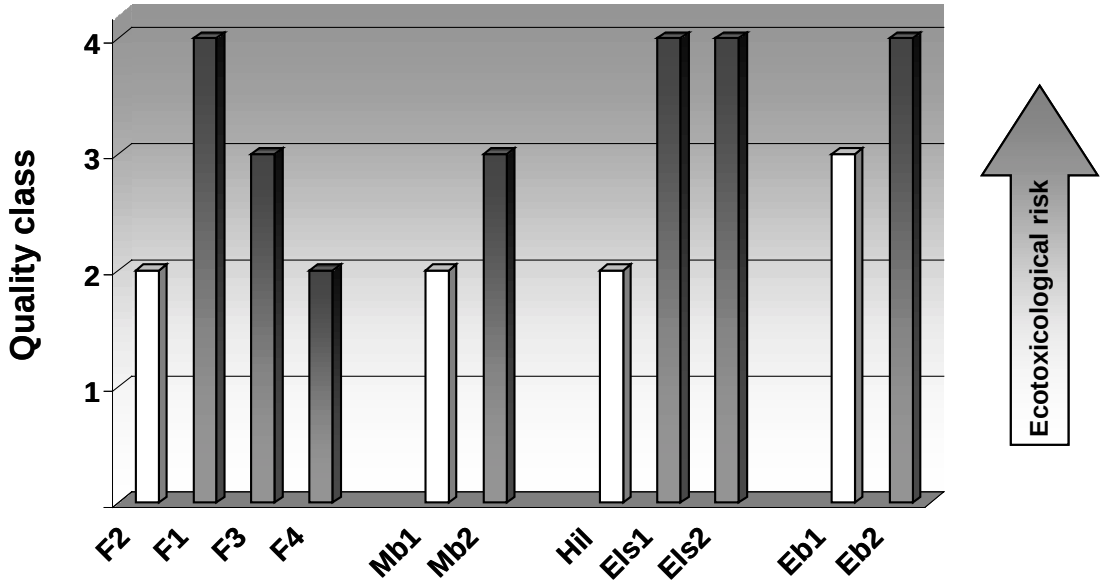


Abb. 5.6. Klassifikation der SQT-Standorte mit einem Fuzzy Logic-Expertensystem. Im Gegensatz zur vorhergehenden Abbildung wurde der Index BIO nur aus Bioassays mit dem Expositionspfad Porenwasser berechnet: *Arthrobacter globiformis*, *Danio rerio* sowie RTG-2-Zellen mit und ohne S9. Im Vergleich zu Abb. 5.5 verschlechterte sich die Güteklasse von 2 Standorten (F2, Eb1) um jeweils 1 Stufe und das Schädigungspotenzial von den Standorten F3, F4 and Mb2 verringerte sich signifikant.

Hasse-Diagramm-Technik. Eine Ranganalyse von 27 Untersuchungsparametern der SQT mit der Hasse-Diagramm-Technik ergab ein Diagramm mit einer sogenannten Antikette. Dieser Befund verdeutlicht, dass die Standorte keine Übereinstimmungen beim Ranking ergaben, und daher die Individualität der Standorte überrepräsentiert wurde. Mit Hilfe einer nachfolgenden Sensitivitätsanalyse wurde die Informationsbasis schrittweise verringert, um die Redundanz der Parameter zu reduzieren. Die Reduktion durch die Sensitivitätsanalyse resultierte in einer deutlichen horizontalen und vertikalen Differenzierung der berechneten Hasse-Diagramme (Abb. 5.7). Mit Hilfe der Hasse-Diagramm-Technik ergab sich folgendes Ranking der Standorte nach zunehmender ökotoxikologischer Belastung: F4 < F2, Mb1, Hil, Eb1 < F1, F1b, F3, Mb2, El1, El2, Eb2.
Die Befunde verdeutlichen, dass mit der Hasse-Diagramm-Technik eine Klassifikation der Belastungen erreicht werden kann. Da die Hasse-Diagramm-Technik die Befunde unabhängig von statistischen Unterschieden in den Proben berechnet, kann das resultierende Diagramm mitunter sehr komplex werden (Brüggemann et al. 1998, Gratzer & Ahlf 1999a). Eine Möglichkeit, einfacher zu interpretierende Hasse-Diagramme zu erhalten, stellt die Fuzzy Logic-basierte Clusteranalyse dar. Ein Hasse-Diagramm, das nach einer Fuzzy-Clusterung erhalten wurde, ist in Abb. 5.8 dargestellt. Im Gegensatz zu Abb. 5.7 sind die Standorte F2, F4 und Eb1, F1 und F1b sowie Mb2, El1, El2 und Eb2 in sogenannten Äquivalentklassen aggregiert, die jeweils durch vergleichbare Höhe und Muster in ihrer ökotoxikologischen Belastung charakterisiert sind. Zusammengefasst kann die Hasse-Diagramm-Technik, insbesondere in Kombination mit vorausgegangener Fuzzy-Clusterung als ein praktikables Hilfsmittel zur Visualisierung von Ranking-Analysen und Klassifikation von Daten einer SQT hinsichtlich ihrer ökotoxikologischen Belastung aufgefasst werden (Pudenz et al. 2000).

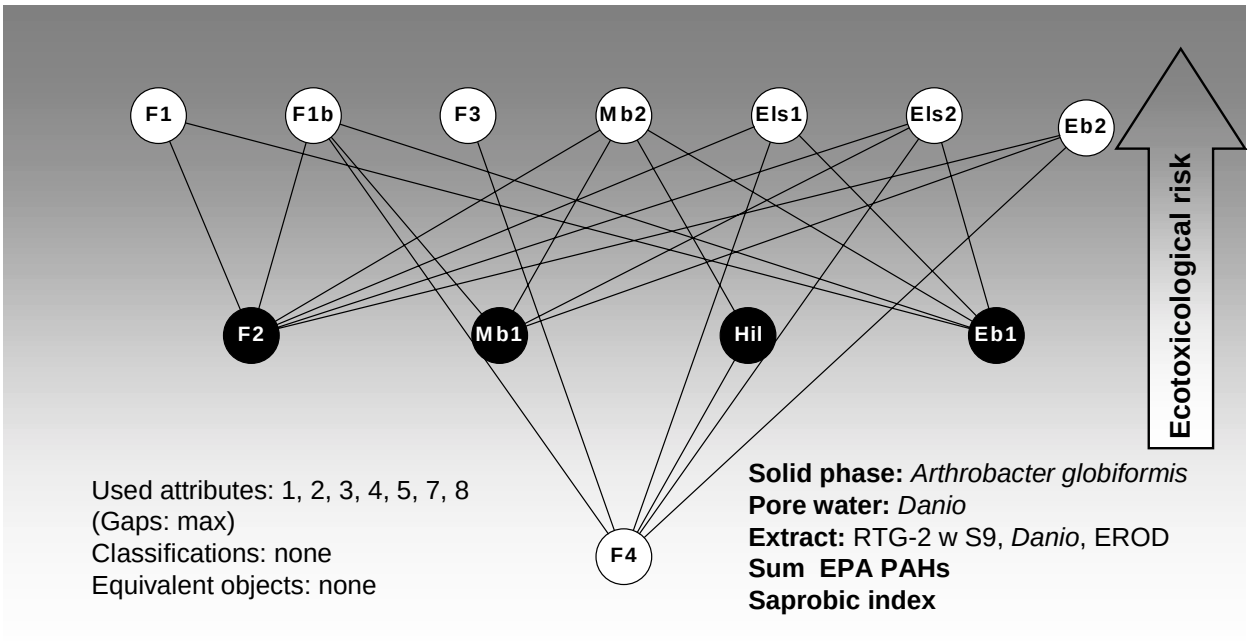


Abb. 5.7. Hasse-Diagramm, das nach der Reduktion der Informationsbasis auf die folgenden Parameter berechnet wurde: Natives Sediment*: Arthrobacter globiformis*, Porenwasser: *Danio rerio*, Extrakt: *Danio rerio*, RTG-2-Zellen mit S9, EROD-Induktion in embryonaler Hühnerleberkultur, Summe der prioritären PAHs nach der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) und Saprobienindex. Dunkle Symbole repräsentieren Referenzstandorte der SQT, F4 ist der Regenrationsstandort des Forellenbachs. Zur Leseweise der Hasse-Diagramm siehe Abb. 2.15.

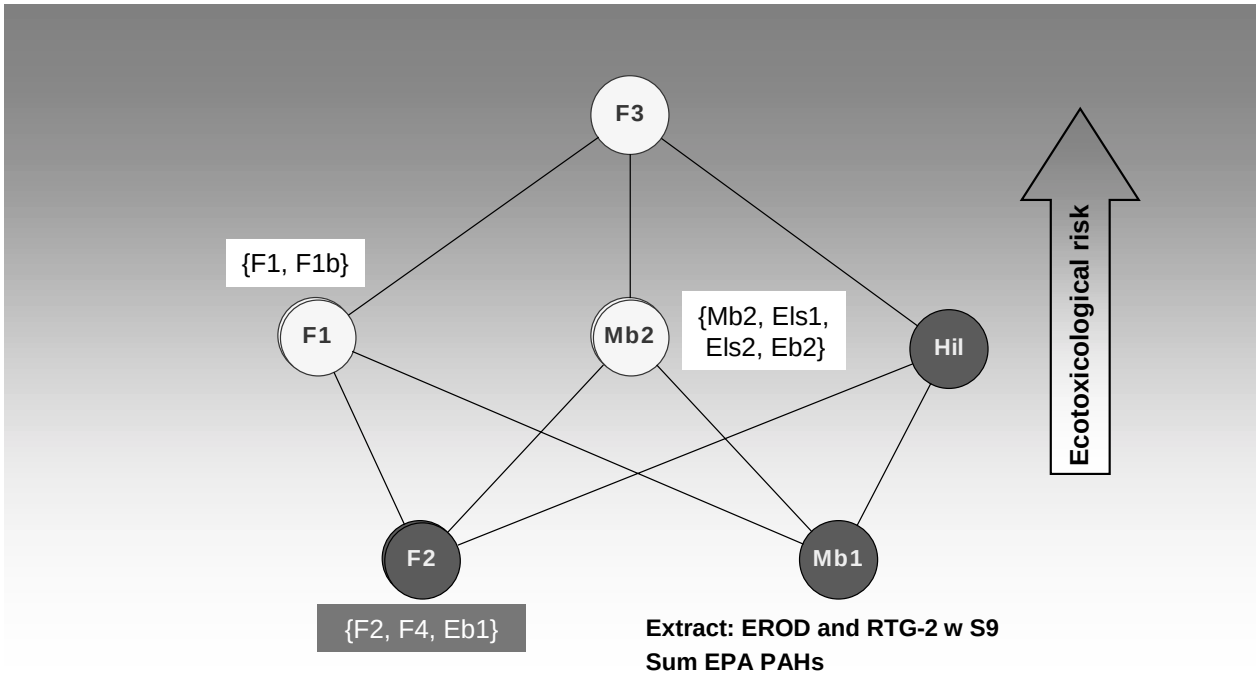


Abb. 5.8. Hasse-Diagramm nach einer Fuzzy-Clusteranalyse, um Standorte mit vergleichbarer Höhe und Muster der ökotoxikologischen Belastung zu identifizieren. Während bei der vorhergehenden Graphik das Hasse-Diagramm durch nicht vergleichbare Standorte charakterisiert war, resultieren aus der Kombination von Fuzzy-Clusterung und Hasse-Diagramm-Technik sogenannte nicht-triviale Cluster, die mehr als ein Objekt beinhalten und bezüglich der Belastungshöhe und des Belastungsmusters vergleichbar sind. So zeigt beispielsweise der nicht-triviale Cluster {Mb2, Els1, Els2, Eb2} an, dass diese Standorte ein gleiches Schädigungspotenzial bezüglich EROD-Induktion, Cytotoxizität im Ansatz mit S9 und der Summe der PAHs besitzen.

Ausblick

Analog zu den Studien von Carr et al. (1996b), Chapman (2000), Chapman et al. (1992), DelValls et al. (1998c) und Pascoe et al. (1994) konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit Hilfe des SQT-Konzeptes Fließgewässerstandorte hinsichtlich ihrer Schadstoff-induzierten Degradation klassifiziert werden können. Solch eine Klassifikation wäre ohne den integrierten Einsatz aller drei Komponenten der Triade nicht möglich gewesen.

Die Anwendung verschiedener statistischer Bewertungsmethoden, die in dieser Studie eingesetzt wurden, zeigte eine starke ökotoxikologische Belastung für einige der untersuchten Fließgewässerstandorte im Einzugsgebiet des Neckars. Im Hinblick auf eine Identifizierung und Eliminierung von Schadstoffemittenten besitzt die Untersuchung von Fließgewässern kleiner und mittlerer Einzugsgebiete offensichtlich eine große Relevanz, zumal hier Emissionsquellen leichter identifiziert werden und mit einer Toxicity Reduction Evaluation (TRE) eliminiert werden könnten (EPA 1999).

Die Befunde dieser Studie dokumentieren die Vor- und Nachteile der eingesetzten statistischen Methoden für die Aggregation und Bewertung von umfangreichen Datensätzen. Die Rangsummen-basierte Klassifikation und die Hasse-Diagramm-Technik erwiesen sich als geeignet, um einen umfassenden Überblick über die Höhe und die Muster der ökotoxikologischen Belastung zu erhalten (Brüggemann et al. 1994, Canfield et al. 1994, Pudenz et al. 2000). Es wird zugleich offensichtlich, dass für die Durchführung und die Interpretation der Daten aus diesen Bewertungsmethoden ein umfangreiches Expertenwissen benötigt wird, so dass die Methoden nur eingeschränkt von Behörden für Entscheidungsfindungen in Umweltfragen eingesetzt werden können. Im Gegensatz dazu konnte mit der Fuzzy Logic ein ortsspezifisches Expertensystem für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung er-

arbeitet werden und zudem – über den Vergleich verschiedener Expositionspfade – ein Einblick in die Muster des Schädigungspotenzials erhalten werden.
Bisher war die Einbeziehung von Expertenwissen bei Entscheidungsfindungen im Überschneidungsbereich zwischen Umweltwissenschaften und Politik und Behörden oftmals mit einer gewissen Subjektivität verbunden. Während bei kleinen, überschaubaren Fragestellungen Begriffe aus dem alltäglichen Sprachgebrauch für die Beschreibung von Sachverhalten oftmals eingesetzt wurden und dort aufgrund einer hinreichenden Überprüfbarkeit sicherlich ihre Berechtigung haben, sind Werteskalen und Klassifikationssysteme bei größeren Fragestellungen zum Teil dem Vorwurf der Subjektivität ausgesetzt, da Wissenschaftler zu einer persönlichen Einschätzung gezwungen werden (Steinberg 1999). Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in allgemein akzeptierten Klassifikationssystemen, wie etwa dem Saprobiensystem wider. Die bundesdeutschen Gewässergüteklassen sind letztendlich *fuzzy sets*; es sind Kategorien wie „gering oder mäßig belastet“, die sich aus dem menschlichen Sprachgebrauch und Denken ableiten und oftmals numerisch nur schwer zu fassen sind (vgl. Steinberg 1999). Während bei einem altbekannten System wie dem Saprobiensystem solche *fuzzy sets* auf eine große Akzeptanz stoßen, scheuen sich Wissenschaftler bei neueren Forschungsaspekten wie etwa Genotoxizität und endokriner Belastung, möglicherweise aufgrund des Vorwurfes einer zu geringen *quantitativen* Absicherung, ihre *qualitativen* Beobachtungen für umweltpolitische Entscheidungsfindungen zur Verfügung zu stellen. Fuzzy Logic-basierte Verfahren könnten in Zukunft als Bindeglied zwischen Forschung und Entscheidungsträgern fungieren, da mit Ihrer Hilfe im umgangssprachlichen Sprachgebrauch formulierte wissenschaftliche Beobachtungen in numerische Daten transformiert werden können (Salski et al. 1996, Salski & Kandzia 1996, Urbanski 1999, Zimmermann et al. 1995). Ein großer Vorteil einer Fuzzy Logic-Klassifikation ist, dass sie nach der Erarbeitung durch Experten auch von Nicht-Experten zur Bewertung von Datensätzen angewendet werden kann und sich die Ergebnisse einfach interpretieren lassen (Heise et al. 2000). Fuzzy Logic-basierte Expertensysteme besitzen nicht nur ein großes Potenzial für die Bewertung von ortsabhängigen Datensätzen, sondern auch für die Entwicklung von ortsunabhängigen Klassifikationssystemen (Heise et al. 2000), die mittel- bis langfristig aus einer Synthese einzelner integrierter Untersuchungen erarbeitet werden sollten.
Der signifikante Einfluss des geologischen Charakters des Einzugsgebietes auf die Befunde der Triade (Abschnitte 4.5, 4.6. und 4.7) und auf die hier dargestellte Klassifikation verdeutlicht, dass integrierte Klassifikationssysteme für Fließgewässer unbedingt fließgewässertypologisch konzipiert sein sollten. Während sich diese Erkenntnis bei limnologisch orientierten Untersuchungen weitgehend durchsetzen konnte (Braukmann & Pinter 1997a), dominieren bei Sedimenten nach wie vor undifferenzierte Untersuchungs- und Bewertungskonzepte (BfG 2000, Gratzer & Ahlf 1999a, Rechenberg 2000, Zipperle & Deventer 2000).

6 Wirkungsbezogene Identifizierung cytotoxischer, mutagener und Dioxin-ähnlicher Inhaltsstoffe – Fallbeispiel eines Sedimentes nach einer Kläranlageneinleitung am Forellenbach

Zusammenfassung. *Um die chemische Identität der Substanzen näher zu identifizieren, die im Sediment des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung für das hohe mutagene und dioxin-ähnliche Schädigungspotenzial verantwortlich sind, wurde in dieser Teilstudie in Kooperation mit Dr. Brack (Umweltforschungszentrum, Leipzig) eine komplexe Bioassay-dirigierte Fraktionierung (Alumina-Säulenchromatographie, Normalphasen- und Umkehrphasen-HPLC) durchgeführt. Neben den lipophileren Schadstoffen wurde ein Schwerpunkt auf die Untersuchung der polareren Inhaltsstoffe gelegt. Die Fraktionen wurden mit den biologischen Endpunkten Cytotoxizität im akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen, Genotoxizität im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen, Mutagenität im Ames-Test mit dem Stamm TA 98 und dioxin-ähnlicher Wirksamkeit im EROD-Assay mit der Zellline RTL-W1 untersucht. Teilproben mit hohem Schädigungspotenzial im Biotest wurden jeweils mit komplexeren Verfahren weiterfraktioniert und mit Gaschromatographie/Massenselektiver Detektion (GC/MSD) chemisch-analytisch untersucht, um die biologisch wirksamen Substanzen zu identifizieren.*

- *Es konnte gezeigt werden, dass eine Alumina-Fraktionierung die sehr polaren cytotoxischen Substanzen irreversibel an dem Adsorbens adsorbierte und so zu einer Aufreinigung der Probe führte. Die Fraktionen der unpolaren Aromaten (F2) und der polareren dissoziierten Verbindungen (F3) konnten als Hauptträger der verbleibenden Cytotoxizität identifiziert werden.*
- *Im Comet-Assay und im Ames-Test mit dem Stamm TA98 konnten in den Fraktionen F2 und F3 eine hohe gentoxische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Mit Hilfe von mehreren hintereinandergeschalteten HPLC-Fraktionierungen der Teilprobe F2 konnten in der Fraktion F2.8.7 (Induktionsfaktor von 10 im Ames-Test) PAHs der Molekulargewichte 264 und 266 identifiziert werden, für die bisher nur wenige biologische Wirkdaten vorliegen. Eine Fraktionierung der Teilprobe F2.7, in der auch Benz[a]pyren eluierte, konnte im Ansatz mit S9 die Mutagenität der Gesamtprobe auf eine einzige Teilprobe (F2.7.8) zurückführen. Ein großer Anteil der mutagenen Aktivität der polareren Inhaltsstoffe (F3) ging von Substanzen aus, die in der Teilprobe F3.4.4 eluierten und keiner Aktivierung durch das P450-System benötigten. Obwohl in der Probe F3.4.4 einige Peaks mit dem GC/MSD nachgewiesen werden konnten, ließen sich diese bisher keiner bekannten Verbindung zuordnen.*
- *Während bei der Untersuchung der Primärfraktionen das höchste dioxin-ähnliche Potenzial erwartungsgemäß für die Fraktion mit den aromatischen Verbindungen (F2) detektiert werden konnte, bewirkten auch die polareren nicht-dissoziierten Verbindungen (F3) eine deutliche EROD-Induktion. Eine Subfraktionierung der Fraktion F2 ergab, dass mono- und diaromatische Verbindungen (PCDDs/Fs, PCBs, PCNs), die als die klassischen EROD-Induktoren gelten, keinen signifikanten Beitrag zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit der Ausgangsfraktion lieferten. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Teilfraktion F2.6 die EROD-Induktion der Ausgangsfraktion zu 70 % erklärte. Hier ließen sich als dominante Verbindungen die PAHs Triphenylen, Benz(a)anthracen, Chrysen und zahlreiche ihrer Methyl- und Dimethylderivate identifizieren.+*

Einleitung

Ziel von Bioassay-dirigierten Fraktionierungen ist es, die biologisch wirksamen Substanzen (Substanzklassen) zu ermitteln. Hierzu werden die Umweltproben fraktioniert und im Bioassay getestet. Nur biologisch aktive Fraktionen werden einer weiteren chemischen Analytik unterzogen.
In dieser Teilstudie soll das hochbelastete Sediment des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung (Fb1) – für das ein hohes dioxin-ähnliches Schädigungspotenzial (Abschnitt 4.7.9) und nach einer Flüssig/Flüssig-Extraktion eine hohe Mutagenität (Abschnitt 4.7.7) nachgewiesen werden konnte – mit Hilfe einer Biotest-geleiteten Fraktionierung detaillierter untersucht werden. Dazu wurde von Herrn Dr. Brack und Herrn Dipl. Chem. Kind (Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle) komplexe Fraktionierungen mit Alumina-Säulenchromatographie, Normalphasen- und Umkehrphasen-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) durchgeführt. Die Fraktionen wurden mit den biologischen Endpunkten Cytotoxizität im akuten Zelltest mit RTG-2-Zellen, Genotoxizität im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen, Mutagenität im Ames-Test mit dem Stamm TA 98 und dioxin-ähnlicher Wirksamkeit im EROD-Assay mit der permanenten Zellline RTL-W1 aus der Regenbogenforelle untersucht. Die Messungen zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit wurden am Umweltforschungszentrum Leipzig durchgeführt und von Herrn Dr. Brack freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
Chromatographische Auftrennungen von Extrakten wurden insbesondere für gentoxische Biotests mehrfach angewendet; Grifoll et al. (1990) verwendeten dazu Aluminiumoxid-Säulen, West et al. (1986) Aluminiumoxid-Säulen in Verbindung mit Normalphasen-HPLC, Jarvis et al. (1996) eine Silicagel-Fraktionierung, Braunbeck et al. (1997b), Erdinger et al. (1997), Hollert & Braunbeck (1997), Hollert et al. (1998a), Samoiloff et al. (1983) eine Florisil®-Fraktionierung, Fernandéz et al. (1992) eine Kombination aus Gelpermeationschromatographie, Normalphasen-HPLC und Umkehrphasen-HPLC sowie Maruoka et al. (1986) eine Dünnschichtchromatographie (TLC) mit anschließender HPLC-Auftrennung. Zum Nachweis der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit wurden Extrakte von Umweltproben mehrfach mit Säulenchromatographie beziehungsweise HPLC aufgetrennt und in permanenten Zellkulturen mit den Zelllinien RTL-W1 (Brack et al. 1999b, 2000) und H4IIE-luc (Hilscherova et al. 2000, Khim et al. 1999b, c) oder in embryonaler Hühnerleberkultur untersucht (Brunström et al. 1992, Engwall et al. 1994, 1996, 1997a, b, 1998a, Norrgren et al. 1998). Zur Identifizierung akut toxischer Substanzen haben Ho & Quinn (1993b) eine Flüssig/Flüssig-Extraktion und Reemtsma et al. (1999) eine HPLC-Fraktionierung mit dem Endpunkt Microtox-Assay durchgeführt, Galassi & Benfenati (2000) untersuchten die Toxizität von HPLC-Extrakten mit *Daphnia magna*, Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen wurden mit HPLC-Extrakten von Abwasserproben (Castano et al. 1994) und Fraktionen einer Florisil®-Trennung von Schwebstoffextrakten (Braunbeck et al. 1997b, Hollert & Braunbeck 1997) untersucht. Brack et al. (1998, 1999b) kombinierten eine Alumina- und HPLC-Fraktionierung von Sedimentextrakten mit einer Biotestbatterie aus *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, dem Algenhemmtest mit *Scenedesmus vacuolatus* und dem Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie RTG-2.

Cytotoxische Wirkung

Eine Untersuchung der cytotoxischen Wirksamkeit der Primärfraktionen einer Alumina-Fraktionierung (F1-F4alk), der Mischung aller Fraktionen (Fx) und des Ausgangsextraktes der Fraktionierung (Fo, Lösungsmittel Dichlormethan) ist in Abb. 6.1 dargestellt. Die unpolaren Aromaten (F2) und die polareren nicht-dissoziierten Verbindungen (F3) erklären einen beträchtlichen Anteil der cytotoxischen Wirkung des Ausgangsextraktes. Während beim Gesamtextrakt der Ansatz ohne S9 etwas toxischer wirkte, toxifizierte die S9-Supplementierung die Fraktionen F2 und F3 deutlich. Somit konnte in beiden Teilfraktionen die Dominanz solcher Substanzgruppen nachgewiesen werden, die erst durch den biotransformationskompetenten S9-Mix toxifiziert werden. Die geringere Cytotoxizität der Mischung aller Teilfraktionen Fx im Vergleich zum Ausgangsextrakt und die relative Dominanz der

S9-abhängigen Cytotoxizität in Fx zeigen, dass die Alumina-Fraktionierung zu einer Aufreinigung des Gesamtextraktes geführt hat. Offensichtlich ließen sich die polareren cytotoxischen Verbindungen, die für einen Großteil der Toxizität des Gesamtextraktes im Ansatz ohne S9 verantwortlich waren, mit den eingesetzten Lösungsmitteln nicht von der Alumina-Säule eluieren.
Da das cytotoxische Schädigungspotenzial des Forellenbachsediments nach der Kläranlageneinleitung im Vergleich zu den anderen untersuchten Standorten der Triade eine geringere Höhe besaß (Abschnitt 4.7.4), wurde die Auftrennung dieses Extraktes hinsichtlich der cytotoxischen Wirksamkeit nicht weiter fortgeführt.

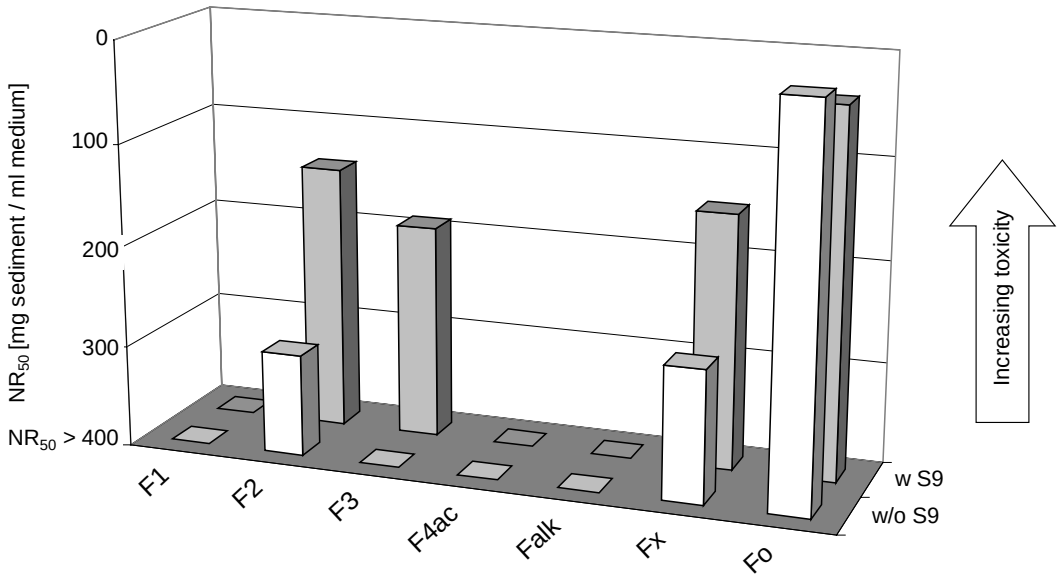


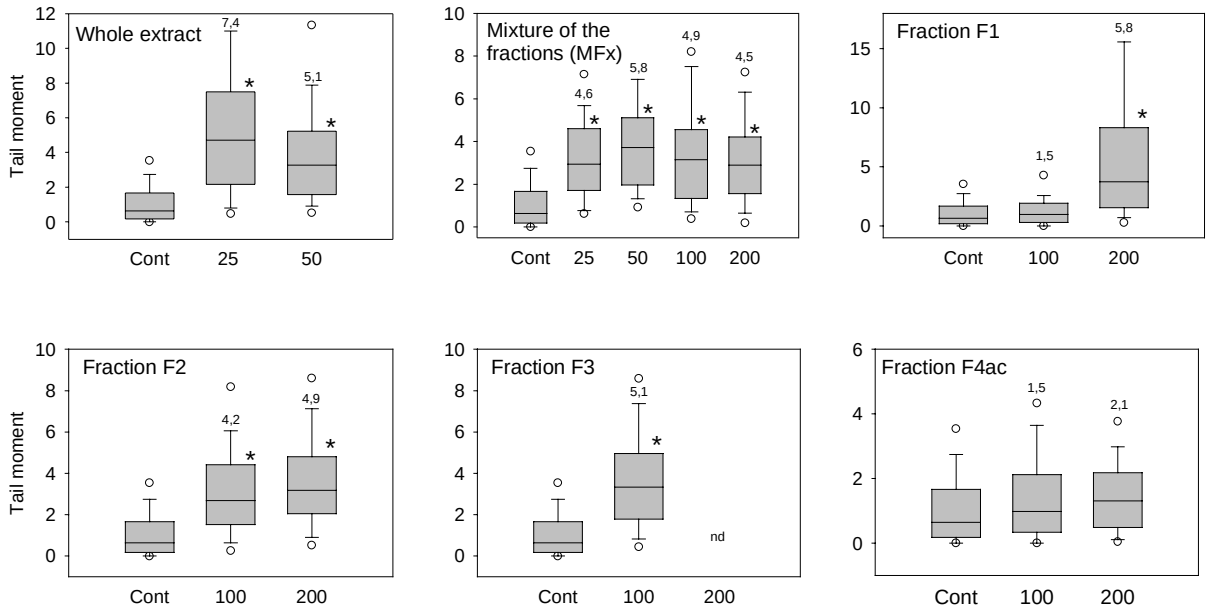
Abb. 6.1. Cytotoxizität der Primärfraktionen (F1-F4alk), der Mischung aller Fraktionen (Fx) und des Gesamtextraktes des Sedimentes am Forellenbach nach der Kläranlageneinleitung. Als Höchstkonzentration im Neutralrottest wurde 400 mg Sedimentäquivalent pro ml Medium eingesetzt; w S9 und w/o S9: mit und ohne S9-Supplementierung.

Gentoxische Wirkung

Während für ein acetonisches Extrakt des Forellenbachsedimentes nach der Kläranlageneinleitung (Standort Fb1) keine Genotoxizität im Comet-Assay detektiert werden konnte (Abschnitt 4.7.6), wirkte das Gesamtextrakt mit dem Lösungsmittel Dichlormethan nach einer Schwefelentfernung mit aktiviertem Kupfer nur in hohen Konzentrationen cytotoxisch und induzierte bei 25 und 50 mg Sedimentäquivalente pro ml Testmedium eine signifikante Genotoxizität mit Induktionsfaktoren bis zu 7,4 (Abb. 6.2). Das Dichlormethan-Extrakt wurde mit Hilfe einer säulenchromatische Auftrennung mit Aluminiumoxid-Säule in 5 Fraktionen mit zunehmender Polarität sequenziert, um eine Identifizierung der gentoxischen Substanzgruppen zu erhalten.

Im Comet-Assay mit der permanenten Zelllinie RTG-2 konnte für die Fraktionen F1 (Aliphaten), F2 (unpolare Aromaten) und F3 (polarere nicht dissoziierte Verbindungen) eine signifikante gentoxische Wirksamkeit mit Induktionsfaktoren bis zu 5,8 nachgewiesen werden. Das höchste Schädigungspotenzial besaßen die Fraktionen F2 und F3, die auch bei der geringsten untersuchten Konzentration von 100 mg/ml noch deutlich gentoxisch wirkten, wogegen für die Fraktion F1 bei 100 mg/ml keine signifikante Genotoxizität mehr nachgewiesen werden konnte. Von den acidischen und alkalischen polaren Verbindungen (F4ac und F4alk) ging keine signifikante Genotoxizität aus. Eine Mischung aller Subfraktionen (MFx) zeigte ein leicht u-förmige Dosis-Wirkungsbeziehung mit einer maximalen Induktion von 5,8 bei der Konzentration 50 mg/ml. Die u-förmige Kurve verdeutlicht die Überlagerung der gentoxischen durch eine cytotoxische Wirkung (vergleiche Abschnitt 4.7.6). Ein Vergleich des Gesamtextraktes mit der Mischung aller Teilfraktionen MFx zeigt, dass die Aluminiumoxid-Fraktionierung wie ein Clean-up der Probe gewirkt und zu einer Abtrennung cytotoxischer Substanzen geführt hat.

Die Resultate der Alumina-Fraktionierung in Comet-Assay korrelieren sehr gut mit denen des Ames-Tests. Sie zeigen, dass der Comet-Assay als Endpunkt für Bioassay-dirigierte Fraktionierungen sehr gut geeignet ist. Ein Vorteil des Comet-Assays gegenüber dem Ames-Test ist, dass er etwa 90 % weniger Probenvolumen benötigt und so insbesondere für die Bioassay-dirigierte Fraktionierung von Wasserextrakten geeignet ist, bei denen oftmals nur geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen. Aufgrund der größeren Probenkapazität und der höheren Relevanz des Endpunktes Mutagenität gegenüber der Genotoxizität im Comet-Assay wurde für die weiteren Fraktionierungen nur noch der Ames-Test als Untersuchungsendpunkt verwendet.



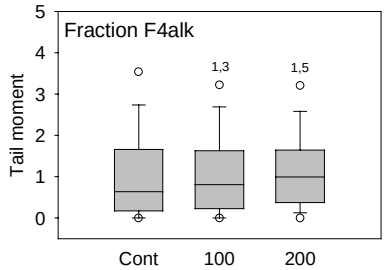


Abb. 6.2. Gentoxische Wirkung der Fraktionen einer biotestgeleiteten Sequenzzierung eines Sedimentextraktes des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung mit Aluminiumoxid-Säulenchromatographie im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen ohne S9-Supplementierung. Die Genotoxizität ist in der Einheit mg extrahiertes Sedimenttrockengewicht pro ml Testansatz als Tail moment (von jeweils 100 Zellen) und als Induktionsfaktor angegeben. Die mit * markierten Konzentrationen bewirkten eine signifikante Genotoxizität (Dunnett-Test mit $p < 0,05$), nd: nicht untersucht.

Mutagene Wirkung

Aluminiumoxid-Fraktionierung. Abb. 6.3 gibt einen Überblick über die Mutagenität der Alumina-Fraktionen im Ames-Test mit dem Stamm TA 98. Während beim Extrakt eine bakterientoxische Wirkung die mutagene überlagerte (Zeiger & Pagano 1984), konnte für die Mischung aller Fraktionen (MFx) im Ansatz mit und ohne S9-Supplementierung eine deutliche Mutagenität mit Induktionsfaktoren bis zu über 3 nachgewiesen werden. Die Teilfraktionen F2 (unpolare Aromaten) und F3 (polarere, nicht-dissoziierte Verbindungen) konnten für den Großteil der Mutagenität verantwortlich gemacht werden, so dass nur diese Teilproben weiter untersucht wurden.

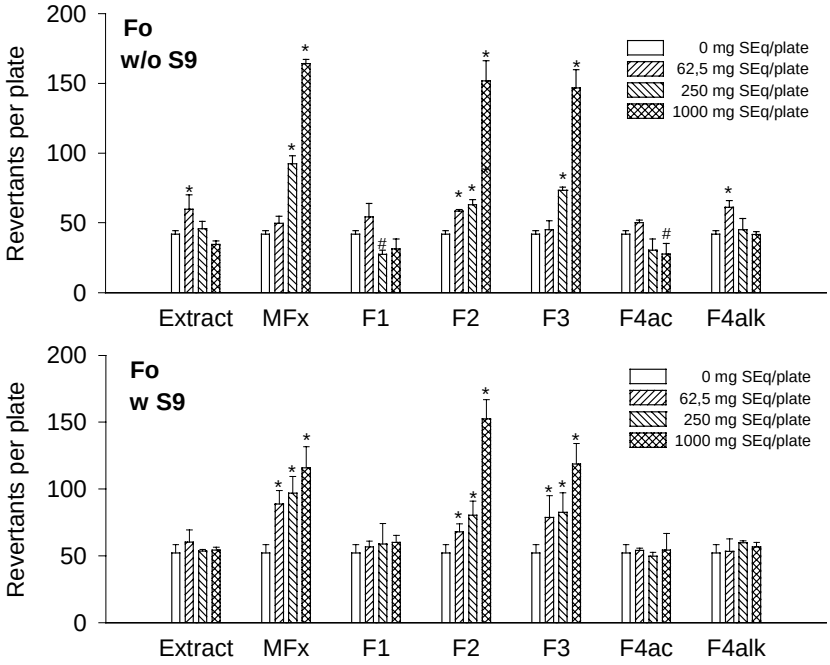


Abb. 6.3. Mutagenität der Fraktionen einer Biotest-geleiteten Fraktionierung eines Sedimentextraktes des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung mit Alumina-Säulenchromatographie im Ames-Test, Stamm TA 98 mit (w S9) und ohne (w/o S9) S9-Supplementierung. Die Mutagenität ist als Revertanten pro Ames-Platte in der Einheit mg extrahiertes Sedimenttrockengewicht pro Ames-Platte (SEq/plate) angegeben. Die mit * markierten Konzentrationen bewirkten eine signifikante Mutagenität (Dunnett-Test mit $p < 0{,}05$). Extract = Gesamtextrakt nach Schwefelentfernung, F1-F4alk = Einzelfraktionen, MFx = Summe der Fraktionen F1-F4alk.

HPLC-Fraktionierung der Unterprobe F2 (unpolare Aromaten). Abb. 6.4. zeigt die Mutagenität der Teilfraktionen einer Auftrennung der Fraktion F2 mit unpolaren Aromaten nach Aromatizität. Da diese Fraktionierungstechnik zuvor mit Standardsubstanzen validiert wurde (Brack et al. 2001a), kann jeder Fraktion eine Beispielsubstanz zugeordnet werden, die aufgrund ihrer Aromatizität (Anzahl der C-Atome mit delokalisierten π-Elektronensystemen) in dieser Fraktion eluieren würde. Die Beispielsubstanzen müssen aber nicht zwangsläufig für die mutagene Wirkung in der jeweiligen Fraktion verantwortlich sein. Während im Ansatz ohne S9-Supplementierung nur die Fraktion F2.8 mutagen wirkte, die als Beispielsubstanz Perylen mit einem Molekulargewicht (MG) von 252 enthielt, induzierten im Ansatz mit S9-Supplementierung die Fraktionen F2.6 (Chrysen, MG 228), F2.7 (Benzo[a]pyren, MG 252), F2.8 (Perylen, MG 252), F2.9 (Anthranen, MG 276) und F2.10 (größere PAHs, MG > 276) eine deutliche Mutagenität mit Induktionsfaktoren über 2.

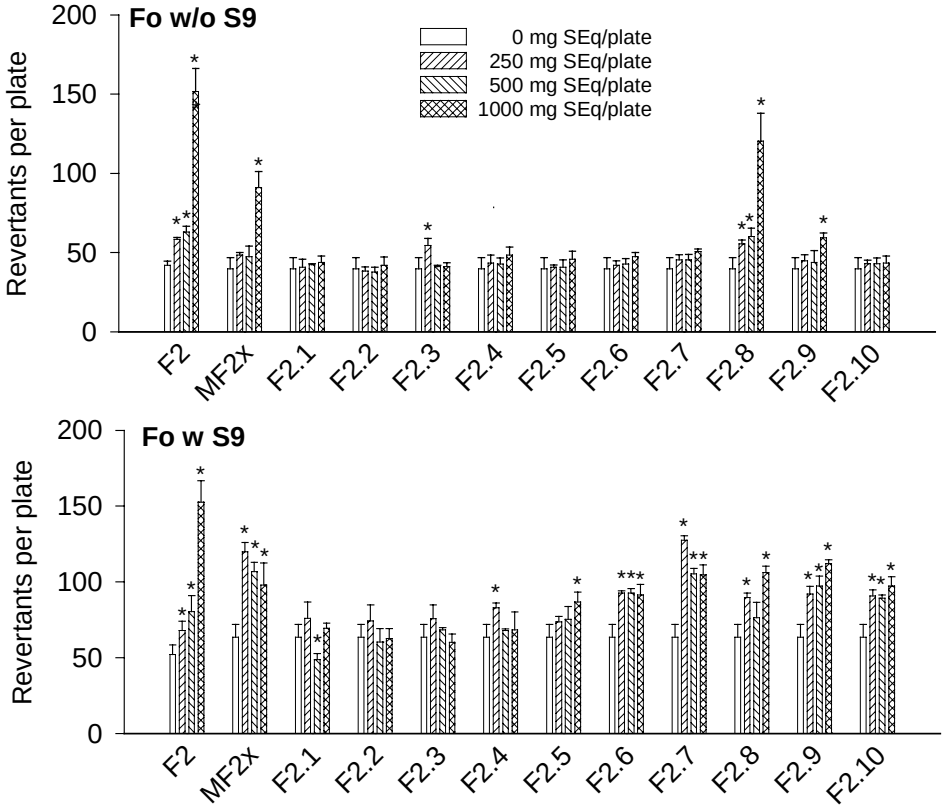


Abb. 6.4. Mutagenität der Fraktionen einer Biotest-geleiteten Fraktionierung der Aluminafraktion F2 mit HPLC. Die mit * markierten Konzentrationen bewirkten eine signifikante Mutagenität (Dunnett-Test mit $p < 0{,}05$). F2 = Aluminafraktion F2, F2.1-F2.10 = Einzelfraktionen, MF2x = Summe der Fraktionen F2.1-F2.10.

Um die mutagenen Inhaltsstoffe in den jeweiligen Teilfraktionen zu identifizieren, wurden weitere HPLC-Fraktionierungen der Fraktionen F2.6, F2.7 und F2.8 peakorientiert durchgeführt (Abschnitt 2.2.6) und im Ames-Test untersucht. Für die Unterproben der Fraktion F2.6 ließ sich keine deutliche Mutagenität nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte mittels einer weiteren HPLC-Sequenzierung der Probe F2.7 gezeigt werden, dass der Großteil der Wirkung im Ansatz mit S9-Mix auf eine einzige Fraktion (F2.7.8 mit Induktionsfaktoren bis zu 5,9) zurückgeführt werden kann. Ein besonderer Schwerpunkt wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen auf die Fraktion F2.8 gelegt, da diese Fraktion unabhängig von exogener Biotransformierung mutagen wirkte.

Abb. 6.5 zeigt die Mutagenität dieser HPLC-Fraktionierung im Ames Test. Im Ansatz mit S9 konnte die hohe Mutagenität der Summe aller Fraktionen (MF2.8x) auf die Teilfraktion F2.8.7 zurückgeführt werden, die einen Induktionsfaktor von 10 (!) bewirkte.

Im Ansatz ohne S9 wirkten mehrere Teilfraktionen (F2.8.4-F2.8.8) deutlich mutagen, wobei insgesamt niedrigere Induktionsfaktoren als im Ansatz mit S9 nachgewiesen werden konnten. In der Fraktion F2.8.7 konnte somit eine Substanz, bzw. Substanzklasse detektiert werden, die erst nach exogener Metabolisierung stark mutagen wirkte. Nachfolgende chemische Analyen dieser Fraktion im GC/MS ergaben eine Dominanz von PAHs der Molekulargewichte 264 und 266, für die bisher nur wenige biologische Wirkdaten vorliegen. Dieser Befund zeigt, dass mittels bioassay-gesteuerter Fraktionierung auch toxisch wirkende Substanzen detektiert werden können, die bei einer reinen chemischen Analytik nicht weiter aufgefallen wären.

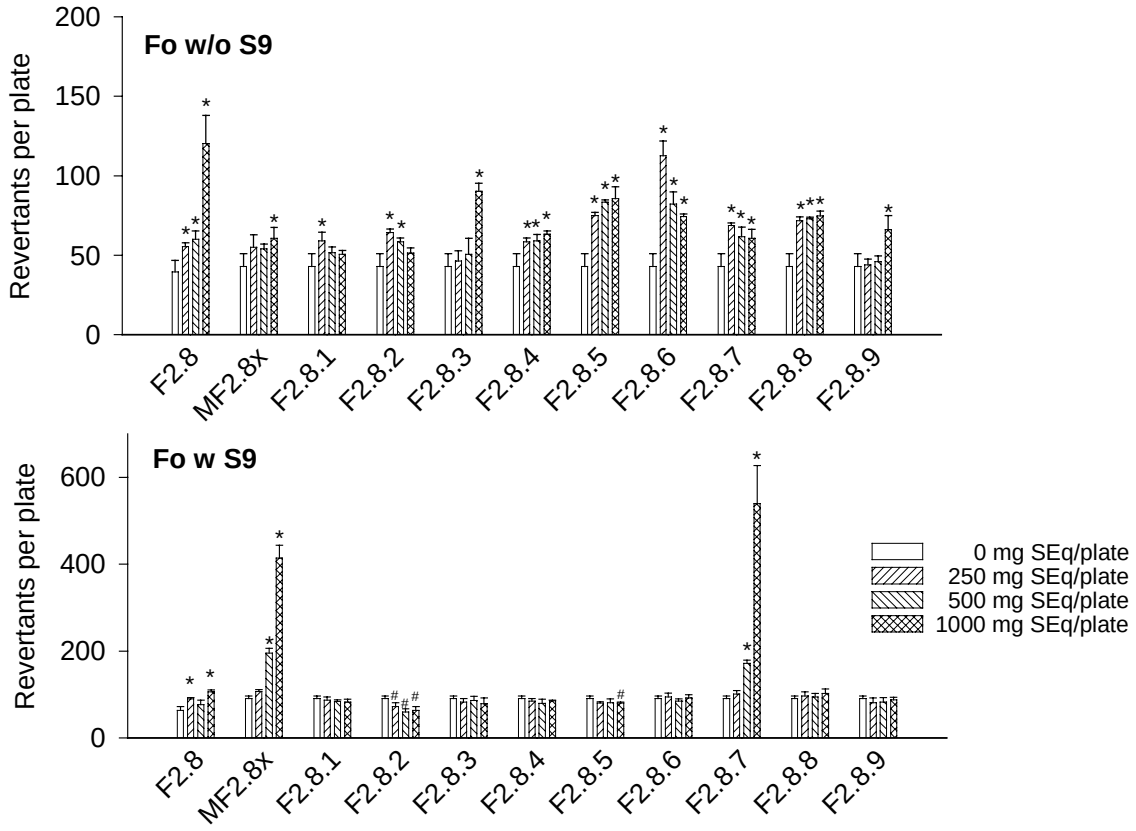


Abb. 6.5. Mutagenität der Fraktionen einer Biotest-geleiteten Fraktionierung der HPLC-Fraktion F2.8. Die mit * markierten Konzentrationen bewirkten eine signifikante Mutagenität (Dunnett-Test mit $p < 0,05$). F2.8 = Ausgangsfraktion, F2.8.1-F2.8.9 = Einzelfraktionen, MF2.8x = Summe der Fraktionen F2.8.1-F2.8.9 Konzentrationen bei F2.8: 62,5 mg, 250 mg und 1000 mg (SEq pro Platte).

HPLC-Fraktionierung der Unterprobe F3 (polarere Verbindungen). Abb. 6.6 zeigt die Mutagenität der Teilfraktionen einer peakorientierten HPLC-Auftrennung der Fraktion F3 mit polareren nicht dissoziieren Verbindungen (Abschnitt 2.2.6) im Ames-Test Stamm TA 98. Während im Ansatz ohne S9 die Mutagenität der Fraktion F3 auf die Teilproben F3.4, F3.5 und F3.6 zurückgeführt werden konnte, konnte im Ansatz mit S9 ein sprunghafter Anstieg der mutagenen Wirkung der Teilprobe F3.4 (Induktionsfaktor 7,0) gegenüber der ursprünglichen Probe F3 (Induktionsfaktor 2,3) nachgewiesen werden.

Aufgrund der hohen Aktivität der Teilprobe F3.4 wurde diese einer weiteren HPLC-Fraktionierung unterzogen. Beim Ansatz mit S9 konnte weder in den Teilproben noch in der Summe der Fraktionen eine signifikante Mutagenität festgestellt werden. Somit scheinen die Substanzen, die im Extrakt F3.4 für die deutliche mutagene Wirkung im Ansatz mit S9 verantwortlich waren, bei der weiteren Fraktionierung an der HPLC-Säule adsorbiert und durch die sequenzielle Elution nicht mehr desorbiert worden zu sein. Im Gegensatz dazu konnten im Ansatz ohne S9-Supplementierung 41 % der Mutagenität der Ausgangsfraktion F3.4 auf die Teilprobe F3.4.4 zurückgeführt werden (Abb. 6.7).

Somit geht ein großer Anteil der mutagenen Aktivität der polareren Inhaltsstoffe von Substanzen aus, die in der Teilprobe F3.4.4 eluieren und keiner Aktivierung durch das P450-System benötigen. Obwohl in der Probe F3.4.4 einige Peaks im GC/MSD (Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion) nachgewiesen werden konnten, ließen sich diese und damit die chemische Identität der Substanzen mit Hilfe der Spektrenbibliothek nicht näher identifizieren (persönliche Mitteilung Dr. Brack, Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle).

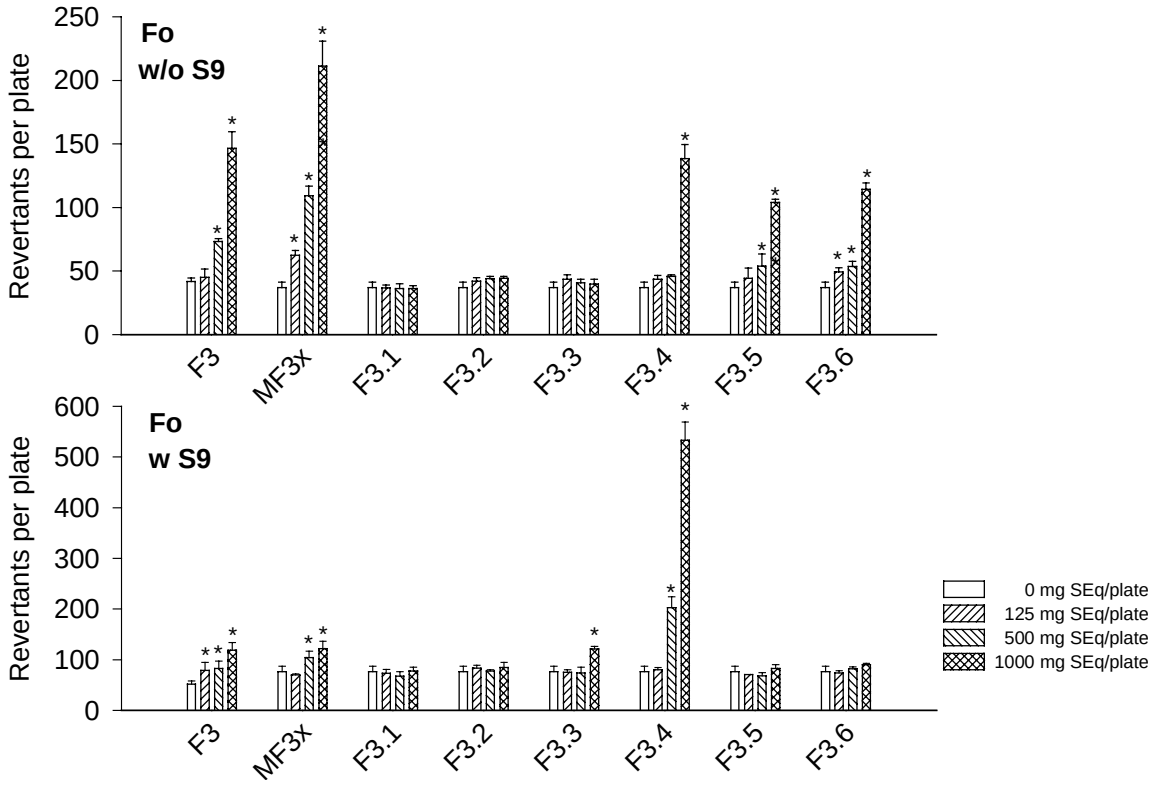


Abb. 6.6 Mutagenität der Fraktionen einer biotestgeleiteten Fraktionierung der Aluminafraktion F3 mit HPLC. Die mit * markierten Konzentrationen bewirkten eine signifikante Mutagenität (Dunnett-Test mit $p < 0{,}05$). F3 = Aluminafraktion F3, F3.1-F3.6 = Einzelfraktionen, MF3x = Summe der Fraktionen F3.1-F3.6. Konzentrationen bei F3: 62,5 mg, 250 mg und 1000 mg (SEq pro Platte).

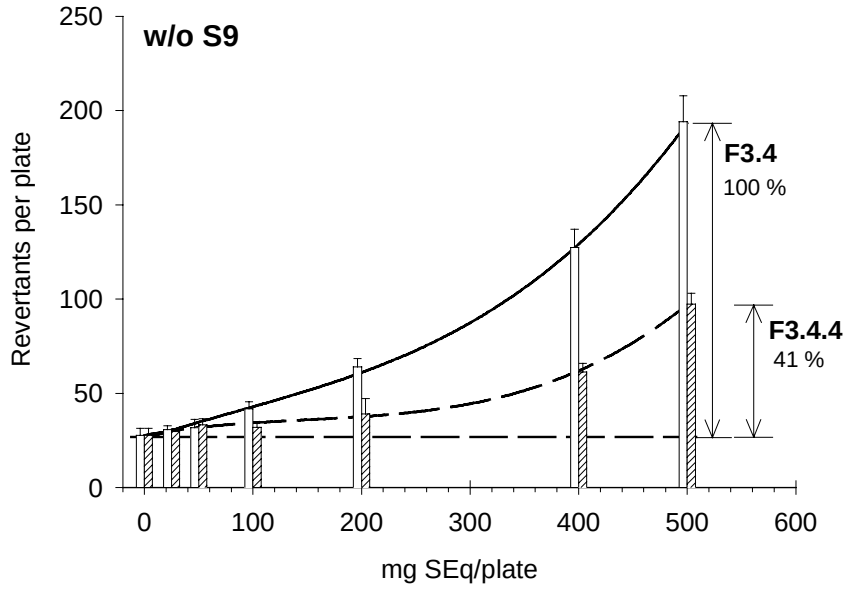


Abb. 6.7 Dosis-Wirkungsbeziehungen für die HPLC-Fraktionen F3.4 und 3.4.4 im Ames-Test ohne S9 (w/o S9). Es ist zu erkennen, dass F3.4.4 etwa 41 % der gesamten Mutagenität der Ausgangsfraktion F3.4 bewirkt.

Untersuchungen zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit

Eine Untersuchung eines Dichlormethan-Extraktes des Sedimentes vom Forellenbach nach der Kläranlageneinleitung im EROD-Assay mit der permanenten Zelllinie RTL-W1 aus der Regenbogenforelle (durchgeführt am Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle) zeigte ähnlich hohe Bio-TEQ-Konzentrationen (Abb. 6.8) wie bei der Untersuchung im EROD-Assay mit embryonaler Hühnerleberkultur (Abschnitt 4.7.9).
Die Ergebnisse der Biotest-geleiteten Fraktionierung dioxin-ähnlicher Sedimentinhaltsstoffe des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung sind bei Brack et al. (1999b, 2001b) dargestellt. Da sie für das Verständnis der Kontamination des Forellenbaches von Bedeutung sind, sollen sie hier in verkürzter Form dargestellt werden.
Während bei der Untersuchung der Primärfraktionen das höchste dioxin-ähnliche Potenzial erwartungsgemäß für die Fraktion mit den aromatischen Verbindungen (F2) detektiert werden konnte, bewirkten auch die polareren nicht-dissoziierten Verbindungen (F3) eine deutliche EROD-Induktion. Eine Subfraktionierung der Fraktion F2 ergab, dass mono- und diaromatische Verbindungen (Fraktion F2.1 mit PCDDs/Fs, PCBs, PCNs), die als die klassischen EROD-Induzierer gelten, am Standort Forellenbach 1 keinen signifikanten Beitrag zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit der Ausgangsfraktion lieferten. Dieser Befund stimmt gut mit dem in Abschnitt 4.7.9 dargestellten Vergleich zwischen chemisch-analytischen TEQs für PCDDs/Fs und PCBs und den Bio-TEQs aus dem EROD-Assay mit embryonalen Hühnerkulturen überein. Auch dort erklärten die gemessenen PCDDs/Fs und PCBs nur einen geringen der Teil der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit des Extraktes.
Im Gegensatz dazu konnten über 70 % der EROD-Aktivität der Fraktion F2 durch die Probe F2.6 erklärt werden. Nach einer weiteren Subfraktionierung der Probe F2.6 mittels Umkehrphasen-HPLC konnten in den Teilfraktionen mit hoher dioxin-ähnlicher Wirksamkeit die PAHs Triphenylen, Benz(a)anthracen, Chrysen und zahlreiche ihrer Methyl- und Dimethylderivate identifiziert werden (Brack et al. 2001a). Weiterhin konnten Thiaarene mit dem Molekulargewicht 260, eine schwefelhaltige Verbindung mit der Summenformel $C_{18}H_{10}S$ (vermutlich Heterocyclen wie Chryseno[4,5-bcd]thiophen) und verschiedene Substanzen der Summenformel $C_{20}H_{12}O$ nachgewiesen werden (Brack et al. 2001a). Über den Vergleich der PAH-Pattern konnten Brack et al. (2001a) folgern, dass beim Forellenbach bei Heidelberg im Vergleich zum Spittelwasser bei Bitterfeld, das mit der gleichen Fraktionierungsmethode untersucht wurde, die pyrogene Belastung von größerer Bedeutung ist.

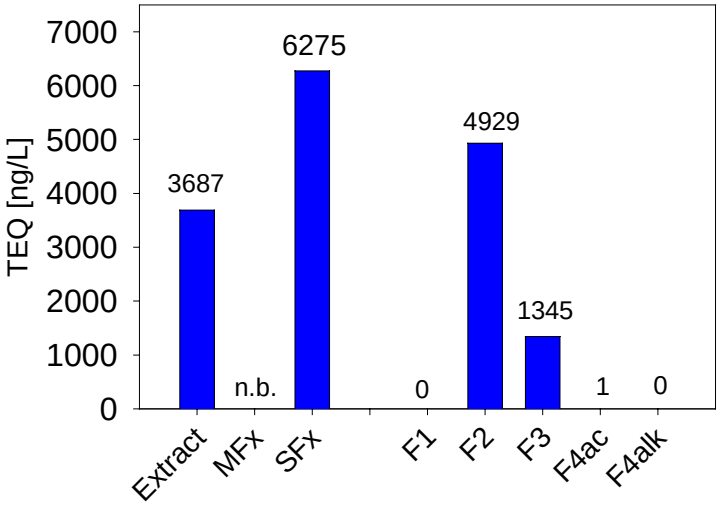


Abb. 6.8 Dioxinähnliche Wirksamkeit der Fraktionen der Alumina-Fraktionierung eines Sedimentextraktes des Forellenbaches 1 im EROD-Assay mit der Zelllinie RTL-W1. Die EROD-Induktion ist als Bio-TEQ dargestellt (aus Brack et al 2001b).

Diskussion und Ausblick

Die Befunde zeigen, dass die Bioassay-dirigierte Fraktionierung mit Säulenchromatographie und HPLC sowie einfachen *In vitro*-Screeningtests ein geeignetes Verfahren zur näheren Identifizierung des cytotoxischen, gentoxischen, mutagenen und dioxin-ähnlichen Schädigungspotenzials von Sedimentproben darstellt.

Cytotoxizität. Die Cytotoxizitätsbefunde des Rohextraktes und der Alumina-Fraktionierung zeigen, dass polarere, nicht mehr von der Säule eluierbare Substanzen etwa 50 % zum gesamten Schädigungspotenzial beitragen. Die starke Schädigung der Zellen nach S9-Supplementierung durch die Fraktion F2 mit unpolaren aromatischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen halogenierten Kohlenwasserstoffen (PCBs, PCDDs/Fs, PCNs) deutet auf die Dominanz von solchen Substanzen hin, die eine Toxifizierung durch P450-abhängige Enzymsysteme erfahren (Benford et al. 1988, Elliott et al. 1992, Fry 1982, Hollert et al. 2000a, Segner 1998). Auch die Fraktion F3 mit polareren, nicht-dissoziierten Verbindungen (Phenole, Nitroverbindungen, Epoxide, Ester und Ether) wurde durch S9-Mix toxifiziert und lieferte einen deutlichen Beitrag zur Gesamtcytotoxizität. Eine ähnliche Verteilung der Cytotoxizität konnten Braunbeck et al. (1997b) und Hollert et al. (1998a) für die Neutralfraktion von Hochwasserschwebstoffen des Neckars mit einer Säulenchromatographischen Auftrennung mit Florisil nachweisen und die Befunde in den unpolareren Fraktionen mit hohen Konzentrationen an PAHs aber auch Phtalaten, Estern und aliphatischen Kohlenwasserstoffen korrelieren (Dürr et al. 2000, Hollert & Braunbeck 1997). Maltby et al. (1995a) konnten bei einer Fraktionierung eines Dichlormethan-Sedimentextraktes mit folgender Silica-Gel-Chromatographie und dem biologischen Endpunkt Mortalität bei dem Amphipoden *Gammerus pulex* die höchste Toxizität in der Pentan- bis Dichlormethan-Fraktion nachweisen. Über die Bioassay-dirigierte Fraktionierung vermochten sie eine signifikante Verschlechterung der Diversitätsstruktur des untersuchten Ökosystems auf aromatische Kohlenwasserstoffe (insbesondere PAHs, Boxall & Maltby 1995) aber auch Schwermetalle (Zn, Cu) zurückführen, die über einen Abfluss einer Autobahn in den Vorfluter gelangt waren (Maltby et al. 1995b). Ishaq (1999) untersuchte Florisil-, Silica- und HPLC-Fraktionen von Schwebstoffextrakten aus Stockholm nach Nanoinjektion in Eier von *Salmo trutta* bezüglich ihrer embryotoxischen Wirksamkeit. Insbesondere für planare aromatische Verbindungen wie PCBs und PCDDs/Fs, aber auch für polarere Verbindungen konnte eine Teratogenität nachgewiesen werden. Brack et al. (1999a) konnten am Beispiel eines Sedimentextraktes des Spittelwassers bei Bitterfeld zeigen, dass mit Hilfe einer Biotest-geleiteten Fraktionierung mit Säulenchromatographie und HPLC das toxische Schädigungspotenzial gegenüber einer Biotestbatterie sehr genau charakterisiert werden konnte. Tributylzinn konnte bei allen verwendeten Biotests als Hauptverursacher der Toxizität identifiziert werden, Methylparathion schädigte *Daphnia magna* sehr stark, Prometryn, N-phenyl-ß-naphtalen-Amin und PAHs schädigten die Alge *Scenedesmus vacuolatus* stark. Im Gegensatz zu den anderen Studien führten Brack et al. (1999a) auch eine Konfirmation der analysierten Substanzen durch, um die Wirksamkeit der analysierten Substanzen zu bestätigen. Neben diesen Studien zur Identifizierung organischer Belastung wurden zahlreiche Untersuchungen zur Fraktionierung und Identifizierung anorganischer Schadstoffe (Schwermetalle, Schwefel, Ammoniak) durchgeführt (Besser et al. 1998, Boucher & Watzin 1999, Burgess et al. 2000, Ho 1997, Ho et al. 1999a, b).
In Übereinstimmung mit Castano et al. (1994), Munoz et al. (1994) und Vega et al. (1994, 1996) kann auch aus den Befunden dieser Fraktionierungsstudie abgeleitet werden, dass der akute Zelltest mit RTG-2-Zellen sehr gut mit Biotest-geleiteten Fraktionierungen kombiniert werden kann. Während der Test bei der Untersuchung nativer Abwasserproben aufgrund seiner geringen Empfindlichkeit vom Fischeitest mit *Danio rerio* (DIN 38 415-Teil 6, 2001) als Ergänzungs- bzw. Ersatzmethode für den Fischtest mit der Goldorfe verdrängt wurde, kann er durch seine gute Korrelation zu Toxizitätsbefunden *in vivo* (Schulz et al. 1995), die einfache Durchführung und das geringe benötigte Probenvolumen

für die Untersuchung von aufkonzentrierten Fraktionen empfohlen werden (Neumann-Hensel et al. 2000a,b).

Mutagenität und Genotoxizität. Nehls et al. (1998) konnten bei einer Alumina-Fraktionierung eines hochkontaminierten Sedimentes aus der Region Bitterfeld und nachfolgenden Überprüfung im Comet-Assay mit RTG-2- und RTL-W1-Zellen eine analoge Verteilung der gentoxischen Wirkung wie in dieser Studie nachweisen.
Die dokumentierte bakterientoxische Wirkung und/oder Suppression der mutagenen Wirkung wurde auch in anderen Studien beschrieben. So kann beispielsweise ein fehlender Hintergrundrasen auf Ames-Platten (Maron & Ames 1983) oder die Abnahme der Anzahl von Revertanten mit steigender Konzentration (Zeiger & Pagano 1984) als Indikator für eine bakterientoxische Wirkung der Proben dienen. Bei komplexen Gemischen, wie Sedimenten, lässt sich oftmals eine einfache Bestimmung der mutagenen Wirkung nicht durchführen, weil Bakterientoxizität oder Suppression der mutagenen Wirkung durch Interaktionen zwischen verschiedenen Sedimentinhaltsstoffen auftreten können (Jarvis et al. 1996). Eine große Gefahr bei einer solchen Maskierung der Mutagenität sind falsch-negative Ergebnisse, die ein Sediment mit mutagen Schädigungspotenzial als unproblematisch erscheinen lassen (Jarvis et al. 1996). Auch das Gesamtextrakt des hier untersuchten Forellenbachsedimentes erwies sich zwar als statistisch signifikant mutagen, wäre aber gemäß der DIN zum Ames-Test (38415-4), die Induktionsfaktoren über 2 fordert, als nicht mutagen klassifiziert worden. Die hier dargestellten Ergebnisse, aber auch die Ergebnisse anderer Studien (Grifoll et al. 1988, Samolloff et al. 1983) zeigen, dass einfach Bioassay-dirigierte Fraktionierungen oftmals Maskierungen der Mutagenität identifizieren können. Um eine Mutagenität von Sedimenten sicher ausschließen zu können, sollten daher neben Gesamtextrakten auch Teilproben einfacher Fraktionierungen untersucht werden.
Die Befunde zeigen, dass von PAHs mit einem Molekulargewicht von 264-266 (Fraktion F.2.8.4-8) und nicht-identifizierten Substanzen in einer Fraktion mit der Beispielsubstanz Benzo[a]pyren (MG 252) ein großer Anteil der mutagenen Wirkung der unpolaren Aromaten (Fraktion F2) ausging. Auch in anderen Studien konnte ein Großteil der mutagenen Wirkung auf PAHs zurückgeführt werden. LaRocca et al. (1996) konnten bei einer Biotest-geleiteten Fraktionierung von Sedimenten der Lagune von Venedig mit den Ames-Stämmen TA 98 und TA100 70%-80% der Gesamtmutagenität durch PAHs erklären. Auch bei einer Untersuchung von HPLC-Fraktionen von Schwebstoffen aus dem Archipel von Stockholm und der Baltischen See konnte die höchste Mutagenität im Ames-Test mit dem Stamm TA 100 in den Fraktionen der Polyaromaten nachgewiesen werden (Broman et al. 1994).

7 Ein kombiniertes ökotoxikologisches und hydraulisches Untersuchungskonzept für die Beurteilung des Erosionsrisikos und des Schädigungspotenzials von kontaminierten Sedimenten in staugeregelten Flüssen

Zusammenfassung. *Sedimente stellen Senken für gelöste Wasserinhaltsstoffe dar, die eine hohe Affinität zu feinkörnigen Schwebstoffen besitzen. Durch eine Remobilisierung hochkontaminierter Altablagerungen können Sedimente aber auch zur Quelle einer erneuten Belastung des aquatischen Ökosystems werden.*
Vor diesem Hintergrund wurden in einem integrierten Ansatz zwei Untersuchungsstrategien angewendet, um das Schädigungspotenzial von Sedimenten aus der Neckarstauhaltung Lauffen und das Risiko einer Remobilisierung von Altsedimenten zu analysieren.

(1) Jeweils 2 Bohrkerne verschiedener Sondierungsstandorte wurden entnommen und bezüglich ihrer chemischen und biologisch wirksamen Belastung aber auch verschiedener sedimentologischer Parameter untersucht. Korrespondierende Bohrkerne wurden in einem Strömungskanal auf ihre Erosionsstabilität untersucht. Über den Vergleich der kritischen Schubspannungen aus den Strömungsexperimenten mit Daten aus dem Fließgewässer wurde das Remobilisationsrisiko bestimmt. Es konnte an einem Fallbeispiel gezeigt werden, dass geringer kontaminierte Jungsedimente durch eine Erosionsdiskordanz (Indikator für Hochwassereinschnitte) von hochkontaminierten Altsedimenten abgegrenzt waren. Im Bereich der Erosionsdiskordanz konnte ein sprunghafter Anstieg der Schwermetall- und PCB-Konzentrationen um einen Faktor 10 bis 50 und ein signifikanter Anstieg des cytotoxischen und mutagenen Potenzials nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zum Remobilisationsrisiko zeigten, dass ab einer Schubspannung von 10 Pa, die einem Hochwasser mit einer 5-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit entspricht, auch hochkontaminierte Altsedimente erodiert werden können.
(2) Ein Hochwasser im Herbst 1998 mit einer etwa 20-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit wurde mit hydrologischen, limnochemischen und chemischen Methoden sowie Biotests zur akut toxischen, gentoxischen und endokrinen Wirksamkeit an den Stauhaltungen Heidelberg und Lauffen untersucht. Es konnte ein deutlich höheres Schädigungspotenzial in In vitro-Biotests als für ein mittleres Neckarhochwasser im Jahre 1995/96 nachgewiesen werden, so dass aufgrund der Bioassays eine Remobilisation von Altsedimenten angenommen werden konnte. Auch deutlich erhöhte Cadmiumkonzentrationen in Schwebstoffen der Stauhaltungen Heidelberg und Lauffen (bis zu 28 mg/kg) unterstützen die Hypothese einer Erosion kontaminierter Altsedimente. Eine Frachtbilanzierung auf Basis experimenteller Befunde ergab, dass erodierte Sedimente aus der Stauhaltung Lauffen bis zu 17 % der gesamten Schwebstofffracht in Heidelberg beitrugen.

Aus dieser Studie entstandene Publikationen

Hollert, H., Dürr, M., Haag, I., Winn, N., Holtey-Weber, R., Kern, U., Färber, H., Westrich, B., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000. A combined hydraulic and in vitro bioassay approach to assess the risk of erosion and ecotoxicological implications of contaminated sediments in a lock-regulated river system. In: BfG (Editor), Sediment assessement in European River Basins, Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Berlin, Vol. 22 : 156-160.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. Environ. Toxicol. and Chem., 19(3): 528-534.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1998. Wie giftig sind Schwebstoffe und Sedimente des Neckars? Zur Eignung von Biotests und Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken für die Bewertung des Schadstoffpotenzials in hydrologischen Fallstudien. In: H. Karrasch, W. Gamerith, T. Schwan, K. Sachs and U. Krause (Editors), HGG-Journal 13, Heidelberg, pp. 130-145.

Einleitung. Aus mehreren Untersuchungen ist bekannt, dass zahlreiche umweltrelevante Schadstoffe eine hohe Affinität zu feinkörnigen Schwebstoffen aufweisen und daher vorzugsweise in strömungsberuhigten Zonen eines Gewässers als Sedimente zur Ablagerung kommen (ARGE-Elbe 1992, Glück-Macholdt & Lieser 1988, Gratzer & Ahlf 1999a, Rao et al. 1990, Sturm & Gandraß 1988, Sturm et al. 1986, Vahl 1997, Zimmer & Ahlf 1994). In den frühen siebziger Jahren konnten Förstner & Müller (1974) bei einer Untersuchung der Schwermetallbelastung in der Tonfraktion von Sedimenten ausgewählter deutscher Flüsse eine starke Belastung des Neckars mit den Elementen Cadmium, Nickel und Chrom feststellen. Insbesondere die Cadmiumkonzentrationen der Sedimente im Unterlauf der Enz, in der eine Anreicherung des Elementes um den Faktor 300 im Vergleich zu entsprechenden „präindustriellen“ tonigen Sedimenten ermittelt werden konnte, gaben Anlass zu ernster Besorgnis (Förstner & Müller 1974), nicht zuletzt aufgrund einer möglichen Bioakkumulation des Metalls in aquatischen Organismen (Prosi & Segner 1986). Fische aus der Enz und aus dem Neckar unterhalb der Mündung der Enz erwiesen sich als stark cadmiumbelastet und daher als nicht mehr für den menschlichen Verzehr geeignet (Förstner & Müller 1974). Für landwirtschaftlich genutzte Flächen, die mit Schlämmen aus den Stauhaltungen unterhalb der Enz gedüngt wurden, musste ein Anbauverbot ausgesprochen werden, zumal die Aufnahme des Metalls durch die Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Müller et al. 1993).

Insgesamt ist die Schwermetallbelastung der Neckarsedimente innerhalb der letzten 30 Jahre stark zurückgegangen. Der Rückgang vollzog sich vor allem zwischen 1972 und 1985 als eine Folge des verstärkten Baus und Ausbaus industrieller wie kommunaler Kläranlagen (Müller 1992, 1993). Die Cadmiumbelastung, die im wesentlichen auf einen farbenherstellenden Betrieb an der in den Neckar mündenden Enz zurückgeführt werden konnte, ging durch die Inbetriebnahme einer modernen Kläranlage stark zurück (Müller 1992); in Sedimentproben konnte bei Untersuchungen an der Staustufe Lauffen eine geringe Konzentration in den jüngeren, oberen Sedimenten und eine hohe Konzentration in den Altsedimenten nachgewiesen werden (Müller et al. 1993). Allgemein anerkannt ist heute, dass in den Sedimenten vieler Flüsse Schadstoffe in weitaus größeren Mengen gespeichert sind als jährlich aus externen diffusen und punktuellen Quellen in die Gewässer eingetragen werden (Haag et al. 2000b, Power & Chapman 1992). Es konnte berechnet werden, dass die jährlichen Cadmium-Emissionen im gesamten Einzugsgebietes des Neckars etwa 0,84 t betragen (Fuchs et al. 1999a). Im Vergleich dazu sind in den Sedimenten einer einzigen Staustufe bei Lauffen etwa 11 t Cd akkumuliert (Haag et al. 2000b). Bei „normalen“ hydrologischen Verhältnissen sind die Schwermetalle aber auch die organischen Schadstoffe durch die vorherrschenden Redoxverhältnisse und die Überdeckung mit Jungsedimenten weitgehend immobil (Regierungspräsidium Stuttgart 1993, Kern & Westrich 1995). Bisher ist nicht geklärt, ob und in welchem Maße die in den Sedimenten gespeicherten Schadstoffe durch Erosion bei Hochwasser remobilisiert werden und inwieweit sie zu einer nachhaltigen Beeinträchtigung der Gewässergüte führen.
Der mögliche Einfluss von Altsedimenten der Stauhaltung Lauffen auf die Gewässergüte und insbesondere die Gefahr einer Remobilisierung wurden in den letzten Jahren mit hydrologischen und chemischen Methoden im Detail untersucht (Kern & Westrich 1995, 1996, Müller 1991, Müller et al. 1993, Regierungspräsidium Stuttgart 1993). Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Notwendigkeit der Entfernung von 1,6 Mio. m³ schwermetallkontaminierten Schlammablagerungen aus

den Stauhaltungen zu überprüfen. Während eine Studie des Regierungspräsidiums Stuttgart (1993) unter Einsatz von chemisch-analytischen und hydraulischen Einzelstudien zum Schluss kommt, dass die stark kontaminierten Altsedimenten aus Neckar-Stauhaltungen nicht remobilisiert werden können und damit von diesen keine Gefährdung für Mensch und Ökosystem ausgeht, konnten jüngere Studien eine differenziertere Gefährdungssituation aufzeigen: Bei Untersuchungen zur stratigraphischen Verteilung des zelltoxischen Potenzials von Sedimenten der Stauhaltung Lauffen konnte gezeigt werden, dass auch oberflächennahes Sediment ein vergleichbar hohes Schädigungspotenzial wie Sedimente aus großen Entnahmetiefen besitzen kann (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1999a). Laborexperimente von Martin et al. (1996) zeigten, daß die Resuspension von kontaminierten Sedimenten, wie sie sich im Bereich der Staustufe Lauffen/Neckar befinden, auch unter pH-neutralen Bedingungen zu einer Labilisierung oder Freisetzung von Cadmium führen kann. Analysen der partikulär gebundenen Schwermetallkonzentrationen während eines Hochwasserereignisses im Jahr 1994 lassen eine Erosion von Altsedimenten vermuten (Kern & Westrich 1996, 1997). Mit Hilfe einer Quellkomponenten-Mischungsanalyse von Hochwasserschwebstoffen unterhalb der Stauhaltung Lauffen konnten Haag et al. (2000a, b) zeigen, dass während dieses Hochwasserereignisses offenbar Altsedimente remobilisiert wurden: 88% der unterstromigen Schwebstofffracht wurden vom Oberstrom eingetragen, erodierte gering belastete Jungsedimente trugen 10 % und erodierte Altsedimente 2 % (=5000 t) zu den unterstromigen Schwebstoffen bei. Trotz ihres geringen Anteils an der Schwebstofffracht trugen die erodierten Altsedimente der Stauhaltung jedoch ca. 30 % zur gesamten partikulär gebundenen Cadmiumfracht während des Hochwasserpeaks bei. Eine ökotoxikologische Untersuchung von Hochwasserschwebstoffen in Heidelberg zeigte bereits bei einem mittleren Hochwasserereignisses (HQ_1, etwa einjährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit) eine signifikante Erhöhung des cytotoxischen Schädigungspotenzials, aber keine signifikante Mutagenität (Hollert et al. 1996).
Diese Befunde lassen eine *integrierte* Untersuchung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials von Altsedimenten und der Gefahr einer möglichen Remobilisierung durch Hochwasserereignisse als längst überfällig erscheinen. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Wasserbau der Universität Stutt-

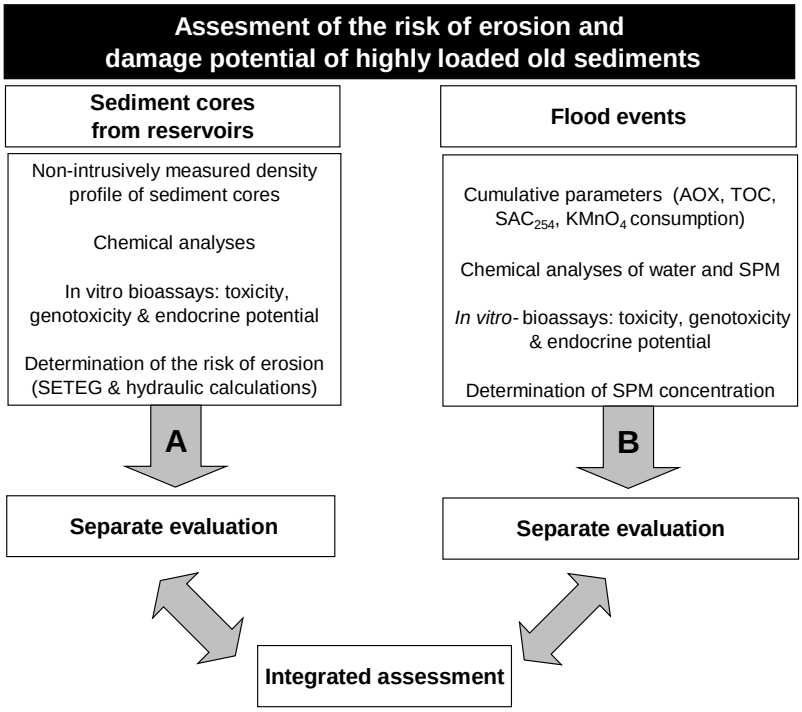


Abb. 7.1. Übersicht über die angewandte integrierte Untersuchungsstrategie zur Bewertung des Remobilisationsrisikos von Altsedimenten in staugeregelten Flüssen; aus Hollert et al. (2000).

gart (Dipl. Hyd. Haag, Dr. Kern, Prof. Dr. Westrich), dem Hygiene-Institut Heidelberg (Dipl. Chem. Dürr, Dr. Erdinger) und dem Hygiene-Institut Bonn (Dipl. Lebensmittelchem. Holtey-Weber, Dr. Färber) wurde das Remobilisationsrisiko von Sedimenten mit einer Reihe hydrologischer, limnologischer, chemisch-analytischer und biologischer Endpunkte untersucht. Teile der Hochwasseruntersuchungen wurden im Rahmen von Diplomarbeiten untersucht (Winn 2000, Wetterauer 2001).
Abb. 7.1 gibt eine Übersicht über das integrierte Untersuchungskonzept, das aus der Untersuchung von Sedimentbohrkernen (A) und der Untersuchung von Hochwasserereignissen (B) besteht:

- **Untersuchung von Sedimentbohrkernen:** Jeweils 2 Sedimentbohrkerne verschiedener Probestellen aus der Staustufe Lauffen, die für ihre stark kontaminierten Altsedimente bekannt ist, wurden entnommen und mit einem interdisziplinären Ansatz untersucht: Mit Hilfe einer zerstörungsfrei arbeitenden Gamma-Strahl-Dichtemessanlage wurde die sedimentologische Ähnlichkeit der Bohrkerne überprüft und Dichtesprünge (Indikator für Hochwassereinschnitte) ermittelt (Haag et al. 1999a). Bei gegebener sedimentologischer Ähnlichkeit wurde jeweils ein Kern segmentiert und mit chemisch-analytischen Methoden sowie biologischen Wirktests auf sein cytotoxisches und mutagenes Schädigungspotenzial und Konzentrationen von Schwermetallen und PCBs hin untersucht. Der korrespondierende Bohrkern wurde in einem Strömungskanal (SETEG-System; Kern et al. 1999) auf seine tiefenabhängige Erosionsstabilität überprüft. Aus dem Vergleich der ermittelten Erosionsgrenzwerte mit den im Gewässer auftretenden sohlnahen Strömungskräften ist es möglich, Aussagen darüber zu treffen, ab welchem Abfluss das Sediment erodiert werden kann (Haag et al. 1999a, 2001).
- **Untersuchung von Hochwasserschwebstoffen:** Während bereits in zahlreichen Studien Hochwasserschwebstoffe mit chemisch-analytischen Methoden untersucht wurden, gibt es bisher erst wenige Arbeiten zu Herkunft, chemischer Belastung und biologischen Effekten von Schwebstoffen. Für ein mittleres Hochwasser am Neckar (Wieblinger Wehr) konnte im Dezember 1995 ein (öko)toxikologisches Gefährdungspotenzial durch Schwebstoffe bei relativ niedrigen Schwermetallkonzentrationen nachgewiesen werden, ohne dass für diesen Fall von einer Remobilisierung stark kontaminierter Sedimente ausgegangen werden konnte (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a, 1998b). Daher wurde in dieser Studie bei einem stärkeren Neckarhochwasser (HQ_{20}, etwa 20 jährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit) im Oktober/ November 1998 mittels chemischen Analysen und biologischen Wirktests an Schwebstoffen aus den Stauhaltungen Lauffen und Heidelberg untersucht, ob eine Erhöhung des partikelgebundenen Schadstoffpotenzials erfolgte, die auf eine Remobilisierung von stark kontaminierten Altsedimenten schließen lässt. Die Schwebstoffe der Stauhaltung Heidelberg eines weiteren Neckarhochwassers im Februar 1999 (etwa HQ_{15}) wurden auf ihr bakterientoxisches, cytotoxisches, mutagenes und endokrines Schädigungspotenzial untersucht. Bei dieser Beprobung sollte geklärt werden, ob eine schnelle zeitliche Abfolge von stärkeren Hochwasserereignissen zu einer verstärkten Remobilisation von Altsedimenten führen kann.

7.1 Untersuchungen an Bohrkernen aus der Stauhaltung Lauffen

Probennahmen. In der Zeit vom 23.3 bis zum 27.3.1998 wurden an sieben Sondierungspunkten insgesamt 16 Sedimentkerne mit Hilfe von Tauchern des Tauchschiffes Frosch vom Wasser- und Schifffahrtsamt Stuttgart entnommen. Die Lage aller Sondierungspunkte ist in Abb. 7.2 angegeben. Die weitgehend ungestörte Entnahme der zu untersuchenden Gewässersedimente erfolgte mit eigens hierfür konstruierten Stoßröhren (Länge 150 cm, Innendurchmesser 13,5 cm; Haag et al. 1999b). Die Methodik der hydrologischen und chemischen Messungen ist bei Haag et al. (1999b) und die der Ermittlung der kritischen Erosionsschubspannungen bei Kern et al. (1999) dargestellt.

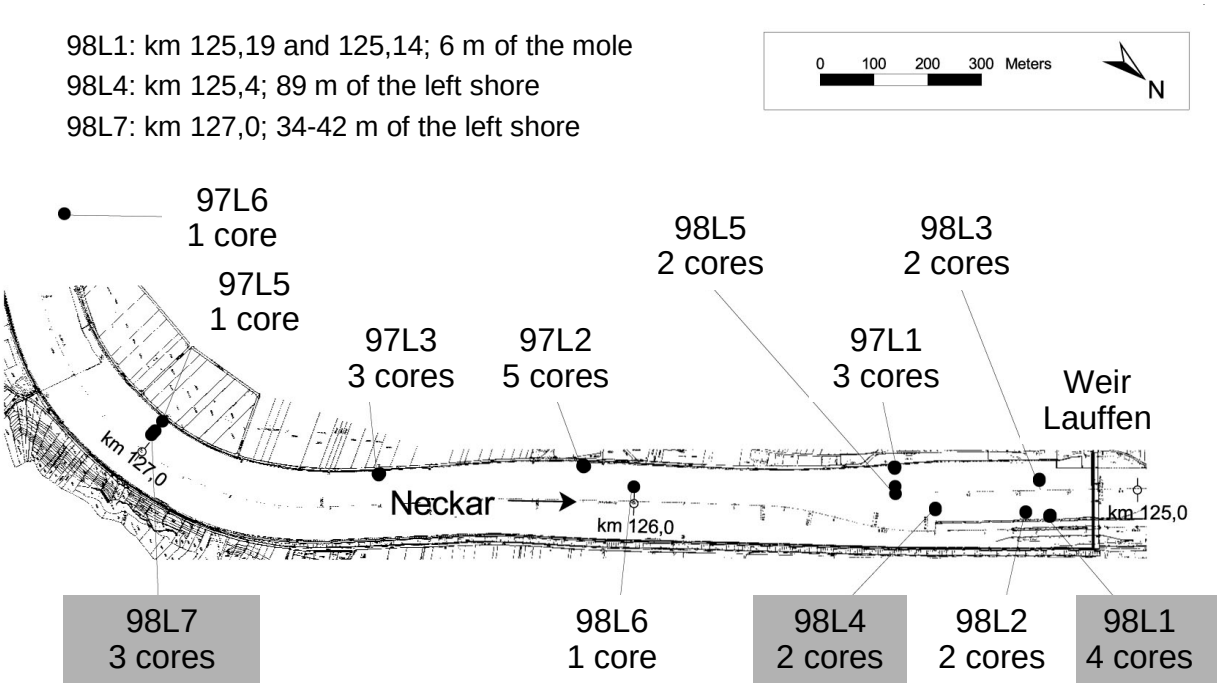


Abb. 7.2. Lage und Bezeichnungen von 12 Sondierungspunkten in der Stauhaltung Lauffen, an denen insgesamt 27 Sedimentbohrkerne entnommen und von Haag et al (1999) hydrologisch und chemisch analytisch untersucht wurden. Die in dieser Studie untersuchten Sondierungspunkte sind grau unterlegt. Die Bohrkerne dieser Standorte wurden zunächst mit Hilfe einer zerstörungsfrei arbeitenden Gamma-Strahl-Dichtemessanlage auf ihre sedimentologische Ähnlichkeit überprüft und Dichtesprünge als Indikatoren für Hochwassereinschnitte ermittelt. Jeweils ein Kern wurde für die biologischen, chemischen und radiometrischen Analysen und mindestens ein Kern für die Ermittlung der Erosionsstabilität im SETEG-System eingesetzt. Kartengrundlage: modifiziert nach Haag et al (1999b).

Befunde und Diskussion

Hydrologische und sedimentologische Parameter. In Abb. 7.3 ist ein Überblick über verschiedene hydraulische und sedimentologische Parameter von Bohrkernen der Sondierungspunkte L1 und L4 dargestellt. In einer Tiefe zwischen 5 und 20 cm (bei L4K2) sowie 22-25 cm und ab 75 cm (bei L1K3) sind die Lagerungsdichten der Sedimente deutlich erhöht (Abb. 7.3). Dies ist vermutlich auf die Ablagerung von grobkörnigerem Material zurückzuführen, wie sie typischerweise im abfallenden Ast eines Hochwassers auftritt. Die sprunghafte Dichteabnahme nach unten hin weist auf den erosiven

Einschnitt des Hochwassers in ältere, feinkörnige Ablagerungen hin (Schichtlücke bzw. Erosionsdiskordanz, Haag et al. 2001, Müller 1991). Auch die relativen Anteile der Korngröße < 20 µm an dem Gesamtsediment dokumentieren Hochwassereinschnitte in die Sedimente von L4K2 und L1K1: Während unterhalb der Erosionsdiskordanzen feinkörnige Partikel dominierten, konnte für die Hochwassereinschnitte eine sprunghafte Abnahme der relativen Häufigkeit von Partikel bis 20 µm nachgewiesen werden, die sich durch die nachlassenden Schubspannungen und beginnende Sedimentation grober Partikel im abfallenden Ast des Hochwassers erklären lässt (Haag et al. 1999a, 2001).
Aufgrund der Befunde aus der Gamma-Strahl-Dichtemessung und der Bestimmung des Korngrößenanteils unter 20 µm konnte somit für beide Kerne ein erosiver Einschnitt in Feinsedimente dokumentiert werden. Mit Hilfe dieser Methoden kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Hochwassereinschnitt in jüngere Sedimente oder in hochkontaminierte Altablagerungen stattgefunden hat. Vor diesem Hintergrund wurde vom Institut für Umweltphysik der Universität Heidelberg (Prof. Dr. Mangini) an den Sedimentkernen L1K2 und L4K2 eine Altersdatierung mit den radioaktiven Isotopen ^{210}Pb und ^{137}Cs durchgeführt, deren Ergebnisse von Herrn Haag freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Konzentrationszunahme des Isotops ^{137}Cs im Sedimentkern L1K2 ist dem Tschernobylpeak zuzuordnen, so dass für alle Sedimente oberhalb von 70 cm Sedimenttiefe eine Sedimentation nach 1986 ermittelt werden konnte. Auf Basis der ^{137}Cs-Konzentrationen konnte eine mittlere Nettosedimentationsrate von mindestens 5 cm pro Jahr errechnet werden, wogegen die ^{210}Pb-Konzentrationen eine Rate von 3 cm pro Jahr ergaben (Ingo Haag, persönliche Mitteilung). Zusammenfassend kann somit aus den radiometrischen Datierungen eine Erosion von Altsedimenten beim Bohrkern L1K2 ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnte beim Bohrkern L4K1 weder der Tschernobylpeak (1986) noch der Atombombenpeak von 1963 nachgewiesen werden. Daher kommen bezüglich des Alters zwei Möglichkeiten in Frage: Der Tschernobylpeak könnte unterhalb von 85 cm liegen, so dass der gesamte Bohrkern jünger als 1986 wäre. Es könnte aber auch der Tschernobylpeak durch Hochwasserereignisse wegerodiert worden sein. In diesem Falle wäre das Sediment oberhalb der Erosionsdiskordanz jünger als 1986 und die Ablagerungen unterhalb der Diskordanz wären den Jahren 1963 bis 1986 zuzuordnen. Bei Berücksichtigung des sprunghaften Anstieges der ^{210}Pb-Konzentrationen des Bohrkernes L4K2 erscheint im Vergleich zum linearen Verlauf beim Bohrkern L1K2 die Hypothese einer Erosion des Tschernobylpeaks wahrscheinlicher.

Schwermetallbelastung. Abb. 7.5 zeigt die Korrelation der Kupfer- und Cadmiumkonzentrationen in den Sedimenten < 20 µm der Stauhaltung Lauffen. Es ist zu erkennen, dass fast alle Messpunkte zwei Belastungsclustern zugeordnet werden können, die durch einen Cadmiumgrenzwert von 10,8 mg/kg Sediment und 193 mg/kg für Kupfer getrennt werden. Diese Verteilung kann aus der punktuellen Einleitung ungeklärter Abwässer der BASF Farben und Fasern AG in den Neckarzufluss Enz erklärt werden, die fast ausschließlich für die hohe Cadmium- und Kupferbelastung der Altsedimente verantwortlich war (Müller 1991, 1992, 1993). Ab 1973 wurden die punktuellen Emissionen durch den Bau einer Betriebskläranlage in Besigheim eliminiert (Müller 1991). Abgesehen von kontaminierten Schwebstoffen aus remobilisierten Altsedimenten der Enz kommen somit keine drastischen Cadmiumquellen mehr in Frage. Durch diese Situation können an den Stauhaltung Lauffen bezüglich der Cadmium-, Chrom- und Kupferkonzentrationen hochkontaminierte Altsedimente (vor 1973 abgelagert) und geringer kontaminierte Jungsedimente unterschieden werden. Die Profile der Schwermetallbelastung der Bohrkerne L1K2 und L4K2 zeigen eine unterschiedliche Belastung mit den stark toxischen Elementen Cadmium, Kupfer und Chrom (Abb. 7.4): Für den Bohrkern L1K2 konnte insgesamt eine relativ niedrige Schwermetallbelastung (Güteklassen II, II-III der LAWA, 1998) mit nur geringen Schwankungen über den gesamten Bohrkern nachgewiesen werden.

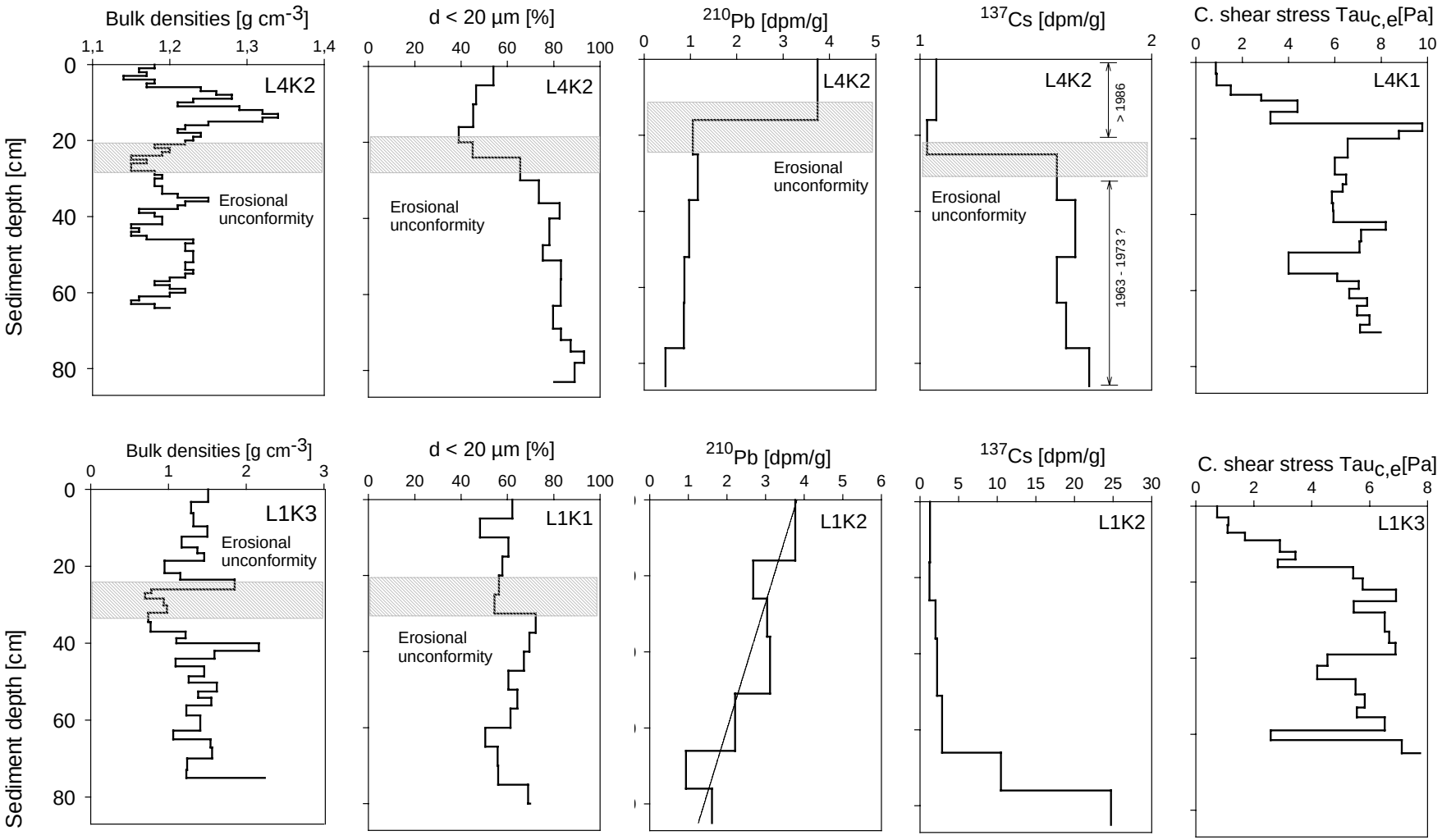


Abb. 7.3. Übersicht über die Befunde aus hydrologischen und radiometrischen Messungen an Bohrkernen aus der Stauhaltung Lauffen. Die Dichteprofile (Bulk densities), der relative Anteil der Korngröße d < 20 µm am Gesamtsediment, die Befunde aus radiometrischen Messungen der Isotope ^{210}Pb und ^{137}Cs sowie die kritische Erosionsschubspannungen (C. shear stress) aus dem Strömungskanal (SETEG) sind in Abhängigkeit von der Sedimenttiefe der Bohrkerne dargestellt. Erosional unconformity: Erosionsdiskordanz. Datengrundlagen: Haag et al. (1999b), Radiometrische Datierungen: Umweltphysik der Universität Heidelberg (Prof. Dr. Mangini), Daten freundlicherweise von Herrn Haag zur Verfügung gestellt.

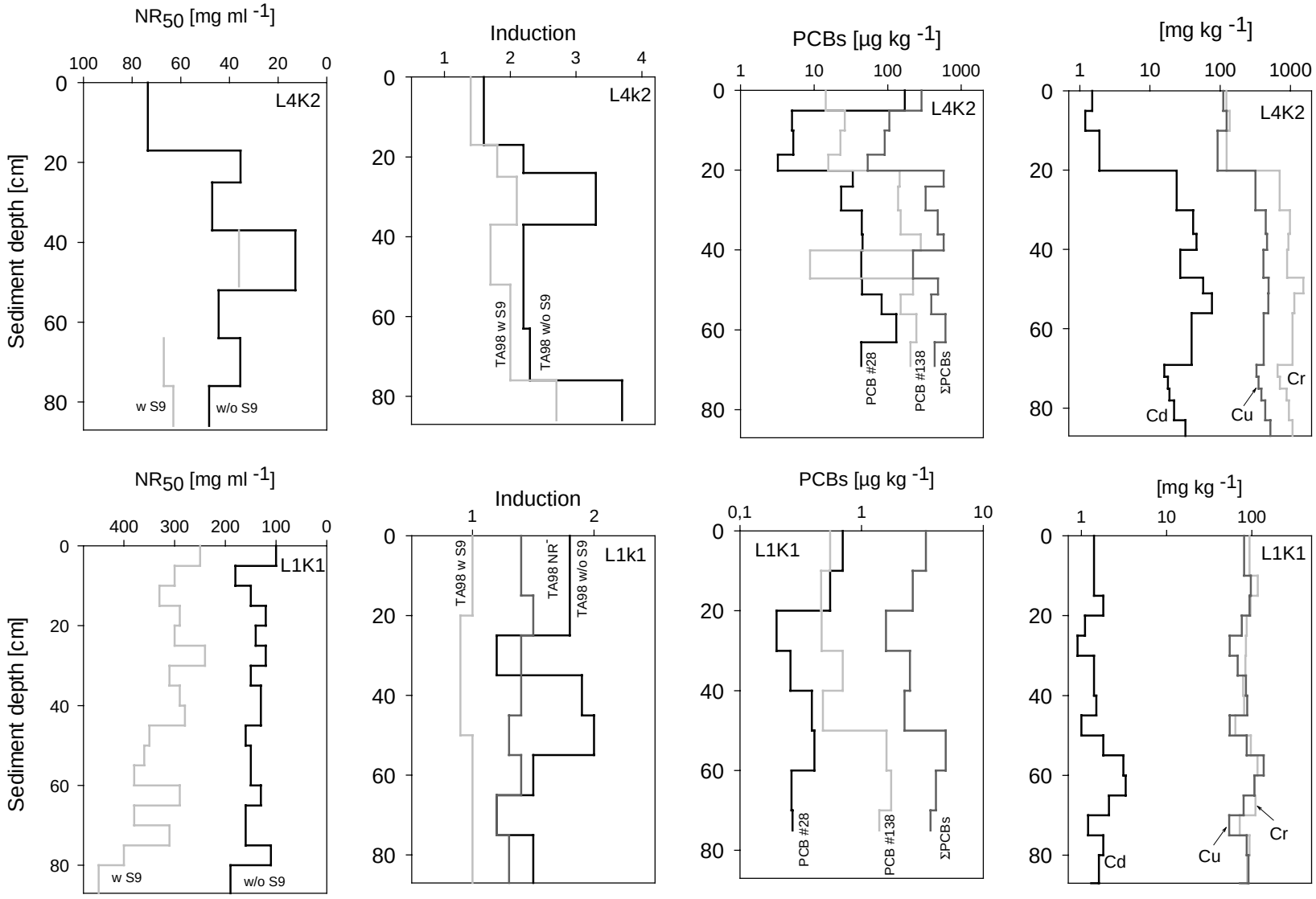


Abb. 7.4. Überblick über das biologische und chemische Schädigungspotenzial der Bohrkerne L4K2 und L1K1. Die Cytotoxizität von acetonischen Extrakten wird als NR_{50} mit (w) und ohne (w/o) S9-Supplementierung angegeben, die Mutagenität im Ames-Test mit den Stämmen TA 98 (w und w/o S9) und TA98 NR^- als maximaler Induktionsfaktor der untersuchten Dosis-Wirkungsbeziehung. Die PCB- und Schwermetalldaten wurden freundlicherweise von Herrn Haag zur Verfügung gestellt.

Leicht erhöhte Cadmiumwerte (III) ließen sich für die Segmente zwischen 55 und 65 cm zeigen. Im Gegensatz dazu ließ sich für den Sondierungspunkt L4 ein sprunghafter Anstieg der Konzentrationen von Cd, Cu und Cr um den Faktor 10 oder mehr bei einer Bohrkerntiefe von etwa 25 cm (der Tiefe der vermuteten Erosionsdiskordanz) nachweisen. Dieser Befund und die hohen absoluten Konzentrationen von bis zu 76 mg/kg Cadmium (achtfache Überschreitung des Grenzwertes für die schlechteste LAWA-Güteklasse IV, LAWA 1998) und bis zu 518 mg/kg Kupfer erlauben eine eindeutige Zuordnung der Sedimentsegmente unter 25 cm des Bohrkernes L4K1 zu den hochkontaminierten Altsedimenten. Die Schwermetallbefunde in Verbindung mit den Informationen aus hydrologischen und insbesondere den radiometrischen Untersuchungen belegen somit, dass ein Hochwasserereignis diese Altsedimente freigelegt und möglicherweise in dieses eingeschnitten hat.

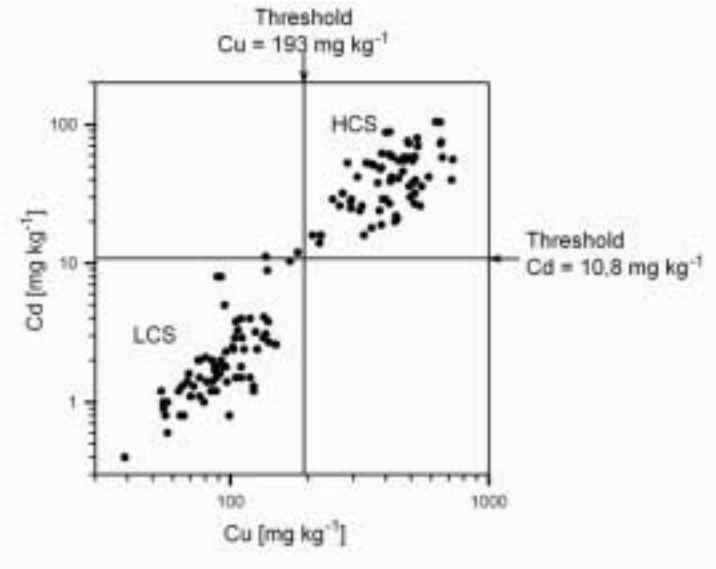


Abb. 7.5 Korrelation der Cadmium- und Kupferkonzentrationen aus 147 Sedimentproben der Staustufe Lauffen (Fraktion < 20 µm). Es kann eine Klassifikation in hochkontaminierte Altsedimente (HCS) und gering kontaminierte jüngere Sedimente (LCS) durchgeführt werden, wobei 193 mg/kg Sediment einen Grenzwert für Cu und 10,8 mg/kg für Cadmium darstellt; aus Haag et al. (2001)

Belastung mit PCBs. Für den Bohrkern L1K1 konnten analog zu den Schwermetallen auch nur geringe bis mäßige Belastungen mit PCBs nachgewiesen werden (Abb. 7.5, Haag et al. 1999b). Da seitens der LAWA keine allgemeingültige Klassifikation für PCBs existiert, sollen hier die Befunde nach den Grenzwerten von Neumann-Hensel et al. (2000a) klassifiziert werden, die auf Basis von Untersuchungen der Hamburger Umweltbehörde erarbeitet wurden (Maaß et al. 1997). Die gemessenen DIN-Kongeneren PCB # 28, 52, 101, 138, 153 und 180 (DIN 38414 Teil 20) konnten in die Güteklassen II und II-III eingeordnet werden. Extrem große Schwankungen in den Belastungen der PCBs (bis zu einem Faktor 39) konnten für den Bohrkern L4K2 nachgewiesen werden. Ein deutlicher Konzentrationssprung (von 4,4 auf 83 µg/kg für PCB # 180 und 53 µg auf 580 µg/kg für die Summe der PCBs) ließ sich im Bereich der Erosionsdiskordanz zwischen den Segmenten 16-20 und 20-24 cm nachweisen. Insbesondere für PCB #138 (Abb. 7.4.) aber auch für PCB #153 konnte eine deutliche Zunahme der Konzentrationen unterhalb der Erosionsdiskordanz nachgewiesen werden. Die Grenzwerte für eine Einordnung der Proben in die schlechteste Güteklasse IV des Klassifikationsschemas der Hamburger Umweltbehörde (Maaß et al. 1997, Neumann-Hensel et al. 2000a) wurden bei diesen Kongeneren vom Median der Messungen mehr als zweifach und von einzelnen Segmenten bis zu fünffach überschritten. Auffällig war bei der Analyse des Bohrkernes L4K2, dass die höchste gemessene Konzentration Trichlorbiphenyl PCB #28 mit 171 µg/kg (Abb. 7.4, dreifaches Überschreiten des Grenzwertes der Güteklasse IV) aber auch erhöhte Konzentrationen der PCBs #52 und #101 in der obersten Sedimentschicht nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte am Bohrkern L4K2 für die höher chlorierten Biphenyle PCB # 138, #153 und #180 eine deutliche Trennung in gering kontaminierte Sedimente oberhalb der Erosionsdiskordanz und hochkontaminierte, darunter

liegende Altsediment nachgewiesen werden. Ein deutlich unterschiedliches Verhalten von polychlorierten Biphenylen in Abhängigkeit vom Chlorierungsgrad konnte auch von Müller (1993) nachwiesen werden. Ein Vergleich der in Abb. 7.4 dargestellten PCB-Konzentrationen unterhalb der Erosionsdiskordanz mit den Daten eines Altsedimentes der Untersuchungen von Müller (1993) zeigte, dass die PCBs #28 und #101 in ähnlicher Höhe aber die PCBs # 128, #153 und #180 sogar in deutlich erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Die Aussagekraft dieses Vergleiches wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass sich die Untersuchungen von Müller (1993) auf nur vier Mischproben eines 350 cm langen Bohrkernes bezogen (Haag et al. 1999b, Hollert & Braunbeck 1997).

Cytotoxizität. Das Tiefenprofil der cytotoxischen Wirkung der Sedimentsegmente von L1K1 (Abb. 7.5) zeigte eine einheitliche geringe bis mäßige Toxizität mit einem Median des NR_{50} von 150 mg/ml Sedimentäquivalent für den Ansatz ohne S9 und 310 mg/ml für den Ansatz mit S9-Supplementierung. Somit konnte in den Sedimentextrakten eine geringe Detoxifizierung der partikulär gebundenen Schadstoffe durch die P450-abhängigen Enzyme des S9-Mixes nachgewiesen werden. An einem Sedimentbohrkern, der 1994 sehr nahe der Sondierungsstelle L1 bei Flusskilometer 125,150 aber 4 m näher an der Mole entnommen wurde, führte Zipperle (1997) eine Untersuchung zur gentoxischen Wirkung mit dem *umu*-Test und Hollert & Braunbeck (1997) Bioassays zur cytotoxischen Wirkung durch. Die NR_{50}-Werte im Zelltest mit RTG-2-Zellen ohne S9-Supplementierung betrugen für diesen Bohrkern 155 mg/ml (Tiefe: 0-15 cm), 140 mg/ml (42-57 cm) und 85 mg/ml (70-100 cm). Somit konnte eine gute Übereinstimmung der Cytotoxizitätsbefunde nachgewiesen werden, die darauf hindeutet, dass an diesem Sondierungspunkt ein weitgehendes Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Erosion in den Jahren 1994 bis 1998 bestand.
Für den Bohrkern des Sondierungspunktes L4 konnte unter der Erosionsdiskordanz ein sprunghafter Anstieg der Cytotoxizität im Ansatz ohne S9 von einem NR_{50} von 74 mg/ml Sedimentäquivalent auf einen Mittelwert von 37 mg/ml nachgewiesen werden. Die höchste Toxizität wurde bei diesem Bohrkern mit einem NR_{50} von 20 mg/ml für das Segment 36-51 cm ermittelt. Die hohe Cytotoxizität an der Erosionsdiskordanz korreliert sehr gut mit den Befunden aus der Schwermetall- und PCB-Analytik (Abb. 7.4). Das etwas frühere Ansteigen der Cytotoxizität gegenüber den Konzentrationsprüngen aus der Analytik liegt darin begründet, dass im Cytotoxizitätstest Mischproben mehrerer Sedimentsegmente untersucht werden mussten und daher die Befunde dieses Bohrkerns eine geringere stratigraphische Auflösung besaßen als die chemische Analytik. Ein Vergleich mit früheren Daten konnte nicht durchgeführt werden, da bei der Beprobung im Jahre 1994 an dieser Sondierungsstelle keine Probe entnommen wurde.
Eine relative Einordnung der Cytotoxizität kann mit einer Darstellung als Histogramm erreicht werden, bei der die Häufigkeitsverteilung der NR_{50}-Werte von insgesamt drei Probenkampagnen aus den Jahren 1994, 1998 und 1999 vergleichend dargestellt wurde (Abb. 7.6). Es ist zu erkennen, dass für die Cytotoxizität eine ähnliche bimodale Verteilung wie für die Schwermetallbelastung mit Cadmium und Kupfer ermittelt werden konnte. Aus der guten Korrelation sollte keinesfalls abgeleitet werden, dass diese Schwermetalle alleine für die Cytotoxizität verantwortlich seien. Für Cadmium ist bekannt, dass es mit dem Lösungsmittel Aceton extrahiert werden kann. Bei einer Annahme einer Extraktionseffizienz von 50 % und einer Cadmiumkonzentration von 40 mg/kg (vgl. Abb. 7.4) könnten für die NR_{50}-Konzentrationen des akuten Zelltests (vgl. Abb. 7.4) Cadmiumkonzentrationen zwischen 0,4 und 0,75 mg Cd pro L Testmedium berechnet werden, so dass aufgrund der Toxizität des Cadmiums (NR_{50} von 15 mg/L für $CdCl_2$ und ca. 10,5 mg/L für Cd; Hollert & Braunbeck 1997) weniger als 10 Prozent des nachgewiesenen NR_{50} erklärt werden könnten. Vielmehr stellen Sedimente mit hoher Cadmiumkonzentration in der Regel hochkontaminierte Altsedimente dar, die gegenüber den jüngeren Sedimenten oftmals auch eine höhere Belastung mit stark cytotoxischen PAHs (Braunbeck et al. 1995b, Segner 1998), PCBs (vgl. Abb. 7.5), DDT und seinen Metaboliten (Wetterauer 2001) sowie Pestiziden (Braunbeck et al. 1995b, Hollert & Braunbeck 1997, Miltenburger 1997) aufweisen.

Ein Vergleich der Cytotoxizität des Bohrkernes L1K1 (Abb. 7.4) mit der Häufigkeitsverteilung (Abb. 7.6) verdeutlicht, dass dieser Bohrkern durchweg zum Cluster der geringer belasteten Sedimente der Stauhaltung Lauffen zählte. Im Gegensatz dazu konnte L4K2 insbesondere in Bezug auf die Segmente unterhalb der Erosionsdiskordanz den hochbelasteten Sedimenten zugeordnet werden.

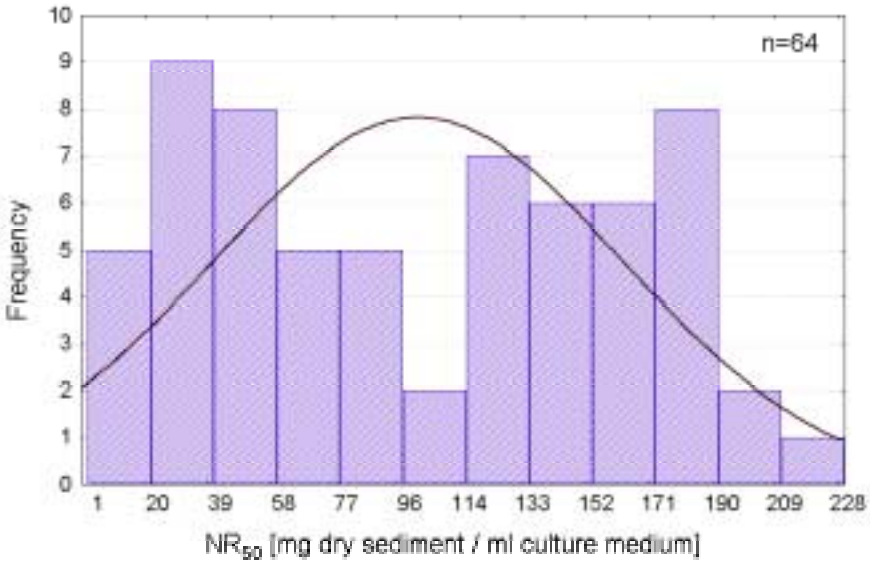


Abb. 7.6. Häufigkeitsverteilung von NR_{50}-Werten acetonischer Sedimentextrakte aus der Stauhaltung Lauffen am Neckar, ermittelt aus den Dosis-Wirkungsbeziehungen von 64 akuten Zelltests mit der Zelllinie RTG-2 ohne S9-Supplementierung. Als Linie ist eine Normalverteilung dargestellt. Datengrundlage: Cytotoxizitätsuntersuchungen an vier Bohrkernen aus dem Jahre 1994 (Hollert & Braunbeck 1997), 3 Bohrkernen einer Probennahme 1998 (Abschnitt 7 dieser Arbeit) und unpublizierte Daten einer gemeinsamen Probennahme mit der Bundesanstalt für Gewässerkunde im Herbst 1999.

Mutagenität. Abb. 7.4 zeigt das Profil des mutagenen Potenzials von acetonischen Sedimentextrakten im Ames-Test mit den Stämmen TA98 mit und ohne S9-Supplementierung sowie TA98 NR^- (Nitroreduktase-defizient). Für das oberflächennahe Sediment des Bohrkernes L1K1 (0-24 cm) und für das Segment 36-51 cm konnte eine leichte, aber signifikante mutagene Wirkung im Ames-Test ohne S9-Mix festgestellt werden. Die deutlich geringen Induktionsfaktoren für den Nitroreduktase-defizienten Stamm TA98 NR^- können als Hinweis interpretiert werden, dass in den Segmenten 0-24 cm und 36-51 cm Nitroverbindungen einen nicht unerheblichen Anteil der nachgewiesenen Mutagenität verursachten (vgl. Marvin et al. 2000a, b, Vahl 1997, Vahl et al. 1995, 1997).
Beim Bohrkern L4K2 konnte im Bereich der Erosionsdiskordanz ein sprunghafter Anstieg der mutagenen Wirksamkeit auf einen Induktionsfaktor bis zu 3,2 nachgewiesen werden. Die höchste Induktion (3,7 im Ansatz ohne S9) bewirkte das Sediment einer Entnahmetiefe von mehr als 76 cm. Dieser Befund ist in einer guten Übereinstimmung mit Befunden von Zipperle (1997), der mit dem *umu*-Test eine signifikante Genotoxizität an einigen wässrigen Eluaten von Altsedimenten der Stauhaltung Lauffen detektieren konnte.

Bewertung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials vor dem Hintergrund einer Remobilisierung. Das Erosionsverhalten von aquatischen Sedimenten hängt in starkem Maße von der Feststoffzusammensetzung ab. Dabei kann zwischen rolligem, grobtextuiertem Material (Sand und Kies) und kohäsiven Feinsedimenten (Ton und Schluff) unterschieden werden. Während für rollige, kohäsionsfreie Sedimente empirische Erkenntnisse zum Erosionsverhalten vorliegen, die sich auch auf verschiedene Fließgewässer übertragen lassen, ist das Erosionsverhalten von feinkörnigen, kohäsiven Sedimenten nur unzureichend geklärt (Haag et al. 1999a, 2001, Kern et al. 1999). Übertragbare Beziehungen zwischen Sedimentkenngrößen und dem Erosionsverhalten von kohäsiven Sedimentablagerungen sind nicht bekannt (Parker 1997), so dass die Erosionsgefährdung der Sedimentbohrkerne aus Lauffen empirisch ermittelt werden musste. Die Untersuchung des Erosionsrisikos erfolgte mit Hilfe eines Strömungskanals zur Ermittlung der tiefenabhängigen Erosion von Gewässersedimenten (SETEG, Kern et al. 1999), bei dem Bohrkerne bei definierten Fließgeschwindigkeiten (bzw. Schubspannungen) mit Hilfe einer motorgetriebenen Hubspindel in einem Fließkanal exponiert werden können. Der Durchfluss kann so lange schrittweise gesteigert werden, bis Feststoffaggregate flächig aus der Sedimentoberfläche gerissen werden. Diese kritische Schubspannung zum Übergang einer massenhaften Erosion ($\tau_{c,e}$) kann durch Trübungsmessung und per Videokamera erfasst werden. Durch wiederholte Messung können verschiedene Tiefenhorizonte untersucht werden, so dass man ein Verti-

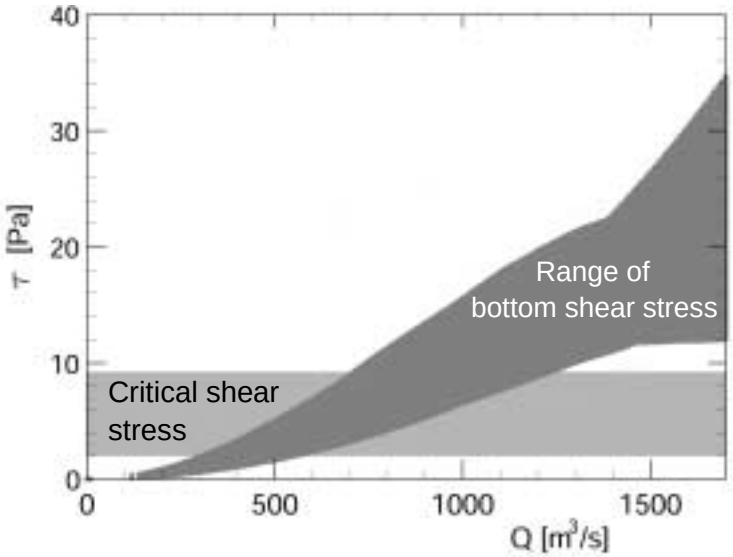


Abb. 7.7. Bandbreite der an 10 Sedimentkernen aus der Stauhaltung Lauffen ermittelten kritischen Erosionsschubspannungen (Haag et al. 1999) im Vergleich mit den in der Stauhaltung auftretenden Sohlschubspannungen als Funktion des Abflusses (Kern 1997). Die Erosionsgrenzwerte werden bei einem Abfluss von 1200 m^3/sec (entspricht einem Hochwasser mit fünfjährlicher Wiederkehrwahrscheinlichkeit) flächendeckend überschritten, so dass alle untersuchten Sedimente bis zu einer Tiefe von ca. 1 m erosionsgefährdet sind, auch die hochkontaminierten Altsedimente. Modifiziert nach Kern (1997) und Haag et al. (1999a), aus Hollert et al. (2000b).

kalprofil der kritischen Erosionsschubspannungen des untersuchten Sedimentkernes erhält. Abb. 7.4 zeigt die Vertikalprofile der kritischen Erosionsschubspannung der Bohrkerne L4K1 und L1K3. Es ist zu erkennen, dass die oberflächennahen Sedimentsegmente bereits bei geringen Schubspannungen erodiert werden konnten. Mit zunehmender Tiefe war in den meisten Fällen eine Zunahme von $\tau_{c,e}$ zu verzeichnen (Haag et al. 2001). Diese Tendenz wird teilweise von sprunghaften Veränderungen überlagert, die nicht alleine durch Konsolidierungsprozesse zu erklären sind. Ihre Ursache liegt vermutlich in kleinräumigen Unterschieden der Sedimentstruktur (Haag et al. 1999b). Bei dem Sedimentkern L4K1 konnte im Bereich der Erosionsdiskordanz ein sprunghafter Anstieg der kritischen Schubspannung für das Einsetzen einer Massenerosion von 1 bis 4 auf 10 Pa nachgewiesen werden. Die Zunahme der Erosionsstabilität konnte dadurch erklärt werden, dass in diesem Bereich Sedimente mit größeren Korngrößen durch feinkörnige, gut konsolidierte Altsedimente (vgl. Dichteprofile und Korngrößenanteil unter 20 µm in Abb. 7.3) abgelöst wurden (Haag et al. 1999b). Ein Vergleich der gemessenen kritischen Erosionsschubspannungen von 10 Bohrkernen mit den bodennahen Schubspannungen in der Stauhaltung Lauffen, die mit Hilfe des Flusshydraulisch numerischen Modells COSMOS (Kern 1997) berechnet wurden, erlaubt eine Bewertung des Erosionsrisikos (Abb. 7.7). Es ist die große Varianz der kritischen Erosionsschubspannungen zu erkennen, die für den Übergang zur

massenhaften Erosion überschritten werden müssen. Der Mittelwert für $\tau_{c,e}$ bei den gering kontaminierten Jungsedimenten betrug 4,2 Pa, der für die höher kontaminierten und durchschnittlich besser konsolidierten Altsedimente 5,9 Pa (Haag et al. 2001). Es ist offensichtlich, dass ab einem Abfluss von 1200 m^3/s (entspricht einem Hochwasser mit fünfjährlicher Wiederkehrwahrscheinlichkeit) bei allen untersuchten Sedimenten eine Massenerosion im Strömungskanal eingesetzt hat. Aufgrund dieser Befunde ist eine Remobilisation von Altsedimenten der Stauhaltung Lauffen bei den Hochwasserereignissen im Oktober 1998 und Februar 1999 als wahrscheinlich anzusehen.

7.2 Untersuchungen zweier starker Neckarhochwasserereignisse im Oktober/November 1998 und Februar 1999

Probennahmen

Die Probennahmen von Schwebstoffen erfolgte am Wieblinger Wehr bei Heidelberg (Flusskilometer 22,5, genaue Probennahmestandorte in Hollert & Braunbeck 1997) und am Wehr der Stauhaltung Lauffen (km 125,1, Abb. 7.8). Mit Hilfe von Schwebstofffallen (Abb. 2.6), die in beiden Stauhaltungen an Schwimmbrücken vor den Kraftwerkseinläufen exponiert wurden, konnte eine reproduzierbare Sammlung der Schwebstoffe in etwa 10-20 cm Tiefe unter der Wasseroberfläche erfolgen (Hollert & Braunbeck 1997). Die Probenentnahme in Lauffen erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Wasserbau der Universität Stuttgart. Von der Schwimmbrücke am Heidelberger Wehr wurden weiterhin Wasserproben für limnochemische, organische und anorganische Analysen entnommen. Die Probenaufarbeitung und die untersuchten Parameter sind in den Abschnitten 2.1.3 und 2.3 beschrieben. Im Rahmen des Projektes PWAB PW 96 182 des Instituts für Wasserbau Stuttgart (Herr Dipl. Hyd. Haag, Herr Prof. Dr. Westrich) wurden während des Oktober-Hochwassers 1998 weiterhin Wasserproben für Schwebstoffkonzentrations- und Frachtbestimmungen sowie Schwermetallanalysen an insgesamt 8 Stauhaltung des Neckars zwischen Deizisau und Lauffen aber auch den Neckarnebenflüssen Rems (km 170,5), Murr (km 156,4) und Enz (Neckar: km 136,7, Enz km: 0,22) entnommen (Haag et al. 1999b). Für die hier untersuchte Fragestellung einer möglichen Remobilisierung von Altsedimenten aus der Stauhaltung Lauffen ist eine Kenntnis des partikulär gebundenen Schadstoffeintrages der Enz und des Neckar oberstroms von Lauffen von großer Bedeutung: Abb. 7.8. zeigt die Lage der Probennahmestandorten am ober- und unterstromigen Rand der Stauhaltung Lauffen.

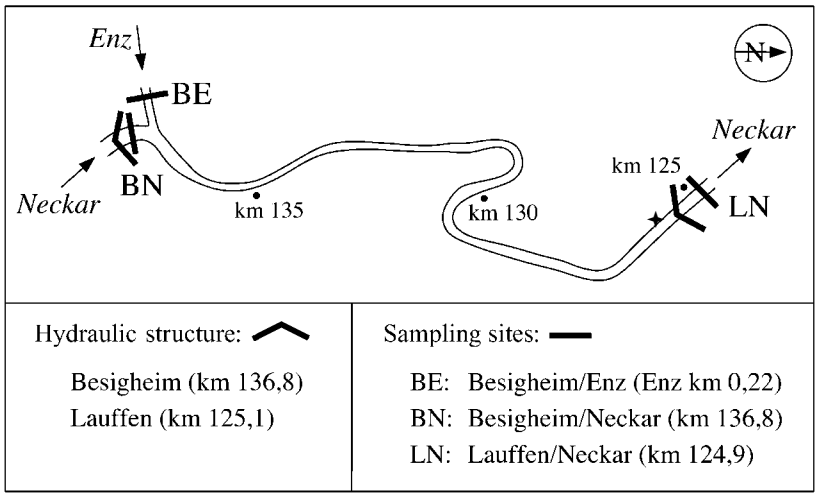


Abb. 7.8. Probennahmestandorte für Wasserproben im Bereich der Stauhaltung Lauffen am Neckar. Aus den Filterrückständen der Wasserproben wurden die Konzentrationen und Schwermetallgehalte von Schwebstoffen ermittelt. ✦: Standort der Schwebstofffallen zur Gewinnung großer Schwebstoffmengen (für Bioassays). Kartengrundlage: modifiziert nach Haag et al. (1999b).

Das Hochwasser im Oktober/November 1998

Im Herbst 1998 war das Wettergeschehen in Mittel- und Westeuropa von Starkniederschlägen geprägt. Die Niederschlagsrate im September war in Südwestdeutschland im Vergleich zum langfristigen Mittel um 200-300 % erhöht und auch im vergleichsweise eher trockenen Oktober kam es zu heftigen Regenfällen, bei denen stellenweise Extremwerte gemessen wurden (z. B. Freudenstadt am 29.10.1998: 93 mm, Fuchs et al. 1999b). Die Niederschlagssummen, die an der Station Heidelberg im Zeitraum vom 28.-31. Oktober ermittelt wurden, zeigen zum Beispiel, dass hier an nur drei Tagen (28.-30. Oktober) 37 mm Niederschlag fielen. Fast im gesamten Neckareinzugsgebiet konnten bis zum 31. Oktober Niederschlagssummen von 50 – 100 mm verzeichnet werden (Abb. 7.9). Die andauernden Regenfälle führten beim Neckar und seinen Nebenflüssen zu Abflüssen, die auf ein „Jahrhunderthochwasser“ erwarten ließen (Fuchs et al. 1999b, LfU 2000). Da die Hochwasserwelle des Rheins mit etwas zeitlicher Verzögerung die Neckarmündung erreichte und somit kein Rückstau der Wassermassen des Neckars erfolgte, blieb das angekündigte Jahrhunderthochwasser jedoch aus. Mit einem maximalen Abfluss von 1955 m³/sec am Pegel Heidelberg/Karlstor (gemessen am 30. Oktober 1998, HVZ 1998) gehörte das Hochwasser dennoch zu den Ereignissen mit einer etwa 20-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit. In Lauffen am Neckar besaß das untersuchte Hochwasser mit einem Spitzenabfluss von 1055 m³/sec eine etwa 5-jährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit, für die Enz konnte mit 270 m³/sec eine Wiederkehrwahrscheinlichkeit von 5-7 Jahren ermittelt werden (Haag et al. 1999b). Für die im Vergleich zu Lauffen höhere Jährlichkeit des Hochwassers bei Heidelberg sind in erster Linie die hohen Abflüsse der Nebenflüsse Kocher, Jagst und Elsenz verantwortlich gewesen (LfU 2000). Abb. 7.10 zeigt die Ganglinien für Heidelberg und für Lauffen, die mittleren Abflüsse (MQ) sowie die Zuordnung verschiedener Abflüsse zu Hochwasserereignissen mit einer bestimmten Wiederkehrwahrscheinlichkeit. In Lauffen wurde der Scheitelpunkt des Hochwassers am 29. Oktober und in Heidelberg am 30. Oktober erreicht.

Gang der limnochemischen Parameter. Abfluss, Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm (**SAK_{254}**) als Indikator für gelöste organische Substanzen mit Doppelbindungen und **Schwebstoffkonzentrationen** korrelierten in Heidelberg sehr gut (Abb. 7.11, Korrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,7 bis 0,9). Die **Leitfähigkeit** nahm durch Verdünnungseffekte umgekehrt proportional zum Abfluss ab. Die höhere Erosionskraft des untersuchten Hochwassers manifestierte sich in Schwebstoffkonzentrationen bis zu 1400 mg/L im Vergleich zu 250 mg/L beim Hochwasser 1995/96. Analog zum Hochwasser 1995/96 wurde das Schwebstoffmaximum kurz vor der Abflussspitze erreicht (vgl. Barsch et al. 1994a, b, Symader et al. 1991). Aufgrund der hohen Korrelation zwischen **Trübung** und Schwebstofffracht wurde die Trübungsmessung oftmals für eine automatisierte Schwebstoffprobennahme, aber auch für die Bestimmung der Schwebstofffracht eingesetzt (Bley & Schmidt 1994, Schulte 1995, Symader 1988, Symader et al. 1991). Während beim Hochwasser 1995/96 die maximale Trübung gut mit dem Abflussmaximum und der Schwebstoffkonzentration korrelierte (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a), konnte beim ansteigenden Ast des untersuchten Hochwassers 1998 eine gute Übereinstimmung festgestellt werden. Vom Nachmittag des 30. bis zum 31. Oktober konnte ein weiteres Maximum bei der Trübung verzeichnet werden, das aber bereits mit zurückgehenden Abflussmengen und Schwebstoffkonzentrationen einherging. Dessen gute Korrelation mit einem sprunghaften Anstieg des Kaliumpermanganatverbrauches (unfiltrierte Wasserprobe) und dem höchsten TOC-Wert des Hochwassers (1,63 %, Winn 2000) kann als Hinweis auf eine stoßweise Belastung mit stark an organischem Kohlenstoff angereicherten Schwebstoffen einer anderen Herkunft interpretiert werden. Die Enge der Peaks deutet auf eine Herkunft nur wenig oberhalb Heidelbergs hin (Haag, persönliche Mitteilung). Hohe organische C-Konzentrationen können ein Hinweis auf remobilisierte Klärschlamme, Ablagerungen nach Kläranlagen oder Direkteinleitungen sein (vgl. Hale et al. 2000). Tatsächlich konnte für diesen Schwebstoff auch ein sprunghafter

Bildtafel 7.1. Neckarhochwasser im Oktober 1998 in Heidelberg. Neben einzelnen Wohnhäusern (oben), wurden auch Straßen (Mitte) und Kinderspielplätze (unten) im Bereich der Neckarwiese überflutet. Ein provisorisches Schild des Umweltamtes Heidelberg mit der Aufschrift „Spielplatz wegen Hochwasserverunreinigungen gesperrt“ verdeutlicht den Einfluss von Hochwasserschwebstoffen nicht nur für aquatische Systeme.

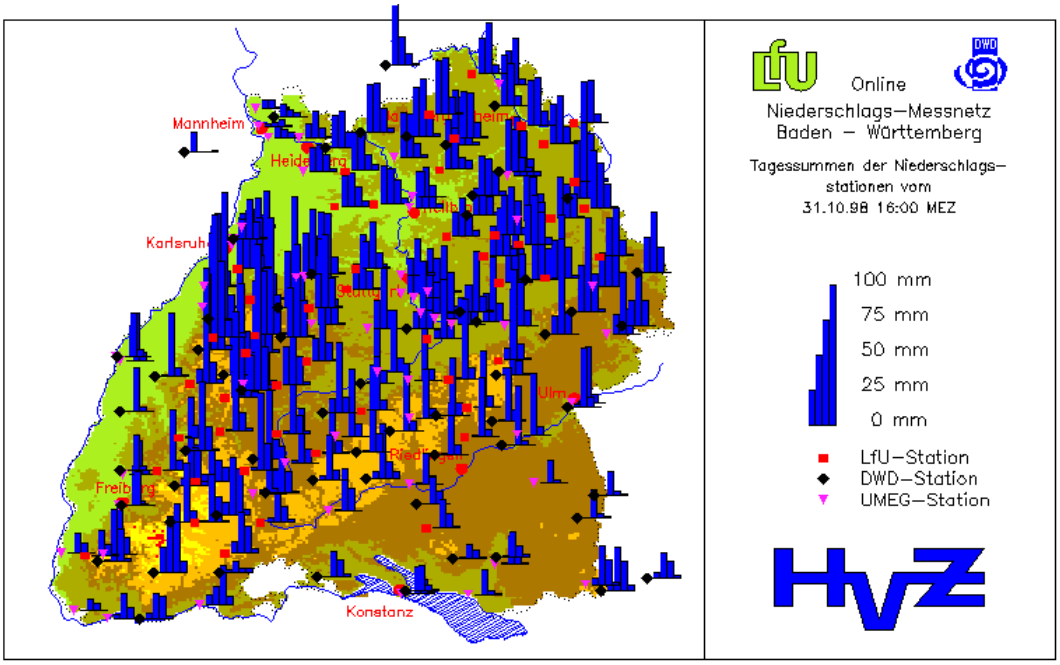


Abb. 7.9. Tagessummen der baden-württembergischen Niederschlagmessstationen vom 27. bis zum 31. Oktober 1998 (von links nach rechts); aus: HVZ (1998).

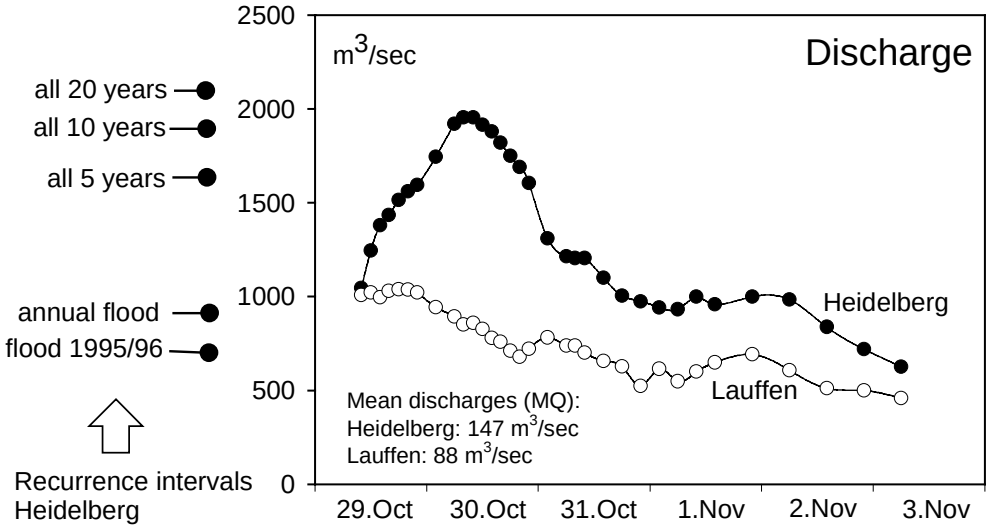


Abb. 7.10. Abflüsse während des Neckarhochwassers im Oktober/November 1998 in Heidelberg und Lauffen. Recurrence intervals: Statistische Wiederkehrwahrscheinlichkeiten für Heidelberg. Das untersuchte Hochwasser besaß mit fast 2000 m^3/sec einen mehr als dreimal höheren Scheitelabfluss als das 1995/96 untersuchte Winterhochwasser, für das ein deutliches Schädigungspotenzial festgestellt werden konnte (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 1999). Das untersuchte Hochwasser entsprach in Heidelberg in etwa einem 20-jährlichen Hochwasser und in Lauffen einem 5-jährlichen. MQ: Mittlerer Abfluss. Datengrundlage: Hochwasservorhersagezentrale (HVZ, 1998) und Bundesanstalt für Gewässerkunde, unpublizierte Daten.

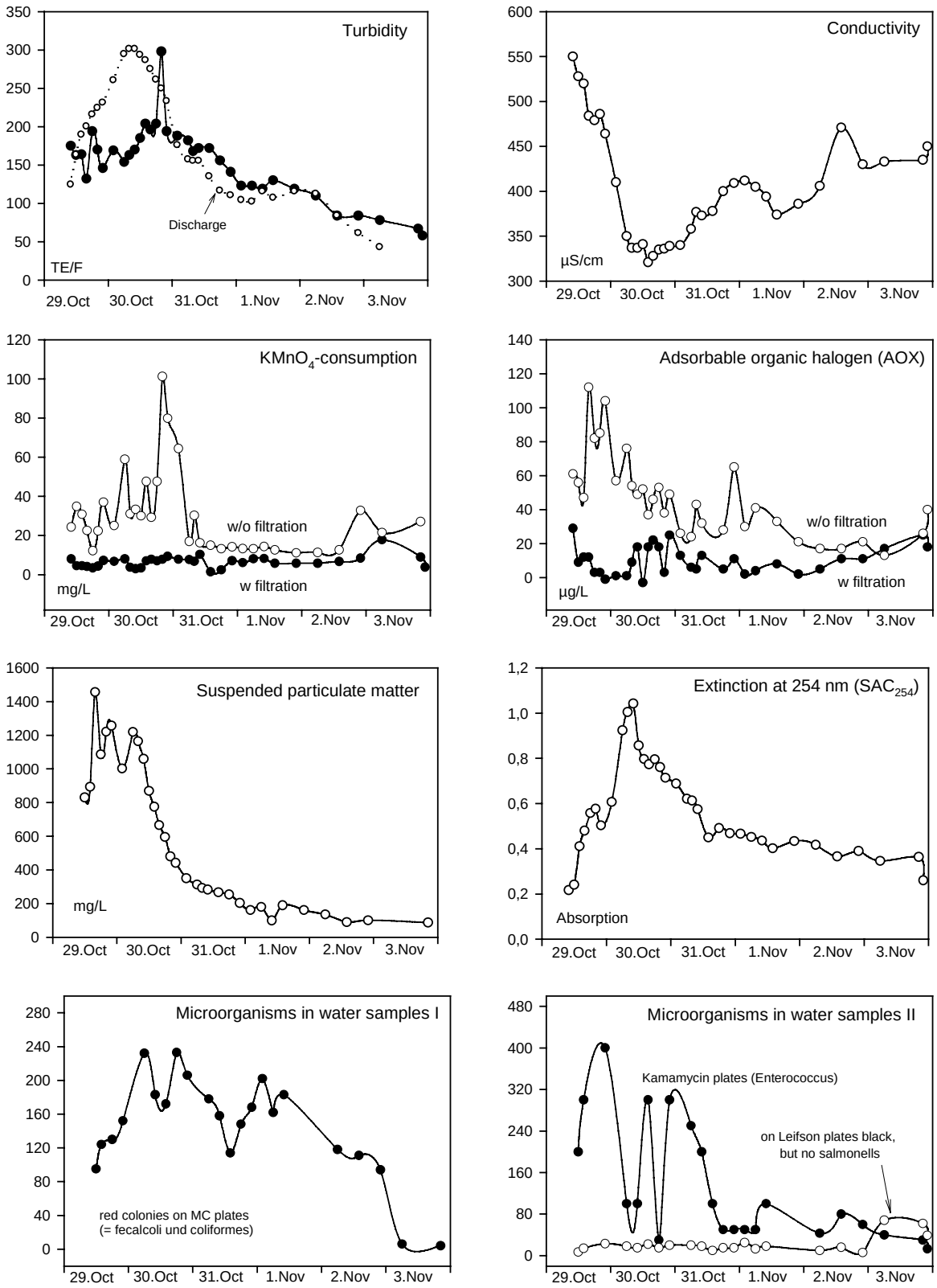


Abb. 7.11. Gang verschiedener limnochemischer Parameter und Keimzahlen in Wasserproben während des Neckarhochwassers im Oktober/November 1999 bei Heidelberg. Bei der Trübung (Turbidity) ist zum Vergleich die Abflussganglinie am Pegel Heidelberg Karlstor ohne Skalierung dargestellt (für Werte siehe Abb. 7.10). Es sind weiterhin abgebildet: Leitfähigkeit (Conductivity), Kaliumpermanganat-Verbrauch ($KMnO_4^-$consumption) in filtrierten (w) und unfiltrierten (w/o) Wasserproben, adsorbierbare organische Halogenverbindungen (AOX), Schwebstoffkonzentrationen (Suspended particulate matter) spektrale Absorptionskoeffizienten bei 254 nm (SAC_{254}) aus zentrifugierten Wasserproben sowie Faekalcoli, Coliforme und Enterokokken (Mikrobielle Untersuchungen von Herrn Dürr, Hygiene-Inst. Halle).

Anstieg der Octyl- und Nonylphenolkonzentrationen, aber auch der Phtalate um einen Faktor 10 bis 100 nachgewiesen werden (Abschnitt endokrine Wirksamkeit, Abb. 7.20). Die Konzentration organischer Halogenverbindungen wurde mit dem Summenparameter **AOX** in den filtrierten und unfiltrierten Wasserproben bestimmt. Die AOX-Zunahme während des Hochwasserpeaks (bis Güteklasse III-IV, LAWA 1998) konnte zum größten Teil durch die Zunahme der Schwebstoffkonzentrationen in den Wasserproben erklärt werden (r nach Spearman von 0,8). Andererseits konnte das Ansteigen des AOX in der unfiltrierten Probe vom 31.10. um 22 Uhr nicht alleine durch Schwebstoffkonzentrationseffekte erklärt werden. Vielmehr war für den Schwebstoff dieser Probe von stark erhöhten Konzentrationen an organischen Halogenverbindungen auszugehen, so dass bei der Analyse der Bioassay-Befunde diese Probe auf ein erhöhtes mutagenes und cytotoxisches Potenzial überprüft werden sollte. Bei den **mikrobiologischen Untersuchungen** (durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dürr und Herrn Kaiser, Hygiene-Institute, Halle & Heidelberg) konnten stark erhöhte Anzahlen an Fäkalindikatoren während des Hochwasserpeaks (*Enterococcus*) und über das gesamte Hochwasser (Faekalcoli und Coliforme) nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass ungeklärtes Abwasser über Entlastungen der Kläranlagen während des gesamten Hochwassers eingeleitet wurde.

Schwermetallbelastung. Es wurden insgesamt 35 filtrierte Wasserproben, die am Wieblinger Wehr bei Heidelberg entnommen wurden, auf die Schwermetalle Kupfer, Blei, Chrom und Cadmium untersucht. Die ermittelten Konzentrationen lagen bei den Elementen Pb, Cr und Cd jeweils unter den Zielvorgaben für den gestauten Neckar (5 µg/L Pb, 10 µg/L Cr und 0,3 mg/L Cd, LAWA 1998). Für Kupfer wurde die Zielvorgabe von 10 µg/L bei den Proben 29.10. 10 Uhr und 31.10. 10 Uhr jeweils mehr als zweifach überschritten. Somit konnte insgesamt nur eine geringe bis mäßige Schwermetallbelastung für die gelösten Wasserinhaltsstoffe ermittelt werden. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Untersuchung eines Neckarhochwassers mit einem Abfluss von 1100 m^3/s im Januar1995 (LfU 1996) und dem mittleren Hochwasser im Dezember 1995/95 (Hollert & Braunbeck 1997).
Die Schwermetallkonzentrationen der durch Filtration gewonnenen Schwebstoffe des Hochwassers im Oktober 1998 sind in Abb. 7.12 dargestellt. Die Gänge für die Elemente Cr, Cu, Zn und Ni korrelieren mit Korrelationskoeffizienten bis 0,65 relativ gut. Die größte Belastung war jeweils im Bereich des aufsteigenden Astes des Hochwassers kurz vor dem Scheitelpunkt nachzuweisen und ging einher mit dem Maximum der Schwebstofffracht. Auch die Konzentrationsprofile für Cd und Pb zeigten eine gute Übereinstimmung (r nach Spearman von 0,5), insbesondere bezüglich der Maximalwerte. Die Maxima für Pb und Cd konnten für den abfallenden Ast des Hochwassers nachgewiesen werden; die Cu-Konzentrationen erreichten in diesem Abschnitt ein zweites Maximum. Im Vergleich zum mittleren Hochwasser 1995/96 konnte für das Hochwasser im Oktober 1998 eine deutliche Erhöhung der Cr-, Cd- und Zn-Konzentrationen festgestellt werden (Tab. 7.1). Insbesondere bei Cadmium fällt eine Erhöhung des Mittelwertes von 1,1 mg/kg (1995/96) auf 3,2 mg/kg (1998) auf. Abb. 7.12 zeigt, dass stoßweise Konzentrationssprünge in der Cadmiumbelastung bis auf 28 mg/kg nachgewiesen werden konnten. In Abschnitt 7.1 konnte gezeigt werden, dass in der Stauhaltung Lauffen der Cadmium-Grenzwert zwischen Jung- und Altsedimenten bei 10,8 mg/kg liegt. Dieser Wert wurde von insgesamt vier Hochwasserschwebstoffproben überschritten. Da die Emissionen von Cd in den letzten Jahren deutlich zurück gegangen sind (Jensen & Bro-Rasmussen 1992), kann das stoßweise Auftreten von Cadmiumkonzentrationen über 10 mg/kg als deutlicher Hinweis auf eine Remobilisation von Altsedimenten angesehen werden. Die Cadmiumbelastung der Hochwasserschwebstoffe wurde mit Hilfe des Klassifikationssystems der LAWA (1998) für Schwebstoffe bewertet. Dabei ergab sich eine mittlere Güteklasse von III für die Schwebstoffe. Vier Proben überschritten den Grenzwert für die Einordnung in die schlechteste Güteklasse IV. Bei allen anderen untersuchten Elementen wurden die höchsten Konzentrationen in die Güteklassen II-III oder III eingeordnet.

Tab. 7.1. Schwermetallkonzentrationen von Hochwasserschwebstoffen eines mittleren Hochwassers 1995/96 bei Heidelberg (Hollert & Braunbeck 1997) sowie des Oktober-Hochwassers 1998 in Heidelberg (HD) und Lauffen (LN) nach HNO_3-Aufschluß in mg/kg Schwebstofftrockengewicht. Die Schwermetallkonzentrationen von Sedimenten und Schwebstoffen der Staustufe Lauffen stammen aus Haag et al. (1999b). Von den Sedimenten wurde die Fraktion < 0,02 mm analysiert, wogegen bei den Schwebstoffen – analog zu den Soxhlet-Extrakten und aufgrund der geringen Substanzmengen auf den Filtern – alle Korngrößen untersucht wurden.

	Suspended particulate mater of flood events									**Sediment**		
	Dec. 95 HD (n=7)			Oct. 98 HD (n=32)			Oct. 98 LN (n=10)			LN (n=147)		
	Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.
Cr	38,2	34,1	49,4	135,5	75,9	350,7	82,1	71	116	469	64	1615
Cu	53,7	42,1	67,7	48,6	32,2	90,8	51,8	43	83	248	39	726
Pb	29,8	25,6	33,6	55,5	25,1	225,5	40,3	34	55	172	35	649
Cd	1,1	1,0	1,2	3,2	0,0	28,1	1,5	0,0	10	26,3	0,4	105
Zn	228	177	285	196,6	125,7	293,9	240	183	390	909	27	2834

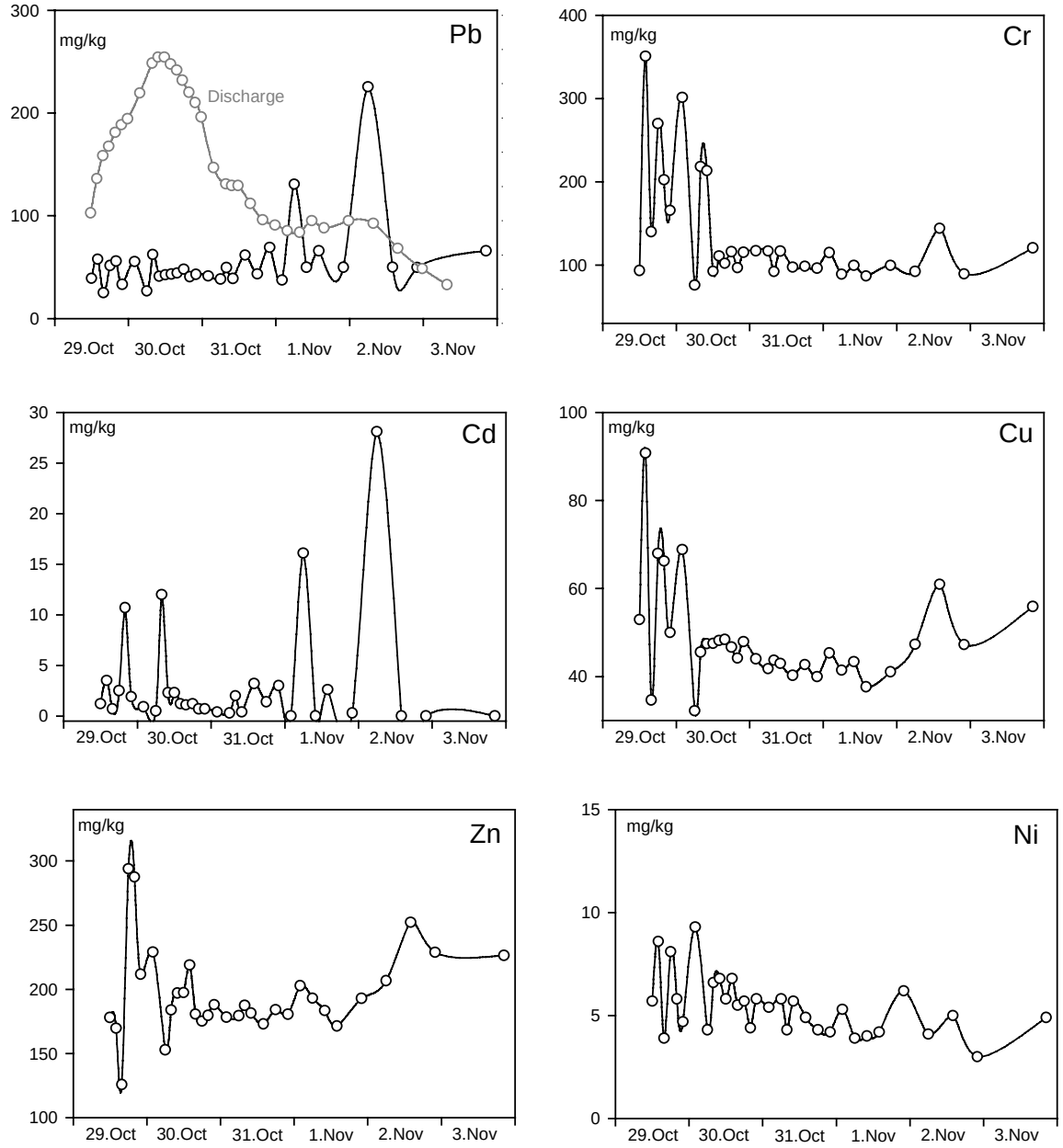


Abb. 7.12. Schwermetallkonzentrationen von Schwebstoffen des Hochwassers im Oktober 1998 aus der Stauhaltung Heidelberg. Die Schwebstoffe wurden durch Filtration aus den Wasserproben gewonnen.

Abb. 7.13 zeigt die Befunde einer Cadmiumanalyse von Schwebstoffen der Standorte Neckarstauhaltung Besigheim (BN), Enz bei Besigheim kurz vor der Mündung (BE) und unterhalb der Stauhaltung Lauffen (LN). Durch den Vergleich der Schwermetallkonzentrationen an den drei Probennahmenstellen kann der Einfluß der Stauhaltung Lauffen auf die Konzentrationen der partikulär gebundenen Schwermetalle überprüft werden. Erhöhte Cadmiumkonzentrationen konnten in Lauffen kurz vor dem Scheitelpunkt und insbesondere im Bereich des tailings nachgewiesen werden (Abb. 7.13). Vor dem Scheitelpunkt des Hochwassers konnte unterhalb der Stauhaltung Lauffen eine deutlich höhere Cadmiumbelastung als am Referenzstandort Bessigheim/Enz oberstrom der Stauhaltung Lauffen nachgewiesen werden (Abb. 7.13). Die relative gute Korrelation der Cadmiumbelastung unterhalb der Stauhaltung Lauffen mit den Cadmiumkonzentrationen in der Enz (BE) ist als Hinweis zu sehen, dass während des Scheitelpunkts der Cadmiumeintrag aus der Enz signifikant zur Belastung der Schwebstoffe unterhalb von Lauffen beitrug. Am 30.10. konnte zeitgleich eine deutliche Erhöhung der Cadmiumkonzentration an den Standorten BN und LN nachgewiesen werden, die anzeigt, dass der überwiegende Anteil der Cadmiumfracht in diesem Abschnitt des Hochwassers von oberstrom der Stauhaltung Lauffen eingetragen wurde. Eine deutliche Erhöhung der Cadmiumbelastung in Schwebstoffen unterhalb der Stauhaltung Lauffen konnte ab dem 1.11. nachgewiesen werden. Die höchste analysierte Konzentration von 11 mg/kg am 4.11. lag im Bereich des Cadmium-Grenzwerts für Altsedimente von 10,8 mg/kg. Die im Vergleich zum Hochwasser 1995 (LfU 1996) deutlich erhöhten Cadmiumkonzentrationen unterhalb der Stauhaltung Lauffen und der sehr hohe Anteil der Nettoerosion aus der Stauhaltung Lauffen an der Schwebstoffgesamtfracht (Haag et al. 1999b) deuten auf eine deutliche Remobilisierung von kontaminierten Altsedimenten aus der Stauhaltung Lauffen hin.
Bei einer durchschnittlichen Transportgeschwindigkeit von 1,5 m/s (persönliche Mitteilung, Wasserschifffahrtsamt Heidelberg) und der Annahme eines gleichmäßigen Transportes könnten die Schwebstoffe der Stauhaltung Lauffen innerhalb von etwa 18 Stunden nach Heidelberg transportiert werden. Abb. 7.12 zeigt, dass in Heidelberg die Cadmiummaxima am 30.10. und 2.11 mit etwa 18-20 h Verzögerung nach deutlichen Erhöhungen der Cadmiumfracht in Lauffen auftraten. Vor dem Hintergrund

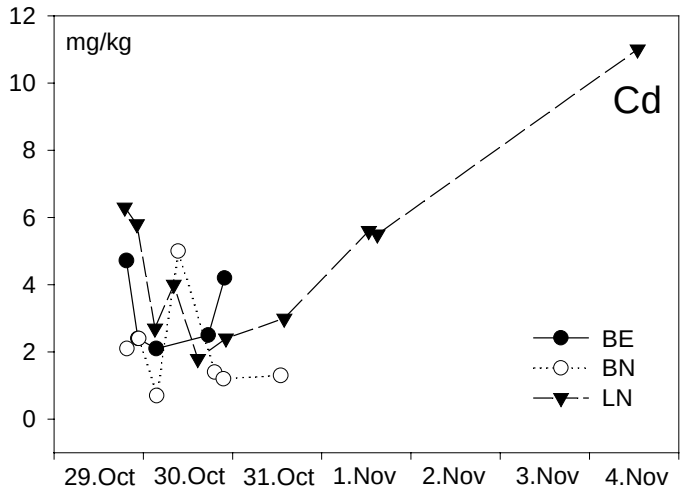


Abb. 7.13. Einfluss der Stauhaltung Lauffen auf die Cadmiumbelastung von Hochwasserschwebstoffen des Neckars im Oktober 1998. Cadmiumkonzentrationen von Schwebstoffen der Neckarstauhaltung Besigheim (BN), der Enz kurz vor der Mündung (BN) und des Neckars unterhalb der Stauhaltung Lauffen (LN). Die Schwebstoffe wurden durch Filtration aus den Wasserproben gewonnen. Probennahme und Schwermetallaufschlüsse wurden von Mitarbeitern des Instituts für Wasserbau der Universität Stuttgart durchgeführt, die Messungen der Schwermetalle am Hygiene-Institut in Heidelberg vorgenommen.

des hohen Anteils der Nettoerosion in der Stauhaltung Lauffen an der gesamten Schwebstofffracht in Heidelberg (siehe unten), ist ein hoher Beitrag der Cadmiumremobilisation in Lauffen auch für die Schwebstoffe in Heidelberg anzunehmen. Eine Analyse des totalen Schwefelgehaltes der Schwebstoffe ergab einen Mittelwert des Schwefelgehaltes von 0,132 ± 0,04 %. Eine deutlich erhöhte Schwefelkonzentration von 0,209 % konnte für die Schwebstoffprobe des 1.11. von 6 Uhr nachgewiesen werden (Winn 2000). Da Sulfide eine wichtige Metallbindungsform in anoxischen Sedimenten des Neckars darstellen (Müller 1992, 1993, Müller et al. 1993), kann eine Erhöhung des Schwefelgehaltes ebenfalls als Hinweis auf eine Remobilisation von Altsedimenten verstanden werden.

Cytotoxizität des untersuchten Hochwassers. Abb. 7.14 zeigt den Gang der Cytotoxizität von Neckarschwebstoffen bei Heidelberg und Lauffen während des Hochwassers im Oktober 1998. In Heidelberg konnte die höchste Zelltoxizität mit einem NR_{50} von 20 mg Schwebstoff pro ml Testansatz für den 29.10.1998 (ansteigender Hochwasserast) nachgewiesen werden. Im Ansatz ohne S9-Supplementierung pendelte sich der NR_{50} auf einem Niveau von 40-60 mg/ml ein, mit S9-Mix (zum Ausgleich geringer Biotransformationskapazitäten der RTG-2-Zellen) veränderte sich das Cytotoxizitätsprofil der Schwebstoffe stark: Nach einer hohen Zelltoxizität zu Beginn des Hochwassers (NR_{50} von 20-150 mg/ml), wurden die Extrakte des Hochwasserpeaks durch S9 detoxifiziert (NR_{50} um 200 mg/ml) und im Bereich des abfallenden Hochwasserastes (tailing) wieder toxifiziert (NR_{50}: 100 mg/ml). Im Vergleich zum mittleren Winterhochwasser 1995/96 (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a) konnten beim hier untersuchten Hochwasser signifikant stärkere cytotoxische Wirkungen festgestellt werden (fast alle NR_{50}-Werte lagen jenseits des 95%-Perzentilwertes (ohne S9-Mix) des Hochwassers von 1995/96), so dass eine Remobilisierung von stärker kontaminierten Altsedimenten auch aufgrund der vorliegenden Biotestergebnisse angenommen werden kann. Die Cytotoxizität der Schwebstoffe ist ähnlich stark wie die von kontaminierten Altsedimenten aus Lauffen (Abb. 7.6). Eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ergab keine signifikante Korrelation der Cytotoxizität zur Cadmiumkonzentration. Für die Schwebstoffprobe (4 h-Mischprobe des 1.11. von 6 Uhr bis 10 Uhr), die der Wasserprobe mit der erhöhten Cadmiumbelastung am 1.11. um 6 Uhr zuzuordnen war, konnte mit einem NR_{50} von 25 mg/ml (ohne S9) eine deutlich erhöhte Cytotoxizität gegenüber den anderen Schwebstoffproben im Bereich des tailing nachgewiesen werden. Die korrespondierende Probe zum Schwebstoff mit dem Cadmiummaximum am 2.11. um 6 Uhr besaß mit einem NR_{50} von 50 mg/ml eine etwas geringere Cytotoxizität, die aber dennoch in der Größenordnung der

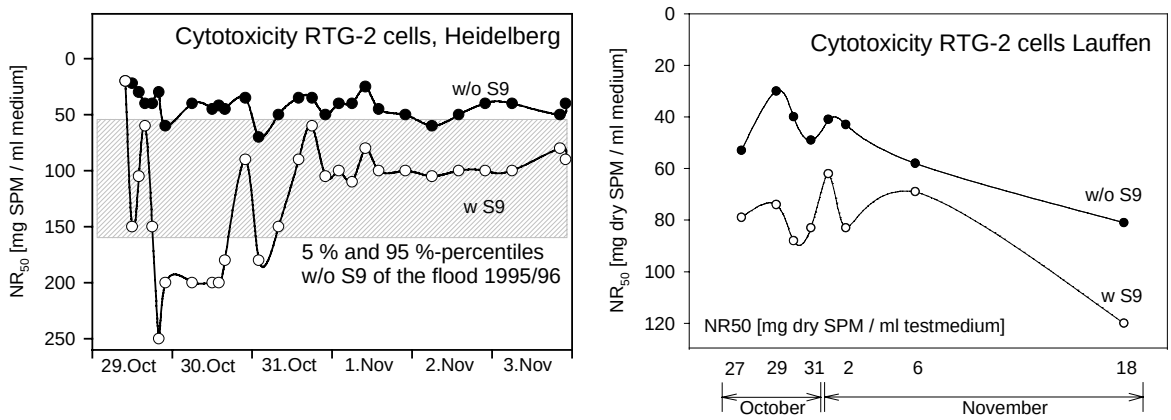


Abb. 7.14. Cytotoxische Wirkung von Schwebstoffen des Hochwassers im Oktober/November 1998 aus den Stauhaltungen Lauffen und Heidelberg. Die Toxizität von acetonischen Schwebstoffextrakten wurde mit der permanenten Zelllinie RTG-2 mit (w) und ohne (w/o) S9-Supplementierung untersucht. Der grau markierte Bereich zeigt zum Vergleich die 5- und 95% Perzentilen der Cytotoxizität von Schwebstoffextrakten des mittleren Hochwassers im Dezember 1995/96 (Hollert et al. 2000).

hochkontaminierten Sedimente der Stauhaltung Lauffen lag (Abb. 7.6). Es sei hier kritisch angemerkt, dass eine Korrelation des Cd-Gehaltes und des cytotoxischen Potenzials der Schwebstoffe mit Vorsicht interpretiert werden sollte, da die Cd-Konzentrationen von Schwebstoffen aus Wasserproben eine Momentaufnahme darstellten, wogegen die Schwebstoffproben aus den Schwebstofffallen Mischproben waren, die alle 2-4 h und im abfallenden Bereich des Hochwassers im Rhythmus von 8 h entnommen wurden. Somit integrieren Proben aus den Schwebstofffallen die Belastung über einen längeren Zeitraum, wobei kurzzeitige Belastungsspitzen verdünnt werden können. Die Probe mit einer auffällig erhöhten AOX-Konzentration (31.10. 22 Uhr, Abb. 7.11) bewirkte keine signifikante Veränderung der Cytotoxizität. Auch für Schwebstoffe der Stauhaltung Lauffen konnte während des gesamten Hochwasserverlaufes eine hohe cytotoxische Wirkung gezeigt werden (Abb. 7.14), die jeweils eine vergleichbare Größenordnung wie hoch kontaminierte Altsedimente der Stauhaltung besaß (Abb. 7.6). Die Maxima der Cytotoxizität konnten für den aufsteigenden Ast des Hochwassers und für die am 1. und 2. November entnommenen Schwebstoffe (jeweils Mischproben über etwa 24 h) nachgewiesen werden. Das Cadmiummaximum der Schwebstoffe aus den Wasserproben (ab dem 1.11) korreliert somit mit dem zweiten Cytotoxizitätsmaximum.
Zusammenfassend ließ sich für das Hochwasser 1998 sowohl in Heidelberg als auch in Lauffen eine stark erhöhte partikulär gebundene Cytotoxizität ermitteln, die zum Teil mit der Remobilisation von Altsedimenten erklärt werden kann. Die unterschiedlichen Verhältnisse der Cytotoxizität mit und ohne S9 deuten auf eine große Heterogenität der cytotoxisch wirksamen Substanzen hin (Braunbeck et al. 1997b, Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a): Die höchste zelltoxische Wirkung wurde jeweils im Bereich der ansteigenden Ganglinie detektiert. Aufgrund der Befunde von Schwermetallanalysen scheint eine Remobilisation von Altsedimenten während dieses Abschnittes nicht stattgefunden zu haben oder von untergeordneter Bedeutung gewesen zu sein. Die hohe Toxizität der Schwebstofffracht zu Beginn des Hochwasserereignisses könnte durch den zu diesem Zeitpunkt sehr hohen Anteil an stark kontaminiertem Oberflächenabfluss (Boxall & Maltby 1995, Hellmann 1996, Maltby et al. 1995a, b) bestimmt sein. Partikulär gebundene Luftschadstoffe mit einer hohen Toxizität (Clonfero 1997, Erdinger et al. 1997, Haglund et al. 1987, Hannigan et al. 1998, Poli et al. 1999) oder Ablagerungen in Mischwasserkanalisationsnetzen (Kraut & Bondareva 2000) können remobilisiert werden und aufgrund von Kläranlagenentlastungen oftmals unbehandelt in den Vorfluter gelangen. Auch kommunale Abwässer, die nicht zurückgehalten werden können (Symader et al. 1991) und Einträge von landwirtschaftlich genutzten Flächen (Liess & Schulz 1997) können für die hohe Toxizität beim aufsteigenden Ast des Hochwassers verantwortlich gemacht werden.

Bakterientoxizität. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit den Proben der Sedimentbewertungstriade (Abschnitt 4) zu gewährleisten, wurden im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* jeweils 3 g nativer Schwebstoff im Testansatz untersucht. Für alle untersuchten Schwebstoffe konnte bei einer Einwaage von 3 g nativem Schwebstoff eine sehr hohe Hemmung (zwischen 60 und 100 %) festgestellt werden (Abb. 7.15). Ausgewählte Schwebstoffproben wurden mit Quarzsand der Siebklasse W4 verdünnt, um Dosis-Wirkungskurven für das bakterientoxische Potenzial zu erhalten. Dabei konnte

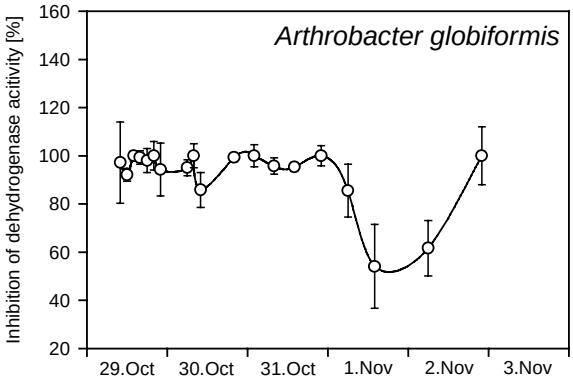


Abb. 7.15. Bakterientoxizität von nativen Schwebstoffen der Stauhaltung Heidelberg des Hochwassers im Oktober/November 1998 im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*. Datengrundlage: Winn (2000).

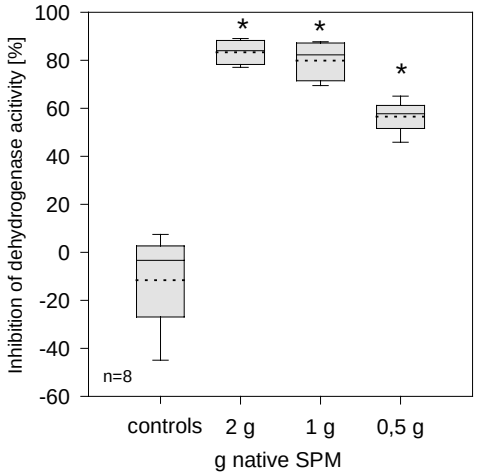


Abb. 7.16. Dosis-Wirkungsbeziehung der Bakterientoxizität des Schwebstoffes vom 29.10. 10 Uhr aus Heidelberg. Die mit * markierten Proben induzierten eine signifikante Hemmung gegenüber den Kontrollansätzen (*Post hoc*-Test nach Dunnett, $p < 0{,}05$); Datengrundlage: Winn (2000).

beispielsweise für den Schwebstoff vom 29.10. um 10 Uhr, der auch im akuten Zelltest eine hohe cytotoxische Wirkung zeigte, selbst bei 0,5 g Schwebstoffeinwaage (Abb. 7.16; 1:6 Verdünnung gegenüber dem Originalansatz) eine Bakterienhemmung von 57 % ermittelt werden. Die Hochwasserschwebstoffe des Oktoberhochwasser 1998 besaßen somit ein deutlich höheres Schädigungspotenzial als die meisten Sedimenten einer integrierten Sedimentbewertung im Einzugsgebiet des Neckars (Abschnitt 4). Der Bakterienkontakttest mit *Bacillus cereus* wurde für mehrere Längskartierungen von Elbe und Rhein eingesetzt (Gratzer & Ahlf 1999a). An der Elbe konnten bei einer Einwaage von 2 g Sediment Hemmungen zwischen –6.9 % (Stimulierung) bis zu 100 % nachgewiesen werden, wobei Werte zwischen 20 und 60 % dominierten. Die Sedimentproben des Rheins (Flusskilometer 639-854) bewirkten bei *Bacillus cereus* Hemmungen zwischen 20 und 80 % (Gratzer & Ahlf 1999a). In Anbetracht der hohen Vergleichbarkeit der Biotestbefunde zwischen den Bakterienkontaktassays mit *Arthrobacter globiformis* und *Bacillus cereus* kann somit für die untersuchten Hochwasserschwebstoffe des Neckars vom Oktober 1998 auch ein erhöhtes Schädigungspotenzial im Vergleich zu Sedimenten von Rhein und Elbe angenommen werden.

Genotoxizität und Mutagenität. Abb. 7.17 zeigt die Genotoxizität vier ausgewählter Hochwasserschwebstoffextrakte im eukaryontischen Comet-Assay mit RTG-2-Zellen. Insbesondere für ein Extrakt im ansteigenden Ast konnte mit einem Induktionsfaktor von 25,7 eine sehr hohe gentoxische Wirkung nachgewiesen werden. Es sei angemerkt, dass die hohe Genotoxizität bei einer Schwebstoffäquivalentkonzentration von nur 6 mg/ml Testmedium untersucht wurde. Dies entsprach einer nur 4- bis 5-fachen Aufkonzentrierung gegenüber der Schwebstoffkonzentrationen, die in den nativen Wasserproben während dieses Abflusses gemessen werden konnten. In jüngeren Untersuchungen konnten mit Hilfe des Comet-Assays an Leber- und Kiemengewebe von Fischen aus dem Neckar gentoxische Effekte *in vivo* und weiterhin mit licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen histopathologische Schädigungen an Fisch-

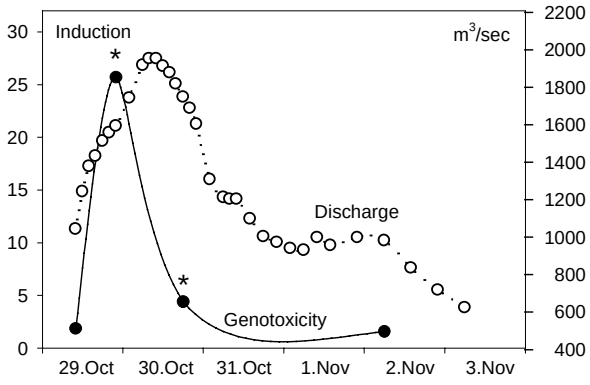


Abb. 7.17. Verlauf der genotoxischen Wirkung acetonischer Schwebstoffextrakte des Hochwassers im Oktober 1998 im Comet-Assay mit RTG-2-Zellen ohne S9-Supplementierung. Die Induktionsfaktoren wurden aus den Medianen der Tail moments aus jeweils 100 Messungen ermittelt. Für jeden Extrakt ist der höchste Induktionsfaktor einer Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt. Die sehr hohe Genotoxizität im Bereich des aufsteigenden Astes wurde bei einer Extraktkonzentration von nur 6 mg Schwebstoffäquivalent pro ml Medium nachgewiesen. *: signifikanter Unterschied zur Kontrolle im Dunnett-Test mit $p < 0{,}05$.

en nachgewiesen werden (Schnurstein 2000). Da eine erhöhte Ingestion von Schwebstoffen und eine Ablagerung im Bereich der Kiemen bei Fischen während Hochwasserereignissen *a priori* angenommen werden muss, ist der Befund der hohen Genotoxizität der Schwebstoffextrakte insbesondere vor dem Hintergrund von Schädigungen von Neckarfischen als sehr problematisch zu bewerten. Die hohe Induktion der Probe vom 29.10. korreliert mit einem Maximum des AOX (Abb. 7.11) und erhöhten Zink-, Kupfer- und Chromkonzentrationen (Abb. 7.12), wogegen die Cadmiumkonzentration in dieser Probe eher gering war. Vor dem Hintergrund einer hohen Korrelation einer mutagenen Wirkung von Luftstäuben mit Konzentrationen an Chrom und organischen Halogenen (Erdinger et al. 1997) und der toxischen Wirkung von Straßenabflüssen mit erhöhten Konzentrationen an organischen Schadstoffen, Kupfer und Chrom (Boxall & Maltby 1995, Maltby et al. 1995a, b) aber auch der mehrfach gezeigten gentoxischen Wirkung von Luftstäuben im Comet-Assay (Cotelle & Ferard 1999, Poli et al. 1999, Sram et al. 1999), scheint hochkontaminierter Oberflächen-Runoff mit remobilisierten Luftstäuben einen hohen Beitrag zur gentoxischen Wirkung der Schwebstoffprobe des 29.10. um 22 Uhr zu liefern.

Während für die Schwebstoffe des mittleren Hochwasser im Dezember 1995/96 keine signifikante Mutagenität im Ames-Test ermittelt werden konnte (Hollert & Braunbeck 1997, Hollert et al. 2000a), ließ sich für einige Schwebstoffextrakte des Hochwassers im Oktober/November 1998 sowohl in Heidelberg als auch in Lauffen mit Induktionsfaktoren bis zu 2 eine geringe, jedoch signifikante Mutagenität nachweisen (Abb. 7.18). Ein Vergleich der Mutagenität mit und ohne S9 deutete für die Schwebstoffe eine heterogene Zusammensetzung mit gentoxischen Inhaltsstoffen an: Im Bereich des ansteigenden Astes des Hochwassers konnte zunächst mit und ohne S9 eine deutliche mutagene Wirkung detektiert werden, ab dem Scheitelpunkt wirkten die Ansätze mit S9 stärker mutagen (Dominanz lipophiler Verbindungen, die einer Aktivierung durch P450-abhängige Enzymsysteme bedürfen) und ab dem 1. November bewirkten die Ansätze ohne S9 etwas höhere Induktionsfaktoren. In Lauffen wirkten nur die Ansätze ohne S9-Supplementierung mutagen, wobei ein Maximum der mutagenen Wirkung am 1.11. und nach dem Hochwasser (18.11.) nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Induktion für die Schwebstoffsammelprobe des 1.11. korrelierte gut mit der Erhöhung der Cadmiumbelastung (vgl. Abb. 7.13). Cadmium ist für seine gentoxische Wirkung im SOS- und Mutatox-Test (Codina et al. 1995), im Mikronukleus-Assay und Schwesterchromatidaustausch-Test (Fahmy & Aly 2000) und im Comet-Assay (Risso-de Faverney et al. 2001), aber auch für die Induktion von Apoptose

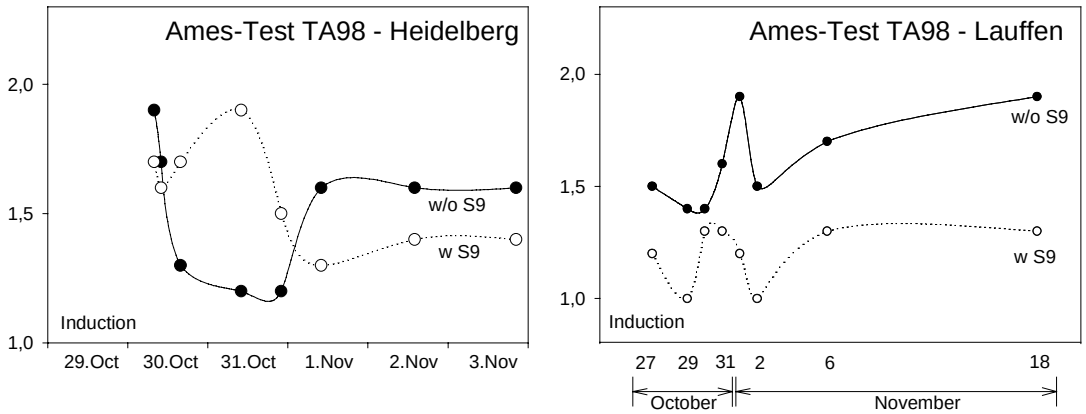


Abb. 7.18. Verlauf des mutagenen Potenzials in acetonischen Extrakten aus Schwebstoffen des Neckarhochwassers im Oktober/November 1998 für die Stauhaltungen Heidelberg und Lauffen. Es sind die Induktionsfaktoren von 250 mg Schwebstoffäquivalent pro Ames-Platte dargestellt. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Dunnett-Test ergab für alle Proben mit einem Induktionsfaktor über 1,5 (Heidelberg) und 1,4 (Lauffen) eine statistisch signifikante Mutagenität im Ames-Test mit dem Stamm TA 98.

in Hepatocyten von Regenbogenforellen (Risso-de Faverney et al. 2001) und seine kanzerogene Wirkung (Snow 1992) bekannt. Im Ames-Test konnte für Cadmium jedoch wiederholt keine mutagene Wirksamkeit nachgewiesen werden (Übersichten bei den Online-Datenbanken des Pasteur-Institutes http://www.pasteur.fr/externe und der Amerikanischen Umweltbehörde, EPA-GENE-TOX, http://toxnet.nlm.nih.gov/). Vielmehr scheinen andere gentoxische Verbindungen, wie etwa PAHs, die ebenfalls in kontaminierten Altsedimenten in erhöhten Konzentrationen nachzuweisen sind, für die mutagene Wirkung dieser Schwebstoffe im Ames-Test verantwortlich zu sein.

Endokrine Belastung von Schwebstoffen und Wasserproben. Da zur endokrinen Wirkung von Wasserproben und Schwebstoffen während Hochwasserereignissen bisher keine Daten vorliegen, wurden ausgewählte Proben des Hochwassers vom Oktober/November 1998 aus Heidelberg bezüglich ihrer Konzentrationen an endokrin wirksamen Substanzen untersucht. Die Analysen wurden von Herrn Holtey-Weber (Hygiene-Institut Bonn) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Insgesamt 4 Schwebstoffproben wurden als acetonische Extrakte mit dem Dot-Blot-Assay an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (Islinger et al. 1999b) in Dosis-Wirkungskurven untersucht, um eine erste Abschätzung des endokrinen Potenzials von Hochwasserschwebstoffen zu ermöglichen. Für den Schwebstoffextrakt des aufsteigenden Asts des Hochwassers konnte bei einer Konzentration von 12 mg Schwebstoffäquivalente pro ml Testansatz mit 0,75 pg/µg Gesamt-RNA eine signifikant erhöhte Vitellogenin-mRNA-Induktion gegenüber der Positivkontrolle 100 pM 17ß-Estradiol (0,57 pg/µg) nachgewiesen werden. Gegenüber den Schwebstoffkonzentrationen in den nativen Wasserproben (< 1500 mg/L) bedeutete die eingesetzte Konzentration eine mehr als achtfache Aufkonzentrierung im Testansatz. Abb. 7.19 zeigt das östrogene Potenzial der 4 Proben im Verlauf des Hochwassers, dargestellt als 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen.
In Abb. 7.20 sind Konzentrationen endokrin wirksamer Substanzen in Wasserproben und Schwebstoffen der Stauhaltung Heidelberg dargestellt. In den filtrierten Wasserproben konnten insbesondere im ansteigenden Ast des Hochwassers stark erhöhte Konzentrationen an endokrin wirksamen Substanzen nachgewiesen werden. Nonylphenol und Octylphenol konnten mit bis zu 428 ng/L und 95 ng/L sowie alle untersuchten Phtalate mit bis zu 7,7 µg/L für Benzylbutylphthalat nachgewiesen werden. Bei Nonylphenol lag die nachgewiesene Maximalbelastung einen Faktor 10 über der Konzentration des am stärksten belasteten Gewässers der integrierten Sedimentbewertung im Einzugsgebiet des Neckars (Abschnitt 4). Auch im Vergleich zu den maximalen gegenwärtigen Nonylphenolkonzentrationen in Schweizer Fließgewässern von bis zu 300 ng/L (Bätscher et al. 1999) und den Größenordnungen von Expositionsdaten für Nonylphenol in Oberflächengewässern in der Bundesrepublik Deutschland von 5 bis 40 ng/L (Frey 2000) erscheinen die Konzentrationen während des ansteigenden Asts als problematisch. Atrazin konnte während des tailing in erhöhten Konzentrationen im Vergleich zu den Befunden aus Routinebeprobungen der LfU Baden-Württemberg im Jahre 1997 (LfU 1998, n = 13, Mittelwert 18 ng/L, Maximum 30 ng/L) (TVO

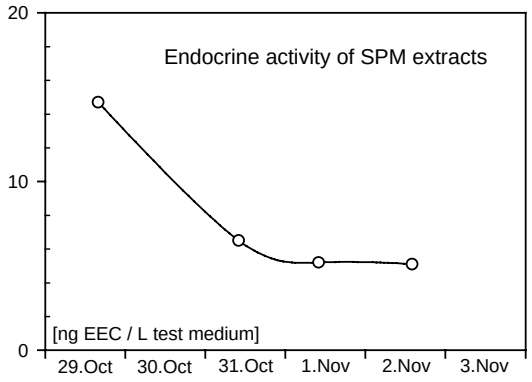


Abb. 7.19. Östrogene Wirkung acetonischer Extrakte von Hochwasserschwebstoffen im Dot-Blot-Assay mit isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. Es wurde jeweils die höchste Vitellogenin-Induktion aus einer Dosis-Wirkungskurve mit Hepatocyten aus einem Fisch als Berechnungsgrundlage eingesetzt. Die Daten sind als 17ß-Estradiol-Äquivalentkonzentrationen (EEC) in ng pro L Testmedium dargestellt. Da auch in der Lösungsmittelkontrolle eine leichte endokrine Wirkung verzeichnet werden konnte, wurden die EEC um die Induktion der Kontrolle bereinigt.

1990) von 100 ng/L lagen. Die erhöhten Atrazinkonzentrationen können als Indikator für die Zeitspanne eines hohen Eintages von landwirtschaftlich geprägten Flächen angesehen werden, der offensichtlich ein Maximum am 31.10. und 1.11. erreichte. Nach *On-line*-Silylierung im GC-MS-MS (Methode nach Holtey-Weber et al. 1999) konnte von allen untersuchten Steroiden (Liste der untersuchten Parameter in Tab. 4.8) nur Estradiol mit bis zu 13 ng/L (!) in den Wasserproben detektiert werden.

Bei den Schwebstoff-assoziierten endokrinen Schadstoffen konnte ein erstes Maximum endokriner Wirkstoffe vor dem Scheitelpunkt des Hochwassers und ein weiteres vom 30. auf den 31.Oktober detektiert werden. Dieses Maximum korrelierte sehr gut mit den Befunden aus dem Bioassay, wobei aufgrund der Analysedaten eine höhere endokrine Wirkung im Bioassay zu erwarten gewesen wäre. Bezieht man den Anteil der partikulären endokrinen Belastung aus dem Dot-Blot-Assay auf die Wasserproben, würde selbst die maximale Belastung des Schwebstoffes die 17ßEstradiol-Äquivalentkonzentrationen der Wasserproben nur um etwa 2 ng/L erhöhen. Während sich aufgrund der hohen Nachweisgrenze (Matrixeffekte bei einer 1:20-Verdünnung des organischen Ausgangsextraktes für die Bioassays, vgl. Abschnitt 4.5.6) keine Steroide nachweisen ließen, konnten für Nonylphenol, Octylphenol, Diethylhexylphthalat und Dibutylphthalat sehr hohe Konzentrationen ermittelt werden (Abb. 7.20). Vergleichbar hohe Maximalbelastungen von Alkylphenolen in Schwebstoffen und Sedimenten wurden aber auch von anderen Autoren beschrieben (ARGE 2000, Bätscher et al. 1999, Frey 2000, Kannan et al. 1999, Khim et al. 1999c, Rudel et al. 1998, Servos 1999). Bei einer Untersuchung zahlreicher schwebstoffbürtiger Sedimente nach Kläranlagen- und direkten Regenwasserentlastungseinleitungen konnte in Virginia (USA) bis zu 17 100 µg/kg Nonylphenol nachgewiesen werden (Hale et al. 2000). Die stark erhöhten Konzentrationen gelöster und partikulär gebundener endokriner Subs-

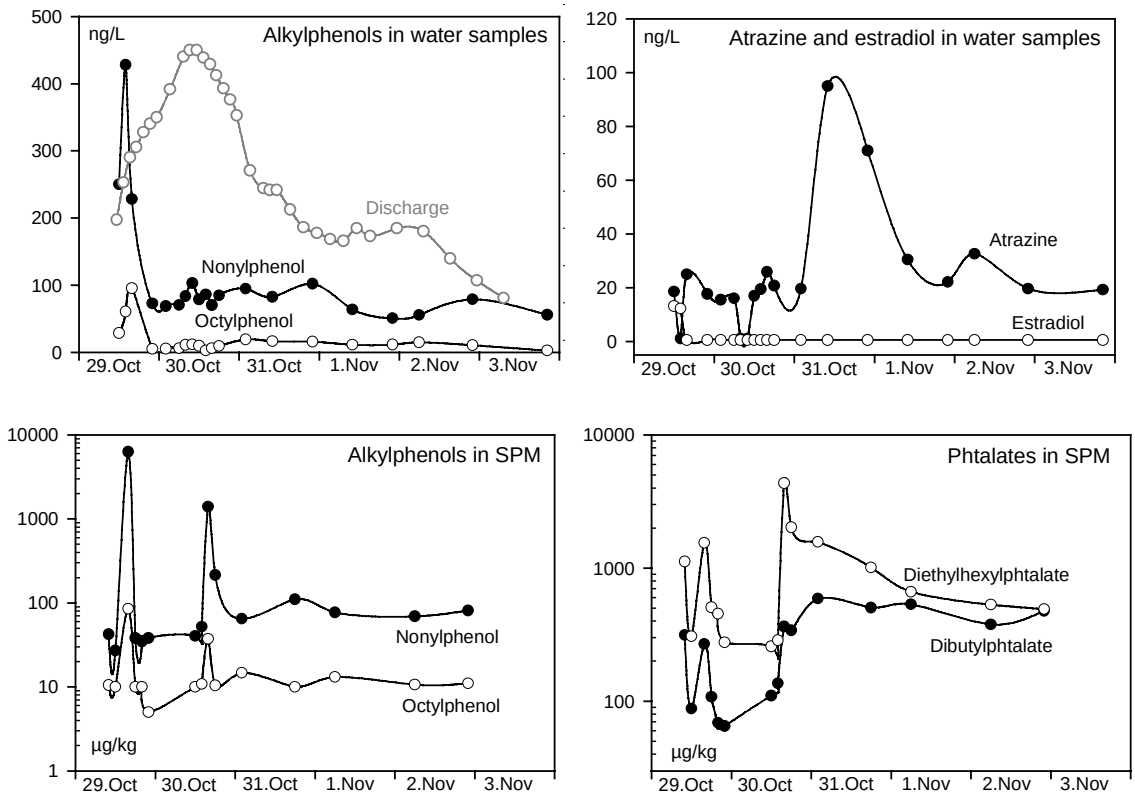


Abb. 7.20. Endokrin wirksame Substanzen in Wasserproben und acetonischen Schwebstoffextrakten des Neckarhochwassers im Oktober/November 1998 in Heidelberg. Die Abflussganglinie (Discharge) ist dimensionslos zum Vergleich dargestellt. Datengrundlage: Holtey-Weber (2000).

tanzen während des ansteigenden Asts des Hochwassers lassen sich somit durch eine Kombination aus Einleitungen ungeklärter Abwässer in die Vorfluter (Kraut & Bondareva 2000, Pardos & Blaise 1999), Remobilisierung von Sedimenten, Klärschlämmen und Ablagerungen in Mischkanalisationssystemen (Engwall et al. 1998b, Kraut & Bondareva 2000) und durch den Eintrag endokrin wirksamer Luftschadstoffe (Clemons et al. 1998) erklären. Insgesamt konnte bei dem untersuchten Hochwasser ein geringes bis mäßiges endokrines Potenzial im Bioassay und ein hohes mit Hilfe der chemischen Analytik detektiert werden. Ein solcher Befund ließe sich durch eine antiöstrogene Wirkung der komplexen Stoffgemische in Schwebstoffextrakten erklären und konnte für PAHs und PCBs bereits mehrfach demonstriert werden (Arcaro et al. 1999, Beck & Karbe 2000, Gagne et al. 1999, Gülden et al. 1997, Lutz & Kloas 1999). Daher wurde beim Februar-Hochwasser 1999 die östrogene und antiöstrogene Aktivität von Hochwasserschwebstoffen mit dem Dot-Blot-Assay im Rahmen einer Diplomarbeit detaillierter untersucht (Wetterauer 2001).

Ermittlung der Frachtbilanzen des untersuchten Hochwassers. Im Rahmen des PWAB-Projektes 96-182 des Institutes für Wasserbau Stuttgart wurden für das Hochwasser im Oktober 1999 auch die Gesamtfrachten der Schwebstoffe im Neckar zwischen Deizisau und Lauffen sowie bei Heidelberg zwischen dem 29.10.98 0 Uhr und 5.11.98 24 Uhr experimentell ermittelt (Haag et al. 1999b). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Deizisau 56 000 t Schwebstoffe in den schiffbaren Teil des Neckars eingetragen wurden. Bei Lauffen verließen insgesamt 241 000 t die Bilanzierungsstrecke. Da auf dieser Fließstrecke alle relevanten Nebenflüsse erfasst wurden (siehe Abb. 7.21) konnte die berechnete Gesamtfracht von 129 000 t als Nettoerosion in dem Gewässerabschnitt von Deizisau bis Lauffen interpretiert werden (Haag et al. 1999b). In Heidelberg ließen sich 286 000 t Schwebstoff bilanzieren,

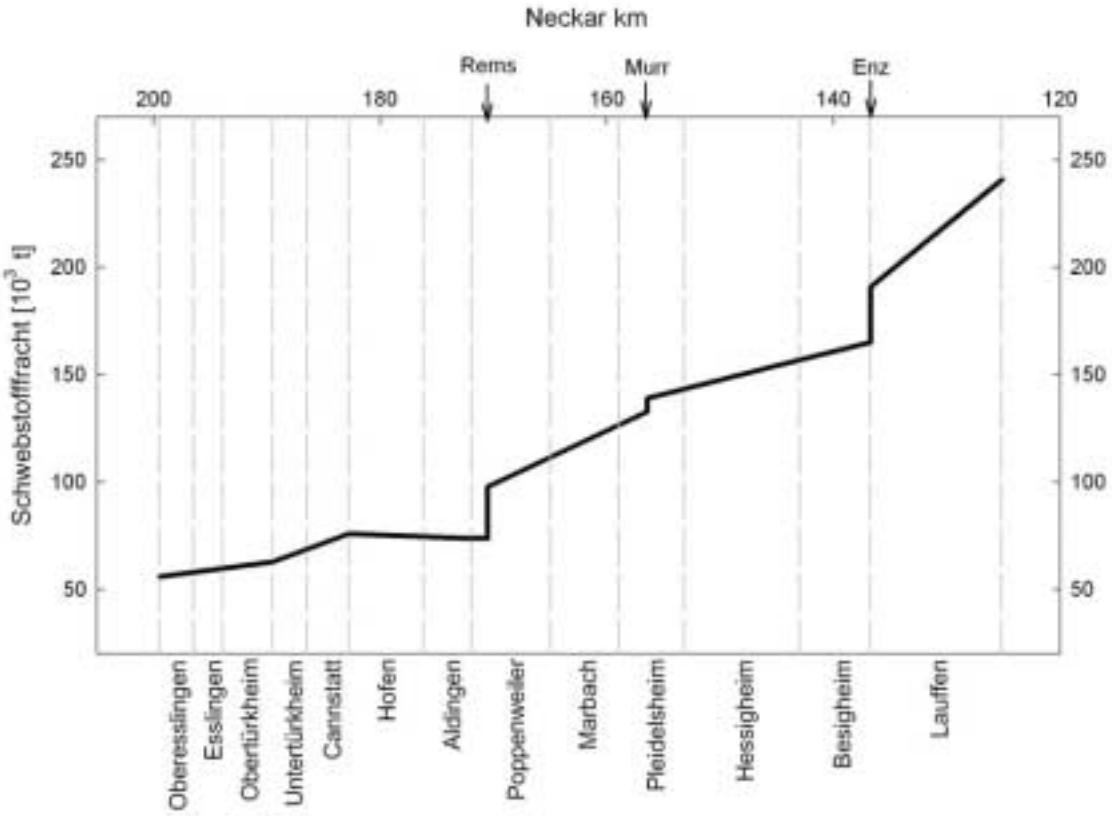


Abb. 7.21. Längsverlauf der für das Hochwasser im Oktober/November 1998 experimentell ermittelten Schwebstoffgesamtfrachten im Neckar zwischen Deizisau (Stauhaltung Oberesslingen) und Lauffen; aus Haag et al. (1999b).

so dass in dem Abschnitt zwischen Lauffen und Heidelberg nur ein mäßiger Nettozuwachs von 45 000 t ermittelt werden konnte, der vermutlich zu großen Teilen auf die Nebenflüsse Jagst, Kocher und Elsenz zurückzuführen ist. Daher kann angenommen werden, dass zwischen Lauffen und Heidelberg nur noch eine geringe Menge an Sedimenten erodiert wurden oder es sogar zu einer Nettosedimentation kam (Haag et al. 1999b). Aus den Teilbilanzen (Abb. 7.21) wird deutlich, dass auf der 11,6 km langen Strecke der Stauhaltung Lauffen mit 50 000 t die größte Sedimentmenge (= 17,5 % der ermittelten Gesamtfracht bei Heidelberg, bei der Annahme keiner Sedimenation auf dieser Strecke) remobilisiert wurde. Dies ist deutlich mehr als die 36 000 t bzw. 24 000 t Nettoerosion, die Kern & Westrich (1996) für die Hochwässer im Dezember 1993 und April 1994 ermittelten. Diese beiden Hochwässer hatten mit 1250 und 1389 m^3/s deutlich höhere Scheitelabflüsse als das untersuchte Hochwasser im Oktober 1998 (Abb. 7.10), aber wesentlich geringere Abflussfüllen (Haag et al. 1999b) Die große Nettoerosion kann durch die lange Zeitspanne zum vorangegangen signifikanten Hochwasserereignis (Februar 1997) und einer daraus resultierenden Ablagerung wenig konsolidierten und leicht zu erodierenden Materials erklärt werden. Zum anderen scheint es während des langen abfallenden Astes (tailing) der Hochwasserganglinie, bei dem der Abfluss zwischen 800 und 400 m^3/s schwankte, offenbar zu keiner Sedimentation gekommen zu sein (Haag et al. 1999b).

Das Hochwasser im Februar 1999

Etwa vier Monate nach dem Hochwasser im Herbst 1998 mit seiner zwanzigjährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit kam es vom 20. bis zum 23. Februar 1999 am Neckar erneut zu Überschwemmungen. Vorausgegangen waren wiederum starke Regenfälle im Schwarzwald und Odenwald ab dem 19. Februar, bei denen Spitzenwerte von über 70 mm pro Tag gemessen wurden (DWD 1999).
Der Wasserstand stieg am Pegel Heidelberg/Karlstor von 219 cm (19. Februar) auf bis zu 513 cm. Die maximale Abflussrate betrug am 21. Februar um 14 Uhr 1855 m^3/sec (HVZ 1999), so dass das Ereignis statistisch eine etwa 15-jährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit besaß. Nachdem bereits beim Oktoberhochwasser 1998 eine starke Erhöhung der ökotoxikologischen Belastung gegenüber einem mittleren Hochwasser 1995/96 nachgewiesen werden konnte, sollte an dem Hochwasser im Februar 1999 untersucht werden, ob eine schnelle zeitliche Abfolge zweier extremer Hochwasserereignisse zu einer Erhöhung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials führt.
Im Gegensatz zum Hochwasser im Oktober 1998 konnten während des Februar-Hochwassers keine umfassenden hydrologischen und chemischen Untersuchungen durchgeführt werden. Vielmehr sollte mit Hilfe verschiedener Biotests geklärt werden, ob die kurze Abfolge zweier extremer Hochwässer zu einer weiteren Erhöhung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials führt.

Bakterientoxizität. Eine Untersuchung des Ganges der Bakterientoxizität nativer Schwebstoffe gegenüber *Arthrobacter globiformis* ergab ein ähnlich hohes Schädigungspotenzial wie für das Oktober-Hochwasser (für detaillierte Angaben siehe Winn 2000).

Östrogene und antiöstrogene Wirksamkeit. Im Gegensatz zum Hochwasser im Oktober 1998 konnte für die insgesamt 16 acetonischen Extrakte von Schwebstoffen mit Hilfe des Dot-Blot-Assays keine östrogene Wirksamkeit nachgewiesen werden (Wetterauer 2001). Zum Nachweis einer antiöstrogenen Wirksamkeit wurden die acetonischen Extrakte mit 1 nM der östrogen wirksamen Positivkontrolle 17ß-Estradiol versetzt. Das antiöstrogene Potenzial wurde als prozentuale Hemmung der östrogenen Aktivität von 1 nM 17β-Estradiol angegeben (Wetterauer 2001). Zur Quantifizierung der antiöstrogenen Wirksamkeit wurden Standards mit 1 nM 17ß-Estradiol und jeweils 0,0, 0,01, 0,1 und 1 µM der antiöstrogen wirksamen Substanz Tamoxifen eingesetzt. Die maximale antiöstrogene Wirksamkeit konnte während des aufsteigenden Asts des Hochwassers und im Bereich des Scheitelpunkts nachge-

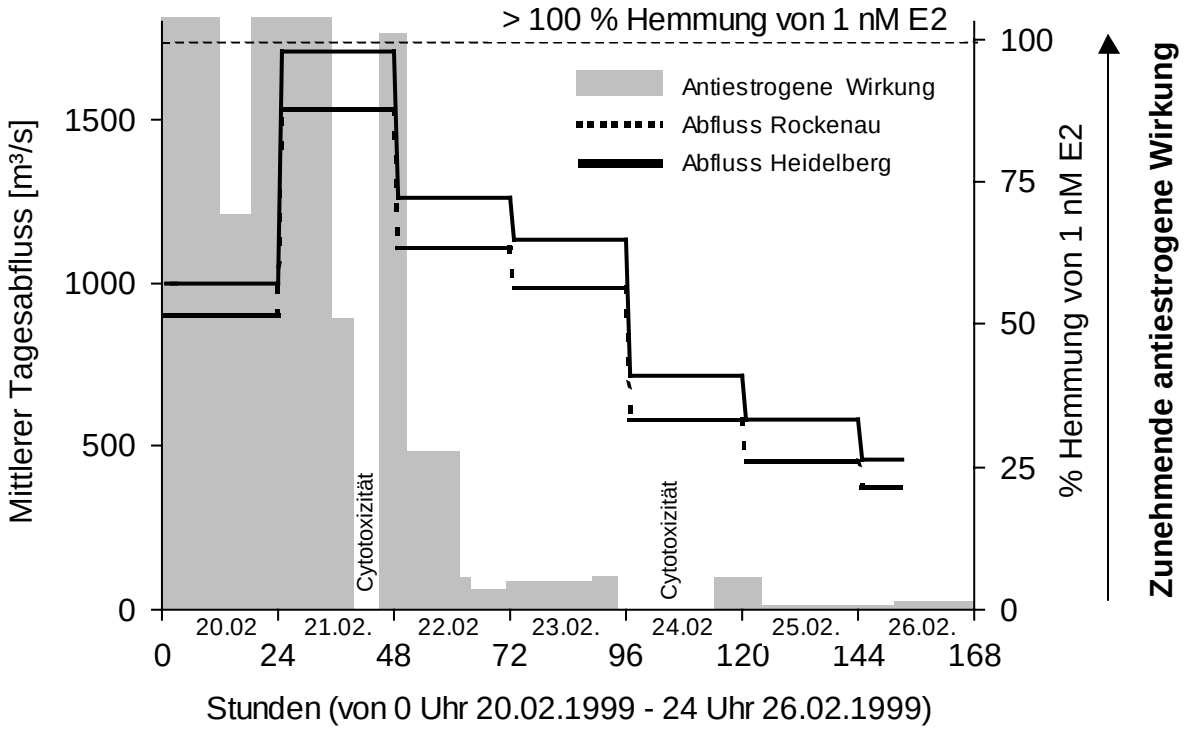


Abb. 7.22. Tagesmittel der Abflüsse während des Hochwassers im Februar 1999 und antiöstrogene Wirkung von acetonischen Schwebstoffextrakten aus der Stauhaltung Heidelberg im Dot-Blot-Assay mit isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle; aus Wetterauer (2001).

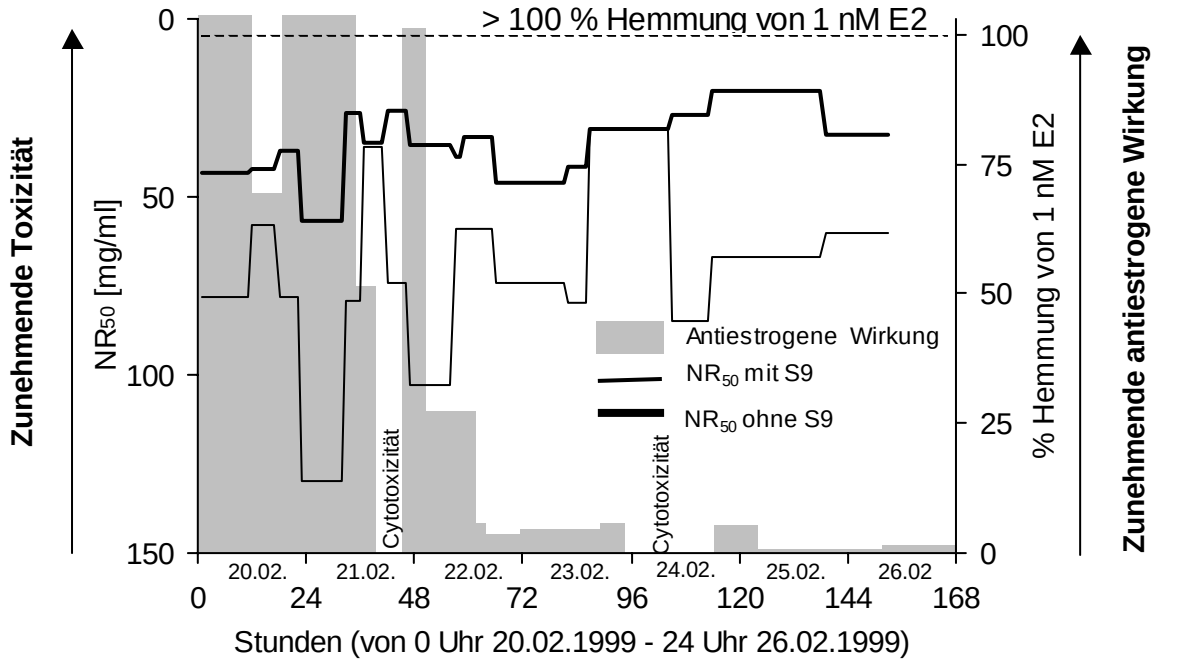


Abb. 7.23. Gang der cytotoxischen und antiöstrogenen Wirkung von acetonischen Schwebstoffextrakten der Stauhaltung Heidelberg während des Hochwassers vom 20.02. bis 26.02.1999. Bei den mit Cytotoxizität markierten Proben konnte bei der eingesetzten Testkonzentration von 50 mg/ml aufgrund von Cytotoxizität keine Messung der antiöstrogenen Aktivität durchgeführt werden; aus Wetterauer (2001).

wiesen werden (Abb. 7.22). Eine signifikante antiöstrogene Wirkung von Sedimentextrakten konnte auch von Arcaro et al. (1999), Beck & Karbe (2000) und Gagne et al. (1999) nachgewiesen werden. Insbesondere PAHs (Arcaro et al. 1999, Navas & Segner 2000), aber auch PCBs (Connor et al. 1997, Krishnan & Safe 1993) und bestimmte DDT-Metabolite sind für eine antiöstrogene Wirkung bekannt. Untersuchungen von Smeets et al. (1999) dokumentieren eine antiöstrogene Wirksamkeit vieler Substanzen mit einer großen Affinität zum Ah-Rezeptor und deuten an, dass die antiöstrogene Wirksamkeit verschiedener PAHs, PCBs, PCDD/Fs durch den Ah-Rezeptor aber nicht über CYP1A vermittelt wird. Da diese Substanzgruppen sowohl in schwebstoffbürtigen Sedimentablagerungen (ARGE-Elbe 1992, 1996, 2000, Hollert et al. 2001), in kontaminierten Altsedimenten (Haag et al. 1999b, Müller 1992, Müller et al. 1993) als auch assoziiert an Luftstäube (Erdinger et al. 1997) in erhöhten Kon-

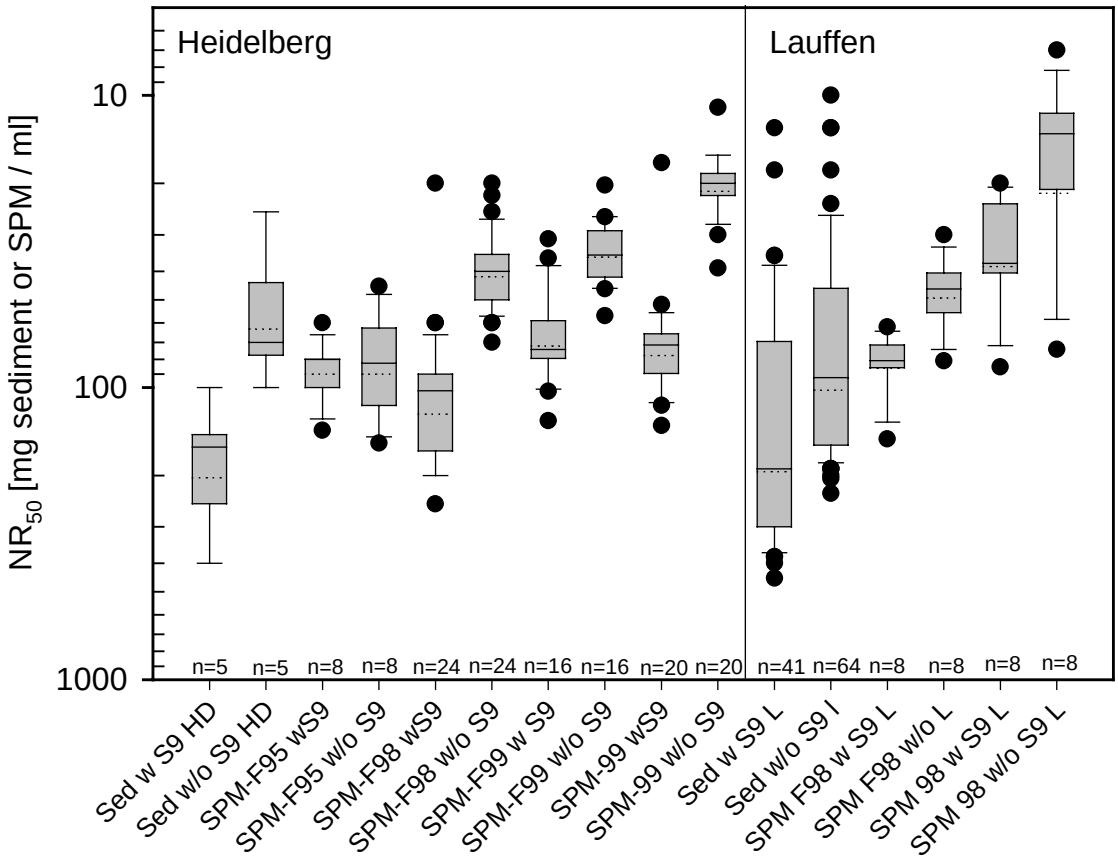


Abb. 7.24. Vergleich der Cytotoxizität von Sedimenten und Schwebstoffen aus den Stauhaltungen Heidelberg und Lauffen am Neckar. Sed: Sediment, SPM: Schwebstoff, F: Hochwasser, L: Lauffen, HD: Heidelberg, w S9: mit S9, w/o S9: ohne S9. Die Box-Wisker-Plots zeigen die Mediane (durchgezogen), die Mittelwerte (unterbrochen), die 25- und 75 %-Konfidenzintervalle (Boxgrenzen) die Standardabweichung und Ausreißer (●) an. Datengrundlage: **Stauhaltung Heidelberg:** Sed HD: Wieblinger Wehr 1996 Hollert & Braunbeck (1997) und unpublizierte Daten der Stauhaltung Schwabenheim (Neckarbeprobung mit der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1999); SPM-F95: mittleres Neckarhochwasser 1995/96 (< HQ_1) (Hollert et al. 2000), SPM-F98: Oktoberhochwasser 1998 (HQ_{20}, Abschnitt 7.2), SPM-F99: Neckarhochwasser Februar 1999 (HQ_{15}, Wetterauer 2001), SPM-99: Schwebstoffmischproben Heidelberg von 14.11.98 bis zum 7.1.2000 (Wetterauer 2001). **Stauhaltung Lauffen:** Sed L: Sedimentbohrkerne von 1994 (Hollert & Braunbeck 1997), 1998 (Hollert 2001) und 1999 (Neckarbeprobung mit der BfG, unveröffentlicht); SPM F98 L: Hochwasserschwebstoff Oktoberhochwasser 1998 (Abschnitt 7.2), SPM 98: Schwebstoffmischproben Lauffen (Wetterauer 2001) von 13.05.98 bis zum 1.7.2000.

zentrationen nachgewiesen werden konnten (vgl. auch Abschnitt 4), erscheint ein Maximum der antiöstrogenen Wirkung zu Beginn des Hochwassers und im Bereich des Scheitelpunktes plausibel.

Cytotoxizität. Der Gang der cytotoxischen Wirksamkeit der Hochwasserschwebstoffe des Hochwassers im Februar ist in Abb. 7.23 dargestellt. Es ist eine insgesamt heterogene Verteilung des cytotoxischen Potenzials zu erkennen, wobei der höchste Effekt am Hochwasserscheitelpunkt und im Bereich des tailing nachgewiesen werden konnte. S9-Supplementierung führte zu nicht vorhersagbaren Veränderungen bei der Cytotoxizität: Während bei den meisten untersuchten Schwebstoffproben die Ansätze mit S9 eine deutlich geringere Toxizität besaßen, näherten sich die Kurven mit und ohne S9 bei den beiden Cytotoxizitätsmaxima an. Bei einer Korrelation der cytotoxischen und antiöstrogenen Wirkung fällt auf, dass starke Einbrüche der antiöstrogenen Aktivität in der Regel mit hohen Cytotoxizitätswerten korrelierten. Ein Vergleich der Schwebstoffe des Februarhochwassers mit den NR_{50}-Werten anderer Hochwasser- und Sedimentbeprobungen (Abb. 7.24) zeigte im Rangsummentest nach Mann-Withney ein signifikant höheres Schädigungspotenzial gegenüber den Hochwasserproben des Oktoberhochwassers 1998 (Ansatz mit S9), dem mittleren Hochwasser von 1995/96 (mit und ohne S9), aber auch gegenüber den Sedimentproben der Stauhaltung Heidelberg (mit S9). Abb. 7.24 zeigt zugleich, dass routinemäßig entnommene Schwebstoffe sowohl der Stauhaltung Lauffen als auch der Stauhaltung Heidelberg ein sehr hohes cytotoxisches Potenzial besaßen, das durchschnittlich höher war als das der Hochwasserschwebstoffe und der Sedimentproben aus beiden Stauhaltungen.
Hier sei kritisch angemerkt, dass dieser Vergleich mit Vorsicht zu interpretieren ist, da Schwebstoffe bei geringeren Abflüssen durchschnittlich eine kleinere Korngröße und somit eine größere spezifische Oberfläche besitzen, die eine erhöhte Toxizität vortäuschen kann (Hellmann 1991, Suedel & Rodgers 1994, True & Heyward 1990). Dennoch sind bei niedrigen Abflüssen auch die Schwebstoffkonzentrationen gering, dabei aber oftmals besonders hoch mit organischen Spurenstoffen belastet (Hellmann 1996). Nach Hellmann (1996) kann am mittleren Neckar der Anteil an hochkontaminierten Abwasser-Schwebstoffen bei Niedrigwasser sogar den Schwebstoffeintrag aus Erosion übertreffen.

Mutagenität. Eine Untersuchung der Hochwasserschwebstoffextrakte im Ames-Test mit dem Stamm TA98 zeigte für das Hochwasser im Februar 1999 mit Induktionsfaktoren bis zu 3,2 eine deutlich höhere mutagene Wirkung als für das Hochwasser im Oktober 1998 (Abb. 7.25). In Vergleich zum vorangegangenen Hochwasser wirkten insbesondere die Ansätze ohne S9-Supplementierung stärker mutagen. Die höchste Mutagenität im Ansatz ohne S9 konnte während des ansteigenden Asts kurz vor dem Scheitelpunkt und später im Bereich des tailing nachgewiesen werden und korrelierte sehr gut mit den Maxima der Cytotoxizität (Abb. 7.23).
Die Befunde zeigen, dass aus ökotoxikologischer Sicht die rasche Folge zweier extremer Hochwasserereignisse als äußerst problematisch bewertet werden kann. Als Erklärung für die hohe gentoxische Belastung kurz vor dem Scheitelpunkt kommt neben remobilisierten Luftschadstoffen und Oberflächenabflüs-

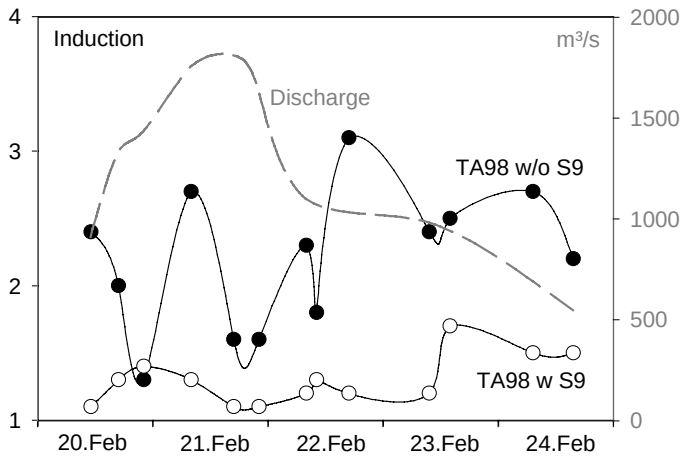


Abb. 7. 25. Gang der mutagenen Wirkung von Schwebstoffextrakten des Hochwassers im Februar 1999 aus der Stauhaltung Heidelberg im Ames-Test mit dem Stamm TA98. In grau ist die Abflussganglinie des Hochwassers dargestellt.

sen insbesondere die Remobilisierung von noch wenig konsolidierten schwebstoffbürtigen Altsedimenten in Frage, die während des Hochwassers im Oktober 1998 oberhalb der Stauhaltung abgelagert wurden.
Bei der Annahme einer ähnlichen Schwebstofftransportgeschwindigkeit wie bei dem Hochwasser im Oktober 1998 wären die Sedimente, die in der Stauhaltung Lauffen um den Scheitelabfluss herum remobilisiert wurden, ab dem Mittag des 22. Februars flussabwärts an der Stauhaltung Heidelberg zu erwarten gewesen. Tatsächlich konnte für die Schwebstoffe dieses Probennahmetermins die höchste mutagene Wirkung nachgewiesen werden. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmungen mit Frachtbilanzierungen von Haag et al. (1999b), die für das Hochwasser im Oktober eine sehr hohe Nettoerosion ermitteln konnten. Es ist anzunehmen, dass jene Altsedimente, die während des Hochwassers im Oktober 1998 exponiert wurden, in den darauf folgenden 4 Monaten nur eine geringmächtige Überdeckung durch neu sedimentierendes Material erfuhren. Die schnelle zeitliche Abfolge zweier extremer Hochwasserereignisse scheint daher die Remobilisierung hochkontaminierter Altsedimente während des zweiten Hochwassers zu fördern. Auch bei einer früheren Untersuchung zweier zeitlich schnell aufeinanderfolgender Hochwasserereignisse 1993/94 konnte gezeigt werden, dass die schnelle Abfolge eine deutlich erhöhte Remobilisierung von Altsedimenten zur Folge hatte (Ingo Haag, persönliche Mitteilung).

7.3 Bewertung der Befunde aus den Einzeluntersuchungen vor dem Hintergrund einer möglichen Remobilisierung

Die hier dargestellten Befunde der integrierten Untersuchungsstrategie zeigen, dass mit diesem Ansatz sehr detaillierte Informationen bezüglich des Schädigungspotenzials kontaminierter Sedimente und der Gefahr einer möglichen Remobilisierung gewonnen werden können. Durch die integrative, interdisziplinäre Zusammenarbeit konnten die umfassenden Datensätze der Einzeluntersuchungen miteinander kombiniert werden. Dies gewährt ein umfassenderes Verständnis sowohl des partikulär gebundenen Schädigungspotenzials, als auch der Transportdynamik, als unabhängige Einzelstudien.
Bei der Untersuchung von Sedimentbohrkernen aus der Stauhaltung Lauffen konnte eine hohe Varianz der chemischen und biologisch wirksamen Belastung nachgewiesen werden. Es konnte die Hypothese einer früheren Erosion von Hochwasserereignissen in Altsedimente und einer einhergehenden Remobilisierung in allen eingesetzten Testsystemen verifiziert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Erosionsdiskordanz zwischen Jung- und Altsedimenten auch durch deutliche Sprünge im chemischen und biologischen Belastungspotenzial abbilden lässt. Mit Hilfe des kombinierten Einsatzes von Untersuchungen zur Erosionsstabilität von Bohrkernen in einem künstlichen Fließgewässersystem und hydraulischer Kalkulationen der Schubspannungen während Hochwasserereignissen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Bohrkerne ab einer Schubspannung von 10 Pa, die von Hochwässern mit einer etwa 5-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit erreicht wird, theoretisch remobilisiert werden können.
Für das Hochwasser im Oktober/November 1998 mit einer etwa 20-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit konnte eine deutliche Erhöhung des cytotoxischen und gentoxischen Schädigungspotenzials gegenüber einem mittleren Hochwasser im Oktober 1995/96 gezeigt werden. Die Befunde aus den Biotests und der chemischen Analytik verdeutlichen, dass offenbar eine Remobilisation von kontaminierten Altsedimenten der Stauhaltung Lauffen stattgefunden hat und diese offensichtlich zu einem deutlichen Teil der partikulär gebundenen Schadstofffracht an der Stauhaltung Heidelberg beitrug.
Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass Hochwässer nicht nur zum jährlichen Schwebstofftransport einen wesentlichen Beitrag leisten (Barsch et al. 1994a, Westrich 1988, 1991), sondern auch der überwiegende Transport des partikulär gebundenen Schadstoffpotenzials während dieser kurzen Ereignissen stattfindet (Haag et al. 2001, Hollert et al. 2000a, b).

8 Zusammenführung und Ausblick

Methodenentwicklung

Im Rahmen dieser Studie wurden sowohl etablierte als auch neuere Analysenmethoden für eine Untersuchung komplexer Umweltproben und insbesondere partikulär gebundener Schadstoffe adaptiert, um den Zustand von Gewässern zu erfassen. Detaillierte Beschreibungen einzelner Biotestmethoden sowie ein Vorschlag für eine *In vitro*-Biotestbatterie, die neben der akuten Toxizität auch spezifische Endpunkte erfasst, konnten im Rahmen eines Einleitungskapitels und durch Methodenbeschreibungen in einer Studie des Deutschen Verbandes für Wasser- und Kulturbau (DVWK) zur Sediment- und Schwebstoffbewertung einem breiten Publikum vorgestellt werden (Abschnitte 1 und 2).

Integrierte Sedimentuntersuchungen

Die *In vitro*-Biotestbatterie wurde zur Untersuchung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials gelöster und partikulär gebundener Schadstoffe an 12 Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars überprüft (Abschnitt 4). Die Untersuchungen wurden im Sinne von Chapmans Triade-Konzept durchgeführt, um die Korrelation zu Befunden aus der chemischen Analytik zu ermöglichen und zugleich die ökologische Relevanz der *In vitro*-Befunde durch Untersuchungen *in situ* zu überprüfen.

(a) Es konnten mit der eingesetzten *In vitro*-Biotestbatterie für die untersuchten Fließgewässerstandorte des Einzugsgebietes des Neckars äußerst komplexe Belastungsmuster aus einer nicht vorhersagbaren Kombination akut toxischer, teratogener, gentoxischer, mutagener, dioxin-ähnlicher und endokriner Wirkungen nachgewiesen werden.

- Die Befunde aus dem Abschnitt 4.7 verdeutlichen, dass eine Bewertungsstrategie, die ausschließlich Bioassays zur akut toxischen Wirkung einsetzt, keinesfalls der Beurteilung eines komplexen Schädigungspotenzials gerecht werden kann. Es ist offensichtlich, dass eine Biotest-Batterie mit akuten Toxizitätstests das Schädigungspotenzial umfassender zu bewerten vermag als eine rein chemische Analytik bzw. die Verwendung nur einzelner Bioassays. Aber auch die Verwendung einer Biotestbatterie mit verschiedenen akut toxischen Endpunkten kann zu drastischen Fehleinschätzungen des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials führen: So wäre der Standort des Forellenbaches nach einer Kläranlageneinleitung mit der im Rahmen eines UBA-Projektes angewendeten Biotestbatterie (Gratzer & Ahlf 1999a), aber auch mit dem überwiegenden Anteil der Bioassays zur akuten Toxizität der hier entwickelten Biotestbatterie als nur gering bis mäßig belastet klassifiziert worden. Gerade dieses Sediment des Forellenbaches zeigte aber in den spezifischen Bioassays ein drastisches Schädigungspotenzials: So konnte nicht nur eine hohe mutagene und endokrine Wirksamkeit nachgewiesen werden, sondern auch eine dioxin-ähnliche Wirksamkeit vergleichbar mit einem hochkontaminiertem Sediment aus dem Spittelwasser bei Bitterfeld oder mit einer um einen Faktor 300 höheren als für einen skandinavischen Hot Spot (Järnsjön, Schweden, Abschnitt 4.7.9).
- Bei *In vitro*-Bioassays kommt der Untersuchung des Expositionspfades natives Sediment *a priori* die höchste ökologische Relevanz zu, wobei insbesondere bei spezifischen Endpunkten die Untersuchung dieses Expositionspfades oftmals nicht möglich ist, so dass die partikulär gebundenen Schadstoffe in eine wässrige Phase überführt werden müssen (Eluate, Extrakte, Porenwasser). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei den Untersuchungen im Bakterienkontakttest (*Arthrobacter globiformis*) und im Fischeitest (*Danio rerio*) die tatsächlich bioverfügbare Toxizität (native Sedimente) besser mit einer Untersuchung von acetonischen Extrakten als mit Porenwässern abgeschätzt werden konnte. Lipophilere Sedimentinhaltsstoffe besitzen in diesen beiden Testverfahren eine höhere Bioverfügbarkeit als bisher angenommen.
- Sowohl bei der mutagenen, gentoxischen als auch endokrinen Wirkung wurde in einzelnen acetonischen Extrakten eine spezifische Wirkung durch eine toxische Wirkung bzw. eine

Hemmung maskiert. Mit anderen Lösungsmitteln und nach Fraktionierung der Sedimentinhaltsstoffe mit pH-abhängigen und säulenchromatographischen Methoden konnten zum Teil die spezifisch wirksamen von den akut toxischen bzw. hemmenden Substanzen abgetrennt und im Anschluss drastische Schädigungspotenziale ermittelt werden. Somit kann eine Routineuntersuchung von Gesamtextrakten mit spezifischen Endpunkten zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Soll die Gefahr einer Unterbewertung des spezifischen Schädigungspotenzials mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, empfiehlt sich eine einfachen Fraktionierung in Kombination mit *In vitro*-Bioassays.

(b) Bei den chemisch-analytischen Untersuchungen der Triade (Abschnitt 4.5) konnte insgesamt eine gute Korrelation zu den Befunden aus den Bioassays nachgewiesen werden. Eine Berechnung des Anteils der chemisch analysierten Substanzen an der gesamten biologischen Wirksamkeit mit Hilfe von *Toxicity equivalency*-Faktoren zeigte sowohl bei der dioxin-ähnlichen als auch bei der endokrinen Wirkung, dass selbst eine umfangreiche Analytik die biologische Wirksamkeit nicht abzuschätzen ermöglicht: Während mit Hilfe des TEF-Konzeptes bei den weniger kontaminierten Proben ein Großteil der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit mit den Konzentrationen an PAHs, PCBs und PCDDs/Fs erklärt werden konnte, identifizierte die chemische Analyse nur 0,5 – 0,7 % des biologisch nachgewiesenen dioxin-ähnlichen Potenzials der hochkontaminierten Proben.

(c) Die Befunde der Makrozoobenthos-Untersuchungen (Abschnitt 4.6) dokumentierten jeweils eine hohe ökologische Relevanz der Befunde aus den Bioassays und der chemischen Analytik. In den meisten Fällen konnte bereits mit dem Saprobienindex eine gute Differenzierung des Schädigungsgrades der Biozönosen ermittelt werden. Es zeigte sich aber, dass Saprobie-basierte Bioindices alleine zur Erfassung komplexer Belastung nicht geeignet sind, wogegen aus der kombinierten Verwendung verschiedener Indices weiterführende Informationen zur Art der Schädigung der Biozönose erhalten werden konnten. Während mit dem Diversitätsindex nach Shannon-Wiener keine belastungsabhängige Differenzierung der Standorte möglich war, erwies sich der ökotoxikologische Index nach Carmargo als geeigneter, sensitiver Bioindex zur Analyse von Degradationen *in situ*.

Die Befunde zeigen, dass das Konzept der Sedimenttriade, besonders nach Erweiterung um spezifische Endpunkte, eine geeignete Strategie zur umfassenden Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern darstellt. Insbesondere der Vergleich der Befunde mit denen von möglichst gering kontaminierten Referenzstandorten sollte jeweils durchgeführt werden, nicht zuletzt um bei ökotoxikologischen Untersuchungen die Notwendigkeit der fließgewässertypologischen Bewertung zu integrieren, die bei neueren *In situ*-Klassifikationsverfahren bereits berücksichtigt wurde (Braukmann & Pinter 1997a).

Entwicklung und Erprobung einer statistischen Bewertungsstrategie

Eine Überprüfung unterschiedlicher Methoden zur statistischen Bewertung des komplexen Datensatzes der Sedimentbewertungstriade wurde in Abschnitt 5 durchgeführt. Rangsummen-basierte Verfahren und die Hasse-Diagramm-Technik erwiesen sich dabei als geeignete Methoden, um die Höhe und die Belastungsmuster des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials aufzuzeigen. Dennoch wird für den Einsatz dieser Bewertungsmethoden und die Interpretation der Ergebnisse ein umfassendes ökotoxikologisches und ökologisches Expertenwissen benötigt, das bei Entscheidungsfindungen im gewässerrechtlichen Vollzug nicht immer vorausgesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu erwies sich die Fuzzy Logic als geeignet, ein einfach anzuwendendes und je nach Untersuchungsansatz leicht zu modifizierendes ortsabhängiges Expertensystem zu erarbeiten, mit dem die ökotoxikologische Belastung von integrierten Untersuchungen umfassend bewertet werden konnte. Auf der Basis der Befunde aus dieser Studie kann ein Fuzzy Logic-Expertensystem für die Bewertung der Befunde em-

pfohlen werden. Die in Abschnitt 5 vorgeschlagene Sedimentklassifikation wurde auf Basis der hier eingesetzten Kombination von Bioassays, chemisch-analytischen Methoden und *In situ*-Untersuchungen vorgeschlagen und berücksichtigt Fließgewässer unterschiedlicher Größe im Einzugsgebiet des Neckars. Für die Verwendung mit anderen Batterien ist sie entsprechend anzupassen. Eine ortsunabhängige Klassifikation kann auf Grundlage dieser Untersuchungen nicht abgeleitet werden, wobei auch bei dem langfristigen Ziel der Entwicklung von ortsunabhängigen Klassifikationssystemen der Fuzzy Logic große Potenziale zukommen (vgl. Heise et al. 2000). Für die hier durchgeführte Überprüfung der Bewertungsmethoden wurden verschiedene Befunde, aus Gründen der Übersichtlichkeit, jeweils gleich gewichtet. Unseres Erachtens sollten jedoch bestimmte Endpunkte mit einer mehrfachen Wertung in das Klassifikationssystem eingehen. Insbesondere Mutagenität und Gentoxizität, Teratogenität von nativen Sedimenten im Fischeitest mit *Danio rerio* sowie dioxin-ähnliche Wirkung sollten eine höhere Gewichtung erfahren, nicht zuletzt weil in früheren Studien diese Endpunkte in Labortests oftmals direkt mit Biomarkern an Organismen aus dem Ökosystem aber, auch pathologischen Veränderungen korreliert werden konnten und somit *a priori* eine hohe Relevanz für das Ökosystem besitzen.

Biotestgeleitete Fraktionierung zur Identifizierung problematischer Inhaltsstoffe

In Abschnitt 6 konnte gezeigt werden, dass komplexe Bioassay-dirigierte Fraktionierungen geeignete Methoden darstellen, die chemische Identität der Substanzen näher zu identifizieren, die im Sediment des Forellenbaches nach der Kläranlageneinleitung für das hohe mutagene und dioxin-ähnliche Potenzial verantwortlich waren. Beim Ames-Test konnten PAHs mit einem Molekulargewicht von 264 bis 266, für die bisher nur wenige biologische Wirkdaten vorliegen, als Hauptträger der mutagener Wirkung identifiziert werden. Auch bei der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit konnte gezeigt werden, dass mono- und diaromatische Verbindungen (PCDDs/Fs, PCBs, PCNs) als die klassischen Induktoren keinen signifikanten Beitrag zum Schädigungspotenzial des Ausgangsextraktes lieferten. Vielmehr konnte eine Fraktion mit einer Dominanz der PAHs Triphenylen, Benz(a)anthracen, Chrysen und zahlreicher ihrer Methyl- und Dimethylverbindungen für 70 % der EROD-Induktion der Ausgangsprobe verantwortlich gemacht werden. Diese Befunde verdeutlichen, dass selbst eine umfassende chemische Analytik das ökotoxikologische Schädigungspotenzial des Forellenbachsedimentes in Bezug auf mutagene und dioxin-ähnliche Wirksamkeit unterbewertet hätte. Die Ergebnisse dieser Teilstudie zeigen, dass Biotest-geleitete Fraktionierungen im Risk Assessment einen viel größeren Stellenwert erhalten sollten, da nur durch sie eine Identifizierung der biologisch wirksamen Substanzen erfolgen kann. Dem Nachteil relativ hoher Kosten von Fraktionierungen und Bioassays kann gegenübergestellt werden, dass insbesondere kostspielige chemische Analysen erst nach Indikation durchgeführt werden müssen: So konnte aufgrund der Abwesenheit von EROD-induzierenden Substanzen in Fraktion F2.1 bereits ohne chemische Analytik gefolgert werden, dass PCDDs/Fs keinen deutlichen Beitrag zur dioxin-ähnlichen Wirksamkeit lieferten.

Kombiniertes ökotoxikologisches und hydraulisches Konzept zur Bewertung des Remobilisationsrisikos von kontaminerte Sedimenten

Am Beispiel der Untersuchung von Bohrkernen der Stauhaltung Lauffen am Neckar und zwei extremen Hochwasserereignissen konnte die Eignung eines kombinierten ökotoxikologischen und hydraulischen Untersuchungskonzeptes für die Beurteilung des Erosionsrisikos kontaminierte Sedimente überprüft werden (Abschnitt 7). Dabei konnte gezeigt werden, dass extreme Hochwässer kontaminierte Altsedimente remobilisieren können und während dieser kurzen Ereignisse der überwiegende Teil des partikulären Schadstofftransportes im Neckar stattfindet. Auch bei diesen Untersuchungen konnte die Eignung der entwickelten *In vitro*-Biotestbatterie bestätigt werden.

Handlungsempfehlung für die Untersuchung von Fließgewässern

Teile der hier entwickelten Untersuchungsstrategie konnten bereits in eine Handlungsanweisung zur Sedimentbewertung eingebracht werden (Neumann-Hensel et al. 2000a), die unter wissenschaftlicher Leitung von Herrn PD Dr. Ahlf (TU Hamburg-Harburg) in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Terytze (Umweltbundesamt) und Herrn Dr. Lay (Deutsche Bundesstiftung Umwelt) entwickelt wurde und auch Erfahrungen aus Anwendungen der Hamburger Biotestbatterie (Gratzer & Ahlf, 1999a) an Beprobungen von Elbe und Rhein einbezieht. Eine Reproduktion der Handlungsanweisung befindet sich im Anhang dieser Studie. Im Gegensatz zu anderen Handlungsanweisungen zur Sediment- und Baggergutbewertung (z.B. HABAB, BfG 2000; ATV-Regelwerk Abwasser-Abfall 1998 und Klärschlammverordnung 1992), bei denen die Güte *biologischer* Schutzgüter fast ausschließlich durch *chemisch-analytische* Kategorien (Richtlinien) klassifiziert wird, setzt diese Empfehlung prioritär *biologische* Verfahren ein. Diese Vorgehensweise ist die Konsequenz aus einer Vielzahl von Studien, die zeigen, dass auch eine leistungsfähige chemische Analytik nicht in der Lage ist, komplexe Stoffgemische in ihrer ökotoxikologischen Wirkung abzuschätzen.

In Kombination mit chemischen Analysen werden die diagnostischen Werkzeuge vereint zur integrativen Umweltbewertung eingesetzt. Die Handlungsempfehlung wurde vor dem Hintergrund verfasst, ein praktikables gestuftes Bewertungskonzept nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung für Behörden und Institutionen zu schaffen.

Das Untersuchungskonzept ist gestuft aufgebaut: Es ist nicht nötig, die gesamte Untersuchungspalette für jedes Gewässer anzuwenden. Abhängig von Fragestellung, Indikation, Untersuchungsziel und den zur Verfügung stehenden Daten werden zusammenhängende Bausteine in einem Untersuchungskonzept erfasst. Die Anzahl der einzusetzenden Bausteine wird dabei durch das Untersuchungsziel bestimmt.

Im Gegensatz zu anderen Handlungsanweisungen sind die Befunde der einfachen ökotoxikologischen Testbatterie Steuerungsparameter in der ersten Stufe, in der nur wenige chemische Summenparameter analysiert werden. Bei einer fehlenden ökotoxikologischen Wirkung kann das Analysenprogramm sofort gestoppt werden, ohne aufwendige und kostspielige chemische Analysen durchzuführen. Je nach sachlogischer Verknüpfung kann die minimale Biotestbatterie um weitere Wirkungstests erweitert werden: Soll beispielsweise Baggergut bezüglich seiner Verwertbarkeit überprüft werden, sollten weitere spezifische Endpunkte wie dioxin-ähnliche Wirksamkeit, Mutagenität und Genotoxizität überprüft werden. Um die Gefahr einer falsch-negativen Beurteilung der Sediment- und Schwebstoffqualität zu verhindern, sollte nach Möglichkeit eine Vielzahl von Untersuchungsparametern berücksichtigt werden. Tab. 8.1 stellt eine nach den Ergebnissen dieser Studie sinnvolle und zugleich praktikable Testbatterie für spezifische Fragestellungen zusammen. Auch sie kann in Abhängigkeit vom Untersuchungsziel modifiziert werden. Bei einer Untersuchung von Sedimenten vor dem Hintergrund einer Baggergutumlagerung sollten beispielsweise Biotests mit den Expositionspfaden natives Sediment, organischer Extrakt und wässriges Eluat durchgeführt werden, wogegen die Untersuchung von Porenwasser nur wenig Erkenntnisgewinn verspricht. Auch die Durchführung von Pflanzenkeimungstests ist anzuraten.

In den heutigen Zeiten knapper öffentlicher Mittel stehen für die Untersuchungen oftmals nur begrenzte finanzielle Möglichkeiten zur Verfügung. Mehrkosten der integrierten Testung können dadurch vermieden werden, dass biologische Wirktests auch in der Sedimentbewertung – analog zum Abwasserabgabengesetz und Chemikaliengesetz – als Regulatoren bzw. Steuerparameter für die Indikation einer nachgeschalteten chemischen Analytik zugelassen werden. Eine Überprüfung der dioxinähnlichen Wirksamkeit mit Hilfe von Zellkulturen verursacht nur etwa 10 % der Kosten einer umfassenden chemischen Analytik auf PCDDs/Fs, PCBs und PAHs.

Tab. 8.1. Verfahrensvorschlag für die ökotoxikologische Untersuchung von Fließgewässern als Ergänzung zur Handlungsanweisung von Neumann-Hensel et al. (2000)

	Stufe 1	***Stufe 2***	***Stufe 3***	
			Basis	Erweitert
Toxizität				
Algenwachstumshemmtest	WE			
Leuchtbakterientest	WE			
Bakterienkontakttest	NS			
Zelltest mit RTG-2-Zellen	OE			BdF
Toxizität/Teratogenität				
Fischeitest mit *Danio rerio*			OE	NS, WE
Mutagenität/Genotoxizität				
Ames-Test			OE	BdF, WE
Comet-Assay, RTG-2			OE	BdF, WE
Endokrine Wirkung				
Yeast-Assay/E-Screen			OE	BdF
Dot-Blot-Assay			OE	WE
Dioxin-ähnliche Wirkung				
EROD in Hühnerleberkultur				OE
EROD in RTL-2-Zellen			OE	BdF
Biotestgeleitete Fraktionierung				
Alumina-Säule			(OE)	OE
HPLC				OE
In situ-Aufnahmen				
Saprobienindex				Opt
Ökotoxikologischer Index				Opt
Comet-Assay - Feldstudie				Opt
Vitellogenin ELISA - Feldstudie				Opt
Histopathologie - Feldstudie				Opt

Chemische Einzelstoffanalytik

WE: Wässriges Eluat, OE: Organischer Extrakt, NS: Natives Sediment, BdF:Bioassay-dirigierte Fraktionierung, Opt: Optional. Stufe 2 des Systems besteht aus einer chemsichen Einzelstoffanalytik.

Die Biotests der Grundsstufe (Stufe 1, Tab 8.1) entsprechen der minimalen Testbatterie aus Neumann-Hensel (2000a), sind aber um den Zelltest mit RTG-2-Zellen erweitert, da eine Batterie mindestens einen wirbeltiernahen Biotest auf der Grundstufe enthalten sollte. Sofern äußere Faktoren keine Mini-

malbatterie vorschreiben, sollte die Untersuchung möglichst mit Stufe 3 (Basis) begonnen werden, um eine folgenreiche falsch-negative Beurteilung der Sedimentqualität zu vermeiden. Dieser Baustein wird der Tatsache gerecht, dass durch Erfolge des Gewässerschutzes auf technologisch begründeter Anforderungen bei der überwiegenden Anzahl von Fließgewässern eine Verschiebung der Problematik von akuter Toxizität hin zu einer lang anhaltenden (chronischen) Belastung mit niedrigeren Konzentrationen meist komplexer Schadstoffgemische nachgewiesen werden konnte. Da subletale Belastungen mit einer Vielzahl von Belastungen im Ökosystem korrelieren, erscheint eine Überprüfung der mutagenen/gentoxischen, der teratogenen, der endokrinen sowie der dioxin-ähnlichen Wirkung bereits zu Beginn der Untersuchungen sinnvoll.
Durch den Einsatz eines organischen Gesamtextraktes in allen Bioassays der Stufe 3 (Basis) können die Kosten für die Probenaufbereitung stark reduziert werden. Die Biotests zur teratogenen Wirkung (Fischeitest nach DIN 38 415-6) und zur mutagenen/gentoxischen Wirkung (DIN 38415-4, Empfehlung eines BMBF-Verbundprojektes zur gentoxischen Wirkung von Oberflächengewässern, Grummt 2000) sind sehr gut standardisiert. Die Methoden zur Untersuchung der endokrinen und dioxin-ähnlichen Wirkung sind im Rahmen zahlreicher Orginalarbeiten publiziert und wurden bereits bei vielen internationalen Studien erfolgreich für ein Risk Assessment eingesetzt. Der Dot-Blot an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle wurde im Klassifikationssystem aufgrund des komplexeren Metabolismus von intakten Leberzellen gewählt, obgleich er bei einem routinemäßigen Screening zahlreicher Proben den artifiziellen Reportergenassays bezüglich der Praktikabilität etwas unterlegen ist. Für die Untersuchung der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit hat sich der EROD-Assay an embryonalen Hühnerleberkulturen als sehr geeignet erwiesen, obwohl er für ein Screening zahlreicher Proben relativ aufwendig ist und insbesondere aus Gründen des Tierschutzes nicht in der Grundstufe einsetzt werden sollte. Die EROD-Untersuchungen können in Stufe 3 (Basis) sehr praktikabel und preiswert mit Hilfe der permanenten Zelllinie RTL-2 aus der Leber der Regenbogenforelle durchgeführt werden. Sofern akute Toxizitätstest ein hohes akut toxisches Potenzial anzeigen, können die spezifischen Endpunkte der Stufe 3 (Basis) auch mit Fraktionen einer einfachen Bioassay-dirigierten Fraktionierung durchgeführt werden (Verhinderung von falsch-negativen Befunden durch Maskierung der spezifischen Effekte durch Toxizität).
Die Zusammensetzung der Biotestbatterie in der erweiterten Stufe 3 hängt von der Fragestellung ab. In dieser Stufe sollte zugleich die ökologische Relevanz der Laboruntersuchungen mit Hilfe von *In situ*-Aufnahmen überprüft werden.

Zukünftiger Forschungsbedarf

- Die nachgewiesene bessere Übereinstimmung der embryotoxischen Wirkung nativer Sedimente im Fischeitest mit *Danio rerio* mit acetonischen Extrakten als mit Porenwässern dokumentiert einen gravierenden Mangel im grundsätzlichen Verständnis der Verteilung verschiedener Substanzklassen in den Expositionsphasen natives Sediment, Porenwasser, organischer Extrakt und Eluat. Hier würde eine kombinierte Untersuchung verschiedener Expositionspfade in Bioassays mit einer chemischen Analyse *jeder* Expositionsphase helfen, grundsätzliches Wissen zur Dominanz verschiedener Sunstanzen in den jeweiligen Expositionsphasen zu erlangen.
- Die prinzipiell gute Eignung des Fischeitests mit *Danio rerio* für die Testung *nativer* Sedimente konnte in dieser Studie aufgezeigt werden. Für einen Einsatz als Routinetest für die Überprüfung nativer Sedimente sollte der Test weiter optimiert und besser standardisiert werden. Zudem sollte die Eignung der auf nativen Sedimenten exponierten Embryonen als Testsystem für spezifische Endpunkte wie EROD-Induktion und Genotoxizität im Comet-Assay überprüft werden, da hier eine ökosystemnahe Exposition und Aufnahme der Schadstoffe angenommen werden können.

- Insgesamt zeigen die Befunde die Notwendigkeit einer Adaptation von spezifischen Biotests an die Untersuchung von nativen Sedimenten.
- Die hohe Belastung der exemplarisch ausgewählten Gewässer mit dioxin-ähnlich wirksamen Substanzen zeigt die Notwendigkeit, diesen Endpunkt nicht nur bei universitären Forschungsvorhaben sondern auch bei Gewässermonitorring seitens Behörden einzusetzen. Durch die hohen Kosten einer chemischen Analytik sollte die Standardisierung von Biotests zur dioxinähnlichen Wirkung weiter vorangetrieben werden, insbesondere um ihe Justiziabilität zu überprüfen. Auch die bessere Standardisierung von Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken erscheint vor dem Hintergrund ihrer guten Eignung zur Identifizierung problematischen Substanzen dringend erforderlich. Die insbesondere bei den stark kontaminierten Sedimenten hohe Differenz zwischen der biologischen und der chemisch-analytisch nachgewiesenen TEQs zeigt, dass in baden-württembergischen Gewässern nicht-identifizierte Substanzen zu erheblichen Teilen an der gesamten dioxin-ähnlichen Wirkung teilhaben. Hier ist ein Forschungsbedarf bezüglich der Untersuchung von Substanzen mit potenzieller dioxin-ähnlicher Wirkung (etwa polybromierte Kohlenwasserstoffe und bestimmte PAHs-Transformationsprodukte, die bisher nur unzureichend ökotoxikologisch charakterisiert sind) festzustellen.
- Die Befunde der Sedimenttriade dokumentieren die Notwendigkeit einer fließgewässertypologischen Beurteilung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials. Die hier vorgestellte Handlungsempfehlung zur Untersuchung von Sedimenten sollte im Verbund mit anderen Institutionen an einigen Fließgewässern unterschiedlicher Typologie bezüglich ihrer Praxistauglichkeit validiert und ggf. weiterentwickelt werden. Ein besonderer Forschungsbedarf besteht bei der Untersuchung von Referenzgewässern, der Weiterentwicklung des Fuzzy Logic-Expertensystems und der Entwicklung von ortsunabhängigen Bewertungssystemen. Insbesondere die Integration von fließgewässertypologischen Klassifikationsmaßstäben und die feste Implementation von Referenztests erscheint für die Entwicklung von ortsunabhängigen Systemen notwendig.
- Die hier vorgestellten Befunde zur Remobilisierung von Sedimenten dokumentieren die enorme Bedeutung von extremen Hochwasserereignissen für den Transport partikulär gebundener Schadstoffe in aquatischen Systemen. Mit der hier eingesetzten Untersuchungsstrategie konnte eine hohe Belastung nachgewiesen werden, wobei eine exakte Zuordnung des Schädigungspotenzials zu remobilisierten Sedimenten bzw. luftbürtigen Schadstoffen des Runoff nicht möglich ist. Hier ist ein großer Forschungsbedarf hinsichtlich des Beitrages verschiedener Quellen zur Belastung festzustellen. Geeignete Probentnahmestrategien während Hochwasserereignissen (ober- und unterstrom von Stauhaltungen, unterhalb von Einleitungen von Kläranlagen und Wasserentlastungseinleitungen) würden in Kombination mit der entwickelten Untersuchungsmethodik und Mischungskomponentenanalysen (Haag et al. 2000b) ein grundsätzlicheres Verständnis zur Dynamik des Schadstoffpotenzials während Hochwasserereignissen ermöglichen.
- Die hier durchgeführten Untersuchungen zum Belastungspotenzial von Hochwasserereignissen wurden ausschließlich mit labornahen Biotestmethoden durchgeführt. Eine Überprüfung der ökologischen Relevanz des enormen Schadstofftransportes während Hochwasserereignissen auf Organismen im Ökosytem steht noch aus, so dass bei einer Untersuchung weiterer Hochwasser dringend das Schädigungspotenzial *in situ* überprüft werden sollte.

9 Zusammenfassung

Es wurden im Rahmen dieser Studie etablierte Biotest- und neuere Analyse-Methoden für eine Untersuchung komplexer Umweltproben adaptiert, um den Belastungszustand von Gewässern zu erfassen und zu bewerten. Über die Kombination Bioassay-dirigierter Fraktionierungstechniken, verschiedener (öko)toxikologischer Endpunkte (Cyto- und Genotoxizität, dioxin-ähnliche und endokrine Wirksamkeit) sowie faunistischer Gesamtaufnahmen des Makrozoobenthos sollte dabei nicht nur der Vielzahl möglicher Effekte und Kombinationswirkungen von Freilandproben in biologischen Systemen Rechnung getragen werden, sondern zugleich die ökologische Relevanz der *In vitro*-Laborexperimente kritisch überprüft werden.

(1) An 12 Fließgewässerstandorten im Einzugsgebiet des Neckars wurde eine Sedimenttriade durchgeführt. Solche integrierte Untersuchungen bieten durch den kombinierten Einsatz von Bioassays, chemischer Analytik und Bestandsaufnahmen *in situ* umfassende Informationen zum Schädigungspotential von Sedimenten und überprüfen zugleich die ökologische Relevanz der Laboruntersuchungen. Es konnten mit Hilfe der *In vitro*-Bioassays äußerst komplexe Belastungsmuster aus toxischen, teratogenen, gentoxischen, mutagenen, dioxin-ähnlichen und endokrinen Effekten nachgewiesen werden. Es konnte mit den Untersuchungen zugleich gezeigt werden, dass eine Bewertung der Fließgewässer mit Bioassays zur akuten Toxizität das Schädigungspotenzial drastisch unterbewerten würde, so dass eine Untersuchungsstrategie für Sedimente unbedingt spezifische Endpunkte beinhalten sollte. Die chemisch-analytischen Untersuchungen ergaben insgesamt eine gute Korrelation zu den Befunden aus den Bioassays. Eine Berechnung des Anteils der chemisch analysierten Substanzen an der gesamten biologischen Wirksamkeit mit Hilfe von *Toxicity equivalency*-Faktoren zeigte sowohl bei der dioxin-ähnlichen als auch bei der endokrinen Wirkung, dass selbst eine umfangreiche Analytik die biologische Wirksamkeit nicht abzuschätzen erlaubt: Während mit Hilfe des TEF-Konzeptes bei den weniger kontaminierten Proben ein Großteil der dioxin-ähnlichen Wirksamkeit mit den Konzentrationen an PAHs, PCBs und PCDDs/Fs erklärt werden konnte, identifizierte die chemische Analyse nur 0,5 – 0,7 % des biologisch nachgewiesenen dioxin-ähnlichen Potenzials der hochkontaminierten Proben. Mit Hilfe von Makrozoobenthosaufnahmen und der Verwendung zahlreicher Indices konnte die ökologische Relevanz der biologischen und chemischen Analysen verifiziert werden. Es zeigte sich, dass der Saprobienindex die Degradation der Biozönose drastisch unterbewerten kann, wogegen in Kombination mit dem Ökotoxikologischen Index eine sehr differenzierte Bewertung des Zustandes *in situ* möglich war. Insgesamt erwies sich das Konzept der Sedimentbewertungstriade als eine geeignete Strategie für eine umfassende Beschreibung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials der untersuchten Fließgewässer.

(2) Bei einer Überprüfung verschiedener statistischen Methoden zur Bewertung komplexer Datenmatrices erwies sich die Hasse-Diagramm Technik nach Fuzzy-Clusterung und insbesondere ein auf Basis von Clusteranalysen und Rangsummen-basierten Klassifikationen erarbeitetes Fuzzy Logic-Expertensystem als geeignet, den komplexen Datensatzes der integrierten Sedimentuntersuchung umfassend zu bewerten.

(3) Mit Hilfe von Sedimenttriaden kann zwar umfassende Information über Schädigungspotenzial und Relevanz der partikelgebundenen Schadstoffe erreicht werden, eine Identifizierung der problematischen Substanzen ist jedoch nicht möglich. Daher wurde ein hochtoxisches Sediment aus den Triadeuntersuchungen mit Hilfe einer komplexeren Fraktionierungsmethodik mit Alumina- und HPLC-Chromatographie und den Endpunkten Cyto- und Gentoxizität, Mutagenität und dioxin-ähnliche Wirkung untersucht, um die biologisch wirksamen Substanzen zu identifizieren. Im Ames-Test konnten PAHs der Molekulargewichte 264-266, für die bisher nur wenige biologische Wirkdaten vorliegen, als Hauptträger der mutagenen Wirkung identifiziert werden. Während PCDDs/Fs, PCBs und PCNs als klassische Induktoren keinen signifikanten Beitrag zur EROD-Induktion lieferten, konnte 70 % der dioxin-ähnlichen Wirkung auf eine Fraktion mit den PAHs Triphenylen, Benz(a)anthracen, Chrysen und deren Derivaten zurückgeführt werden.

(4) Schwebstoffgebundene Schadstoffe werden durch Sedimentation der Wasserphase und damit vielen aquatischen Organismen entzogen. Während bei durchschnittlichen hydrologischen Verhältnissen in carbonatreichen Einzugsgebieten wie dem Neckar eine Remobilisation von Schadstoffen weitgehend ausgeschlossen werden kann, besteht bei Hochwasserereignissen die Gefahr einer Remobilisierung von hochkontaminierten Altsedimenten. Mit Hilfe eines kombinierten ökotoxikologischen und hydraulischen Untersuchungssystems wurde das Schädigungspotenzial und die Gefahr einer Remobilisierung an Sedimentbohrkernen der Stauhaltung Lauffen sowie an Hochwasserschwebstoffen zweier extremer Hochwässer untersucht. Dabei konnten nachgewiesen werden, dass ab einem Hochwasser mit einer 5-jährlichen Wiederkehrwahrscheinlichkeit alle Sedimente, auch die kontaminierten Altsedimente, remobilisiert werden können. Die Hochwasserereignisse (15-20 jährliche Wiederkehrwahrscheinlichkeit) führten zu einer deutlichen Erhöhung des cytotoxischen und mutagenen Schädigungspotenzials aber auch der Schwermetallbelastung von Schwebstoffen (Cd bis zu 28 mg/kg) im Vergleich zu einem mittleren Hochwasser im Jahre 1995/96, so dass eine Remobilisierung von hochkontaminierten Altsedimenten angenommen werden muß.

(5) Auf Basis der eigenen Untersuchungen wird eine gestuftes Untersuchungskonzept für die Bewertung von partikulären Schadstoffen vorgestellt.

10 Literatur

Abe, A. & Urano, K., 1996: Characteristics of lethal substances and the removal effect of molecular sulfur in the *Salmonella* mutagenicity test for river sediments. Mut. Res., 351(1): 61-66.

AbfKlärV, 1992: Klärschlammverordnung. Bundesgesetzblatt, 21: 912-934.

Adam, S., Pawert, M., Müller, E. & Triebskorn, R., 2000: Das BMBF-Verbundprojekt VALIMAR: Biozönotische Aspekte. In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner und A. Klumpp (Editors), Bioindikation: Biologische Testverfahren. Heimbach, Stuttgart, pp. 169-174.

Ahlf, W., 1995: Biotests an Sedimenten. In: C. Steinberg, H. Bernhardt und H. Klappner (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie, Teil Aquatische Ökotoxikologie. Ecomed, Landsberg, pp. 1-43.

Ahlf, W., Dahn, M., Förstner, U. & Metzko, S.W., 1991: Biologisches Bewertungskonzept für Sedimente. Vom Wasser, 76: 215-223.

Ahlf, W., Frühling, W., Heise, S. & Tiemann, J., 1999: Assessing the toxicity of contaminated sediments. Short course the 9th annual meeting of SETAC-Europe. Leipzig: pp. 1-23.

Ahlf, W., Maaß, V. & Traunspurger, W., 1997. Untersuchungen zur ökotoxikologischen Bewertung von Hamburger Hafensedimenten. In: V. Maaß, C. Schmidt, R. Lüschow und T. Leitz (Editors), Sedimentuntersuchungen im Hamburger Hafen 1994/95. Ergebnisse aus dem Baggergutuntersuchungsprogramm. Stadt Hamburg, Wirtschaftsbehörde, Strom- und Hafenbau, Hamburg, pp. 95-100.

Ahne, W., 1985: Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für Toxizitätsbestimmungen zur Einschränkung und Ersatz des Fischtests. Zbl. Hygiene, 180: 480-504.

Alf, A. & Buck, H., 1992. Erläuterung zur Kopplungsanalyse nach Buck, Anhang 8. In: LfU-Baden-Württemberg (Editor), Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung-Arbeitsanleitung, Handbuch Wasser 2, Karlsruhe, Loseblattsammlung.

Alloway, B.J. & Ayres, D.C., 1996: Schadstoffe in der Umwelt - Chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser-, und Bodenverschmutzung. Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg.

Ames, B.N., McCann, J. & Yamasaki, E., 1975: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. Mut. Res., 31: 347-369.

Andersson, P.L., Blom, A., Johanisson, A., Pesonen, M., Tysklind, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E. & Norrgren, L., 1999: Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: *in vitro* studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 37: 145-150.

Ankley, G. et al., 1998: Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti)-estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. Environ. Toxicol. Chem., 17(1): 68-87.

Ankley, G.T. & Schubauer-Berigan, M.K., 1995: Background and overview of current standard toxicity identification evaluation procedures. J. Aquat. Ecosys. Health, 4: 133-149.

Arcand-Hoy, L.D. & Benson, W.H., 1998: Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environ. Toxicol. Chem., 17(1): 49–57.

Arcaro, K.F., O'Keefe, P.W., Yang, Y., Clayton, W. & Gierthy, J.F., 1999: Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. Toxicology, 133(2-3): 115-27.

ARGE (Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe), 1992: Entwicklung der Schadstoffgehalte in frischen, schwebstoffbürtigen Sedimenten der Elbe bei Schnackenburg 1991-1994, Hamburg, 38 pp.

ARGE (Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe), 1996: Zeitliche und örtliche Variabilität von organischen Stoffen in schwebstoffbürtigen Sedimenten der Elbe bei Hamburg-Blankenese und der Mulde bei Dessau, Hamburg, 44 pp.

ARGE (Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe), 2000: Endokrin wirksame Stoffe in der Elbe, in den Nebenflüssen und in der Nordsee. Online unter www.arge-elbe.de, 97 pp.

Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (Editors), 1995: The chironomidae - Biology and ecology of non-biting midges. Chapman & Hall, London, 538 pp.

Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A. & Browne, M.A., 1995: The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. Mutagenesis, 10(2): 85-90.

Assmann, A., 1998: Die Planung dezentraler, integrierter Hochwasserschutzmaßnahmen - mit dem Schwerpunkt der Standortausweitung von Retentionsarealen an der Oberen Elsenz, Kraichgau. Dissertation am Geographischen Institut Heidelberg.

Aubert, J., 1959: Insecta Helvetica Plecoptera, Lausanne, 140 pp.

Babich, H. & Borenfreund, E., 1992: Neutral red assay for toxicology *in vitro*. In: R.R. Watson (Editor), *In vitro* methods of toxicology. CRC - Press, Boca Raton, Florida, pp. 238-251.

Balch, G.C., Metcalfe, C.D. & Huestis, S.Y., 1995: Identification of Potential Fish Carcinogens in Sediment from Hamilton Harbour, Ontario, Canada. Environ. Toxicol. Chem., 14(1): 79-91.

Balls, M. & Clohier, R.H., 1992: Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: R.R. Watson (Editor), *In vitro* methods of toxicology. CRC - Press, Boca Raton, Florida, pp. 38-50.

Barile, F.A., 1994: Introduction to *in vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods. CRC Press, Boca Raton, Florida, 213 pp.

Barsch, D., Gude, M., Mäusbacher, R., Schukraft, G. & Schulte, A., 1994a: Feststoff- und Sedimentdynamik von Elsenz und Neckar bei Hochwasserabfluss. In: G. Matschullat und G. Müller (Editor), Geowissenschaften und Umwelt. Springer, Heidelberg, pp. 85-93.

Barsch, D., Mäusbacher, R. & Schukraft, G., 1986: Beiträge zur Stoffbilanz der Elsenz. In: G. Müller (Editor), Neckar-Umwelt-Symposium 22-23.Oktober Heidelberg. Heidelberger Geowiss. Abh. Selbstverlag, Heidelberg, pp. 119-122.

Barsch, D., Mäusbacher, R., Schukraft, G. & Schulte, A., 1989a: Beiträge zur aktuellen fluvialen Morphodynamik in einem Einzugsgebiet mittlerer Größe am Beispiel der Elsenz im Kraichgau. Göttinger Geographische Abhandlungen, 86: 9-31.

Barsch, D., Mäusbacher, R., Schukraft, G. & Schulte, A., 1989b: Die Belastung der Elsenz bei Hoch- und Niedrigwasser. Kraichgau Beiträge zu Landschafts- und Heimatforschung, 11: 33-48.

Barsch, D., Mäusbacher, R., Schukraft, G. & Schulte, A., 1994b: Hochwasserdynamik und Sedimenttransport - Meßmethodik in einem Einzugsgebiet mittlerer Grösse (Elsenz / Kraichgau). In: D. Barsch, R. Mäusbacher, K.-H. Pörtke and K.-H. Schmidt (Editors), Messungen in fluvialen Systemen: Feld und Labormethoden zur Erfassung des Wasser und Stoffhaushaltes. Springer, Heidelberg, pp. 71-100.

Bätscher, R., Studer, C. & Fent, K. (Editors), 1999: Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt. Schriftenreihe Umwelt Nr. 308: Umweltgefährdende Stoffe, 308, Bern, 258 pp.

Bayley, M., Nielsen, J.R. & Baatrup, E., 1999: Guppy sexual behaviour as an effect biomarker of estrogen mimics. Ecotox. Environ. Safety, 43(1): 68-73.

Beck, M.-P. & Karbe, L., 2000: Apparent und real (anti)östrogene Potentiale in schwebstoff-bürtigen Sedimenten aus der Elbe: Bewertung zytotoxischer Störfaktoren auf zellulärer Ebene. Proceedings - Annual Meeting of the Society of Environmental Chemistry and Toxicology - German Language Branch, Hamburg-Harburg.

Beck, M.-P., Karbe, L., Balaguer, P., Nicolas, J.-C., Blankenship, A., Giesy, J.P. & Stachel, B., 1999: Oestrogenic and antioestrogenic potentials of freshly deposited sediments (FDS) along the Elbe River, SETAC Europe, Leipzig.

Becker, R., 1992: Kartierung der Oberflächengewässer, Amt für Umweltschutz und Gesundheitsförderung der Stadt Heidelberg, Heidelberg.

Behrens, A. & Segner, H., 1999: Eignung von Biotransformationsenzymen zur Differenzierung kleiner Fließgewässer. In: J. Oehlmann und B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 376-381.

Benford, D.J., Reavy, H.J. & Hubbard, S.A., 1988: Metabolizing systems in cell culture cytotoxicity tests. Xenobiotica, 18(6): 649-656.

Benson, W.H. & DiGiulio, R.T., 1992: Biomarkers in hazard assessments of contaminated sediments. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 241-265.

Berger, H., Foissner, W. & Kohmann, F., 1997: Bestimmung und Ökologie der Mikrosaprobien nach DIN 38 410. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 291 pp.

Besser, J.M., Ingersoll, C.G. & Giesy, J.P., 1996: Effects of spatial and temporal variation of acid-volatile sulfide on the bioavailability of copper and zinc in freshwater sediments. Environ. Toxicol. Chem., 15(3): 286-293.

Besser, J.M., Ingersoll, C.G., Leonard, E.N. & Mount, D.R., 1998: Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: Implications for toxicity identification evaluation procedures. Environ. Toxicol Chem, 17(11): 2310-2317.

BfG, 2000: Handlungsanweisungen für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB-WSV), Koblenz.

Bieberstein, U. (2000): Life Cycle-Untersuchungen am Zebrabärbling (*Danio rerio*). Dissertation an der Fakultät für Biologie der Univeristät Heidelberg, Heidelberg.

Billsson, K., Westerlund, L., Tysklind, M. & Olsson, P.E., 1998: Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*). Mar. Environ. Res., 46(1-5): 461-464.

Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Mayer, L. & Olsén, K.H., 1999: Estrogen in food and water severely effect the male goldfish (*Crassius auratus*) sexual behaviour. In: SETAC (Hrsg.), Proceedings of the SETAC 20th Annual Meeting, Philadelphia.

Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Mayer, L., Olsmann, H., Wetterauer, B., Hollert, H. & Olsén, K.H., 2000: Effects of swedish sewage treatment work effluent on vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and male fish sexual behaviour. In Vorbereitung.

Bley, D. & Schmidt, K.H., 1994. Schwebstofferfassung - über die Trübungsmessung in einem Wildbach (Lainbach / Oberbayern). In: D. Barsch, R. Mäusbacher, K.-H. Pörtke und K.-H. Schmidt (Editors), Messungen in fluvialen Systemen: Feld und Labormethoden zur Erfassung des Wasser und

Stoffhaushaltes. Springer, Heidelberg, pp. 159-172.

Böhmer, J., Kappus, B., Rawer-Jost, C. & Bratich, T., 1997: Ökologische Bewertung von Fließgewässern in der Europäischen Union und anderen Ländern - Literaturstudie. Handbuch Wasser 2, 37. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, 58 pp.

Böhmer, J., Rawer-Jost, C. & Kappus, B., 1999: Ökologische Fließgewässerbewertung, Biologische Grundlagen und Verfahren - Schwerpunkt Makrobenthos. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie, Loseblattsammlung, 8. Ergänzungslieferung. Ecomed-Verlag, pp. 1-59.

Böhmer, J., Rawer-Jost, C. & Kappus, B., 2000: Ökologische Fließgewässerbewertung, Biologische Grundlagen und Verfahren - Schwerpunkt Makrobenthos, Teil II. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie, Loseblattsammlung, 9. Ergänzungslieferung. Ecomed-Verlag, pp. 60-120.

Böhmer, J., Rawer-Jost, C., Kappus, B., Blank, J., Hock, C., Siber, R. & Bratich, C., 1998: Integrierte ökologische Fließgewässerbewertung - Erarbeitung von Grundlagen zur leitbildorientierten biologischen Fließgewässerbewertung im Mittelgebirge. Abschlußbericht im Auftrag der LAWA, Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim.

Borchert, C., 1983: Geographische Landeskunde von Baden-Württemberg. Schriften zur politischen Landeskunde Baden-Württembergs, 8. Kohlhammer, Stuttgart, 379 pp.

Borenfreund, E., Babich, H. & Martin-Alguacil, N., 1988a: Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxic. in vitro, 2(1): 1-6.

Borenfreund, E. & Puerner, J.A., 1984: A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)., J. Tissue Cult. Meth., pp. 7-9.

Borenfreund, E. & Shopsis, C., 1985: Toxicity monitored with a correlated set of cell-culture assays. Xenobiotica1985, 15(8/9): 705-711.

Borenfreund, E.H., Babich, H. & Martin-Alguacil, N., 1988b: Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxicol. in vitro, 2: 1-6.

Bortz, J., Lienert, G.A. & Boehnke, K., 1990: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, 939 pp.

Borzsonyi, M., Torok, G., Pinter, A. & Surjan, A., 1984: Agriculturally-related carcinogenic risk. IARC Sci Publ, 56: 465-86.

Bostelmann, R., Braukmann, U., Briem, E., Humborg, G., Nadolny, I., Ness, A., Scheurlen, K., Schmidt, G., Steib, K. & Weibel, U. (Editors), 1994: Fließgewässertypologie, Ergebnisse interdisziplinärer Studien an naturnahen Fließgewässern und Auen in Baden Württemberg mit Schwerpunkt Buntsandstein-Odenwald und Oberrheinebene. Ecomed Verlagsgesellschaft, 225 pp.

Bosveld, A.T., Kennedy, S.W., Seinen, W. & van den Berg, M., 1997: Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) inducing potencies of planar chlorinated aromatic hydrocarbons in primary cultures of hepatocytes from different developmental stages of the chicken. Arch Toxicol, 71(12): 746-50.

Boucher, A.M. & Watzin, M.C., 1999: Toxicity identification evaluation of metal-contaminated sediments using an artificial pore water containing dissolved organic carbons. Environ. Toxicol. Chem., 18(3): 509-518.

Boxall, A.B.A. & Maltby, L., 1995: The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. Water research, 29(9): 2043-2050.

Brack, W., 1999: Sequentielle Teststrategie zur Identifikation toxischer organischer Substanzen in Porenwässern und Sedimentextrakten. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 282-289.

Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Möder, M, Segner, H. & Schüürmann, G., 1999a: Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediments in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - A contribution to Hazard assessment. Arch. Environ. Cont. Toxicol., 37: 164-174.

Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Nehls, S., Segner, H. & Schüürmann, G., 1998: Hazard assessment of a contaminated sediment using a biotest battery, 8th Annual Meeting of SETAC-Europe, Bordeaux, pp. Poster 1D/P007.

Brack, W., Hollert, H., Kind, T., Segner, H. & Schüürmann, G., 1999b: Effect-directed identification of EROD-inducing and mutagenic compounds in sediment extracts. In: SETAC (Hrsg.), 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA.

Brack, W., Kind, T., Schrader, S. & Möder, M., 2001a: Separation and analysis of dioxin-like acting toxicants in complex environmental samples. Manuskript.

Brack, W., Schirmer, K., Kind, T., Hollert, H. & Möder, M., 2001b: Effect-directed identification of dioxin-like compounds in sediment extracts. Manuskript.

Brack, W., Segner, H., Möder, M. & Schüürmann, G., 2000: Fixed-effect-level toxicity equivalents - A suitable parameter for assessing ethoxyresorufin-O-deethylase induction potency in complex environmental samples. Environ. Toxicol. Chem., 19: 2493-2501.

Braukmann, U., 1987: Zoozöologische und saprobiologische Beiträge zu einer allgemeinen regionalen Bachtypologie. Ergebnisse der Limnologie -

Archive für Hydrobiologie, 26. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 462 pp.

Braukmann, U. & Pinter, I., 1997a: Concepts for an integrated ecological evaluation of running waters - Strategy paper. Acta hydrochim hydrobiol, 25: 113-127.

Braukmann, U. & Pinter, I., 1997b: Integrierte Ökologische Fließgewässerbewertung – Strategiepapier. Acta hydrochim hydrobiol, 25: 113-127.

Braukmann, U. & Vobis, H., 1998: LfU Baden-Württemberg - Gewässergütekarte Baden-Württemberg, 65 pp.

Braunbeck, T., 1993: Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen und Mollusken zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. Veröff PAÖ, 7: 537-559.

Braunbeck, T., 1994: Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. Veröff PAÖ, 8: 533-558.

Braunbeck, T., 1998. Cytological alteration in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental contamination. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (Editors), Fish Ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, pp. 61-140.

Braunbeck, T., Arnold, H., Oulmi, Y., Zahn, T. & Storch, V., 1997a: Neue Ansätze zur Bewertung der Ökotoxizität von Xenobiotika. Teil 1: *In vitro*-Tests mit Fischzellkulturen. Bioforum, 1: 12-16.

Braunbeck, T., Berbner, T., Bieberstein, U., Erdinger, L., Geier, V., Hollert, H., Leist, E., Rahman, N. & Zipperle, J., 1995a: Toxikologische und Ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fliegewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystem mit Zellkulturen aus Fischen. Veröff PAÖ: 345-358.

Braunbeck, T., Deventer, K., Froschauer, A., Glos, M., Krolla-Sidenstein, P., Miltenburger, H.G., Nehls, S., Schnurstein, A., Segner, H., Obst, U. & Weßler, H., 2000: The comet assay as a tool to detect the genotoxic potential of surface water samples: *in vivo* and *in vitro* assays using green algae, protozoa, molluscs, fish, as well as primary and permanent cell cultures from fish and mammals. Mut. Res., submitted.

Braunbeck, T., Hauck, C., Scholz, S. & Segner, H., 1996: Mixed function oxygenases in cultured fish cells: contributions of *in vitro* studies to the understanding of MFO induction. Z. Angew. Zool., 81: 55-72.

Braunbeck, T., Hollert, H., Dürr, M. & Erdinger, L., 1997b: Biotests in der Ökotoxikologie am Beispiel des Fischzelltests. Veröff. PAÖ, 22: 241-256.

Braunbeck, T., unter Mitarbeit von Arnold, H., Bauer, I., Briese, I., Hauck, C., Hollert, H., Holzschuh, J., Islinger, M., Müller, F. & Zahn, T., 1995b: Zelltests in der Ökotoxikologie - Cytotoxizitätstets mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests. Veröff. PAÖ, 11. Landesanstalt für Umweltschutz des Landes Baden Württemberg, Karlsruhe, 204 pp.

Brehm, J. & Meijering, M., 1990: Fließgewässerkunde - Einführung in die Limnologie der Quellen, Bäche und Flüsse. Verlag Quelle und Meyer, Heidelberg, 295 pp.

Bresch, H., 1991: Early life-stage test in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 46: 641-648.

Brockett, S., 2000: The framework directive on water policy - an overview. In: BfG (Editor), Sediment Assessment in European River Basins, Reihe: Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Berlin, pp. 15-25.

Broman, D., Näf, C. & Rannug, U., 1994: Mutagenic effect of extracts from particular matter collected with sediment traps in the archipelago of Stockholm and the open nothern Baltic. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53: 669-674.

Brown, V., Shurben, D., Miller, W. & Crane, M., 1994: Cadmium toxicity to Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and Brown Trout *Salmo trutta L.* over extended exposure periods. Ecotox. Environ. Safety, 29: 38-46.

Brüggemann, R. & Halfon, E., 1997: Comparative analysis of nearshore contaminated sites in Lake Ontario: Ranking for environmental hazard. J. Environ. Sci. Health, 32: 277-293.

Brüggemann, R., Münzer, B. & Halfon, E., 1994: An algebraical tool to compare ecosystems with respect to their pollution - the german river Elbe as an example. Chemosphere, 28(5): 863-872.

Brüggemann, R., Oberemm, A. & Steinberg, C., 1997: Ranking of aquatic effect tests using Hasse diagramms. Toxicol. Environ. Chem., 16: 125-139.

Brüggemann, R. & Steinberg, C., 1995: Einsatz von Hasse-Diagrammen zur vergleichenden Bewertung von aquatischen Wirkungstests. USWF-Z. Umweltchem. Ökotox., 7(6): 323-331.

Brüggemann, R. & Steinberg, C., 2000: Einsatz der Hassediagrammtechnik zur vergleichenden Bewertung von Analysedaten - am Beispiel von Umweltuntersuchungen in den Regionen Baden-Württembergs-, Analytiker Taschenbuch. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 32.

Brüggemann, R., Voigt, K., Kaune, A., Pudenz, S., Komoßa, D. & Friedrich, J., 1998: Vergleichende ökologische Bewertung von Regionen in Baden-Württemberg. GSF-Bericht 20/98, GSF, Neuherberg.

Brumbaugh, W.G., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., May, T.W. & Zajicek, J.L., 1994: Chemical characterization of sediments and pore water from the upper Clark Fork River and Milltown Reser-

voir, Montana. Environ. Toxicol. Chem, 13(12): 1971-1983.

Brunström, B., Broman, D., Dencker, L., Näf, C., Vejlens, E. & Zebühr, Y., 1992: Extracts from settling particulate matter collected in the Stockholm archipelago waters: Embryolethality, immunotoxicity, and EROD-inducing potency of fractions containing aliphatics/monoaromatics, diaromatics, or polyaromatics. Environ. Toxicol. Chem., 11: 1441-1449.

Brunström, B., Engwall, M., Hjelm, K., Lindqvist, L. & Zebuhr, Y., 1995: EROD induction in cultured chick embryo liver: A sensitive bioassay for dioxin-like environmental pollutants. Environ. Toxicol. Chem., 14(5): 837-842.

Brunström, B. & Halldin, K., 1998: EROD induction by environmental contaminants in avian embryo livers. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 121: 213-219.

Buck, H., 1986: Vergleichende Gewässergütebeurteilung mit Hilfe der Kopplungsanalyse unter Verwendung statistischer Parameter, In: Bewertung der Gewässerqualtität und Gewässergüteanforderungen. R. Oldenbourg Verlag, München, pp. 117-134.

Bufflap, S.E. & Allen, H.E., 1995: Comparison of pore water sampling techniques for trace metals. Wat. Res., 29(9): 2051-2054.

Bühl, A. & Zöfel, P., 1995: SPSS für Windows Version 6.1 - Praxisorientierte Einführung in die moderne Datenanalyse. Addison-Wesley Publishing Company, Bonn, Paris, 1-623 pp.

Bulychev, A., Trouet, A. & Tulkens, P., 1978: Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. Exp. Cell. Res, 115.

Burgess, R.M., Cantwell, M.G., Pelletier, M.C., Ho, K.T., Serbst, J.R., Cook, H.F. & Kuhn, A., 2000: Development of a Toxicity Identification Evaluation Procedure for Characterizing Metal Toxicity in Marine Sediments. Environ. Toxicol. Chem., 19(4): 982-991.

Burton, G.A., 1991: Assessing the toxicity of freshwater sediments. Environ. Toxicol. Chem., 10: 1585-1627.

Burton, G.A., 1992 : Sediment collection and processing: Factors affecting realism. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 37-66.

Burton, G.A., 1995 : Sediment toxicity testing issues and methods. In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton und J. Cairns (Editors), Handbook of Ecotoxicology. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 70-103.

Calmano, 1996: Notwendigkeit einer ökotoxikologischen Beurteilung von Sedimenten – Positionspapier des Fachausschußes "Gewässersedimente" der Fachgruppe Wasserchemie der GDCh. Acta hydrochim. hydrobiol., 24: 101-103.

Calmano, W., Hong, J. & Förstner, U., 1991: Einfluß von pH-Wert und Redoxpotential auf die Bindung und Mobilisierung von Schwermetallen in kontaminierten Sedimenten. Vom Wasser, 78: 245-257.

Camargo, J., 1990: Performance of a new ecotoxicological index to assess environmental impacts on freshwater communities. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44: 529-534.

Campbell, M., Bitton, G., Koopman, B. & Delfino, J.J., 1992: Preliminary comparision of sediment extraction procedures and exchange solvents for hydrophobic compounds based on inhibition of bioluminescence. Environ Toxicol Water Quality, 7: 329-338.

Canfield, T.J., Kemble, N.E., Brumbaugh, W.G., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G. & Fairchild, J.F., 1994: Use of benthic invertebrate community structure and the sediment quality triad to evaluate metal-contaminated sediment in the upper Clark Fork River, Montana. Environ. Toxicol. Chem, 13(12): 1999-2012.

Carmichael, J. et al., 1987: Evaluation of a tetrazolium - based, semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res., 47: 936-942.

Carr, R.S., Chapman, D.C., Howard, C.L. & Biedenbach, J.M., 1996a: Sediment quality triad assessment survey of the Galveston Bay, Texas system. Ecotoxicology . Dec, 5(6): 341-364.

Carr, R.S., Long, E.R., Windom, H.L., Chapman, D.C., Thursby, G., Sloane, G.M. & Wolfe, D.A., 1996b: Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. Environ. Toxicol. Chem., 15(7): 1218-1231.

Carr, R.S., Montagna, P.A., Biedenbach, J.M., Kalke, R., Kennicutt, M.C., Hooten, R. & Cripe, G., 2000: Impact of storm-water outfalls on sediment quality in Corpus Christi Bay, Texas, USA. Environ. Toxicol. Chem., 19(3): 561-574.

Caspers, W., 1982: Steinfliegen, Eintagsfliegen und Zweiflügler als Indikatoren der Gewässergüte. Dechemia Beihefte, 26: 114-119.

Castano, A., Cantarino, M.J., Castillo, P. & Tarazona, J.V., 1996: Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC_{50} and *in vivo* LC_{50} rainbow trout bioassay. Chemosphere, 32(11): 2141-2157.

Castano, A. & Tarazona, J.V., 1995: The use of cultured cells in Environmental Toxicology: *in vitro* toxicity tests. In: M.P. Cajaravalle (Editor), Cell biology in Environmental Toxicology, Bilbo, Spanien, pp. 279-288.

Castano, A., Vega, M., Balzquez, T. & Tarazona, J.V., 1994: Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: The RTG-2 *in vitro* cytotoxicity test. Environ. Toxicol. Chem, 13(10): 1607-1611.

Cerna, M., Pastorkova, A., Smid, J., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Rossner, P. & Zavadil, J., 1996: Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and *in vitro* cytogenetic assay. Toxicol Lett, 88(1-3): 191-7.

Chapman, P., 1992: Pollution status of North Sea sediments - an international integrative study. In: V. Dethlefsen und M. Carr (Editors), Biological effects of contaminants in the North Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. Inter-Research, Oldendorf, pp. 313-322.

Chapman, P.M., 1990: The sediment quality triad approach to determine pollution-induced degradation. Sci. Tot. Environ., 97/98: 815-825.

Chapman, P.M., 1996: Presentation and interpretation of sediment quality triad data. Ecotoxicology, 5(5): 327-339.

Chapman, P.M., 2000: The Sediment Quality Triad: then, now and tomorrow. Intern. J. of Environ. and Poll., 13(1-6): 351-356.

Chapman, P.M., Anderson, B., Carr, S., Engle, V., Green, R., Hameedi, J., Harmon, M., Haverland, P., Hyland, J., Ingersoll, C., Long, E., Rodgers, J., Salazar, M., Sibley, P.K., Smith, P.J., Swartz, R.C., Thompson, B. & Windom, H., 1997: General guidelines for using the sediment quality triad. Mar. Poll. Bull., 34(6): 368-372.

Chapman, P.M., Paine, M.D., Arthur, A.D. & Taylor, L.A., 1996: A triad study of sediment quality associated with a major, relatively untreated marine sewage discharge. Mar. Poll. Bull., 32(1): 47-64.

Chapman, P.M., Power, E.A. & Burton, G.A., 1992: Integrative assessments in aquatic ecosystems. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis, Boca Raton, pp. 313-340.

Chovanec, A., Moog, O. & Koller-Kreimel, V., 1997: Integrierte ökologische Bewertung - eine Vision? Stand der Diskussion in Österreich. In: Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) und Wasserwirtschaftsverband Baden-Württemberg (Hrsg.), Lebensraum Gewässer - nachhaltiger Gewässerschutz im 21. Jahrhundert, pp. 66-75.

Clemons, J.H., Allan, L.M., Marvin, C.H., Wu, Z., McCarry, B.E., Bryant, D.W. & Zacharewski, T.R., 1998: Evidence of estrogen- and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using *in vitro* gene expression assays. Environ. Sc. Technol., 32(12): 1853-1860.

Clonfero, E., 1997: Genotoxicity of urban air particulate matter. Med Lav, 88(1): 13-23.

Codina, J.C., Perez-Torrente, C., Perez-Garcia, A., Cazorla, F.M. & de Vicente, A., 1995: Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 29(2): 260-5.

Connor, K., Ramamoorthy, K., Moore, M., Mustain, M., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A. & Balaguer, P., 1997: Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. Toxicol. Appl. Pharmacol., 145(1): 111-23.

Cooper, R.L. & Kavlock, R.J., 1997: Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. J. Endocrinol, 152(2): 159-66.

Cotelle, S. & Ferard, J.F., 1999: Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. Environ. Mol. Mutagen., 34(4): 246-55.

Crane, M., Chapman, P. & Sparks, T., 1997: Multivariate Methods in Environmental Toxicology and Chemistry. TEN - Toxicol. & Ecotoxicol. News/Rew., 4(6): 164.

Day, K., Dutka, B., Kwan, K., Batista, N., Reynoldson, T. & Metcalfe-Smith, J., 1995: Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and *in situ* benthic community structure. J. Great Lakes Res., 21(2): 192-206.

de Jonge, J., Brils, J.M., Hendricks, A.J. & Ma, W.C., 1999: Ecological and ecotoxicological surveys of moderately contaminated floodplain ecosystems in The Netherlands. Aquat. Ecosys. Health Manag., 2: 9-18.

de Maagd, P.G.-J., 2000: Selection of Genotoxicity for Risk Assessment of Effluents. Aquat. Ecosys. Health Manag, 3: 81-90.

de Maagd, P.G.-J., Sinnige, D.T. & Sijm, H.M., 1998: Bioavailability of organic test compounds in *in vitro* test systems. Proceedings - Annual Meeting of the Society of Environmental Chemistry and Toxicology in Bordeaux (France): 1H/013.

Decker, T. & Matthes, M.L.L., 1988: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J. Immunol. Methods, 15: 61-69.

DelRaso, N.J., 1992: In vitro methods for assessing chemical or drug toxicity and metabolism in primary hepatocytes. In: R.R. Watson (Editor), In vitro methods of toxicology. CRC - Press, Boca Raton, Florida, pp. 176-201.

DelValls, T.A., Blasco, J., Sarasquete, M.C., Forja, J.M. & GomezParra, A., 1998a: Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *Sparus aurata*. Ecotox. Environ. Saf., 41(2): 157-167.

DelValls, T.A., Forja, J.M. & GomezParra, A., 1998b: The use of multivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cadiz (Spain). Ciencias Marinas., 24(2): 127-154.

DelValls, T.A., Forja, J.M. & Gómez-Parra, A., 1998c: Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the gulf of Cádiz, Spain. Environ. Toxicol. Chem., 17(6): 1073-1084.

DelValls, T.A., Forja, J.M., GonzalezMazo, E., GomezParra, A. & Blasco, J., 1998d: Determining contamination sources in marine sediments using multivariate analysis. Trac (Trends In Analytical Chemistry), 17(4): 181-192.

Denizot, F. & Lang, R., 1986: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival; Modification to the terazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods, 89: 271.

Depledge, M.H., 1998: The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. Mutat. Res., 399(1): 109-22.

Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. & Waldock, M., 1998: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. Environ. Sci. & Technol., 32(11): 1549-1558.

Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. & Monod, G., 1998: Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). Mar. Environ. Res., 46(1-5): 257-262.

Di Toro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. & Paquin, P.R., 1991: Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. Environ. Toxicol. Chem., 10: 1541-1583.

DIN, 1998: *Arthrobacter globiformis*-Kontakttest für kontaminierte Feststoffe, Sedimente und Böden. DIN-Vorschlag.

Deutscher Normenauschuß (DIN), Beuth Verlag, Berlin.

Dürr, M., Hollert, H., Winn, N., Kaiser, P., Holtey-Weber, R., Färber, H., Gratzer, H., Ahlf, W., Schöler, H., Braunbeck, T. & Erdinger, L., 1999: Risk Assessment of a flood event, Part 2: Limnochemical parameters, chemical trace analyses and microbial testsystems., Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Dürr, M., 2001: Mutagenität von Oberflächenwasser. Doktorarbeit am Hygiene-Insitut der Universität Heidelberg, Manuskript: in Vorbereitung.

Dürr, M., Hollert, H., Braunbeck, T., Erdinger, L. & Sonntag, H.-G., 2000: Bioassay-dirigierte Fraktionierung von Sedimenten und Schwebstoffen anhand der toxischen Wirkungen auf RTG-2-Zellen. In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner und A. Klumpp (Editors), Bioindikation - Biologische Testverfahren. Verlag Günther Heimbach, Stuttgart, pp. 205-208.

Dürr, M., Hollert, H. & Erdinger, L., 1999: Bakterien-Kurzzeittest zur Bestimmung des genotoxischen Potentials von Wasser, Schwebstoffen und Sedimenten. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 263-267.

Durrer, S., 1999: Untersuchung der estrogenen Aktivität in Proben aus Vor- und Nachklärbecken einiger Kläranlagen in der Schweiz. Diplomarbeit. Universität Zürich-Irchel, 83 pp.

DWD: Homepage des Deutschen Wetterdienstes. Online unter: http://www.dwd.de/

Edmondson, J., 1988: A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. J. Tissue Cult. Methods, 11: 15-17.

Eichler, H., Musall, H. & Scheuerbrandt, A., 1995: Klimatisch-Meteorologische Übersicht des Rhein-Neckar Raumes. Stadtatlas Heidelberg, 2. Lieferung, Blatt 3.8.

Ekwall, B. et al., 1998: Part VI. The prediction of human toxicity by rident ld50 values and results from 61 *in vitro* methods. Atla (Alternatives To Laboratory Animals), 2: 617-658.

Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. & Wolf, R.C., 1992: Alternatives to Aroclor 1254 induced S9 in *in vitro* genotoxicity assays. Mutagenesis, 7(3): 175-177.

Engwall, M., 1995: Toxicity assessment of lipophilic extracts from environmental samples - doctoral thesis. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of science and technology, Uppsala.

Engwall, M., Broman, D., Dencker, L., Näf, C., Zebühr, Y. & Brunström, B., 1997a: Toxic potencies of extracts of sediment and settling particulate matter collected in the recipient of a bleached pulp mill effluent before and after abandoning chlorine bleaching. Environ. Toxicol. Chem., 16(6): 1187-1194.

Engwall, M., Broman, D., Ishaq, R., Näf, C., Zebühr, Y. & Brunström, B., 1996: Toxic potencies of lipophilic extracts from sediments and settling particulate matter (SPM) collected in a PCB contaminated river system. Environ. Tox. Chem., 15(2): 213-222.

Engwall, M., Broman, D., Näf, C., Zebühr, Y. & Brunstrom, B., 1997b: Dioxin-like compounds in HPLC-fractionated extracts of marine samples from the east and west coast of Sweden: Bioassay- and instrumentally-derived TCDD equivalents. Marin Poll. Bull., 34(12): 1032-1040.

Engwall, M., Brunström, B., Brewer, A. & Norrgren, L., 1994: Cytochrome p450IA induction by coplanar PCB, a PAH mixture, and PCB-contaminated sediment extracts following microinjection of rainbow trout sac-fry. Aquatic Toxicol, 30: 311-324.

Engwall, M., Brunström, B., Näf, C. & Hjelm, K., 1999: Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on EROD induction in chicken embryo liver cultures. Chemosphere, 38(10): 2327-2343.

Engwall, M., Naf, C., Broman, D. & Brunstrom, B., 1998a: Biological and chemical determination of contaminant levels in settling particulate matter and sediments - A Swedish river system before, during, and after dredging of PCB-contaminated lake sediments. Ambio, 27(5): 403-410.

Engwall, M., Strandberg, W., Hjelm, K. & Brunström, B., 1998b: Estrogenic and dioxin-like effectts of HPLC-fractionated extracts of sewage sludge in Ishikawa cells and chicken embryo livers, 8th Annual meeting of SETAC-Europe, Bordeaux, pp. 3B-P004.

Ensenbach, U., 1998: Embryonic development of fish - A model to assess the toxicity of sediments to vertebrates. Fresenius Environmental Bulletin. Sep Oct, 7(9-10): 531-538.

Ensenbach, U., 1999. Einfluß von Fremdstoffen auf die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings (*Danio rerio*). In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 269-273.

Ensenbach, U. & Nagel, R., 1995: Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Ecotoxicol. Environ. Safety, 30: 151-157.

EPA, 1999: Toxicity reduction evaluation guidance for municipal wastewater treatment plants. Report EPA/883B-99/002, 159 pp.

Erdinger, L., Höpker, K.-A., Dörr, I., Fried, M. & Dürr, M., 1997: Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft. Identität, Transformation und ökotoxikologische Bedeutung. Veröff. PAÖ., 25, Karlsruhe, 215 pp.

Escher, M. (Editor), 1999: Einfluss von Abwassereinleitungen aus Kläranlagen auf Fischbestände und Bachforelleneier. Mitteilungen zur Fischerei, 61. BUWAL, Bern, 1-201 pp.

Fahmy, M.A. & Aly, F.A., 2000: *In vivo* and *in vitro* studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. J. Appl. Toxicol., 20(3): 231-8.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L. & O'Neill, K.L., 1995: The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res., 339(1): 37-59.

Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F. & Bergman, H.L., 1994: Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. Environ. Toxicol. Chem., 13(12): 2021-2029.

Feiler, U. & Krebs, F., 1999. Entwicklung und Anwendung pflanzlicher Biotestverfahren für ökotoxikologische Sedimentuntersuchungen. In: J. Oehlmann und B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 436-443.

Fent, K. & Meier, W., 1994: Effects of triphenyltin on fish early life stages. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27: 224-231.

Fernández, P., Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M. & Albalés, J., 1992: Bioassay - directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol., 26: 817-829.

Flouriot, G., Pakdel, F. & Valotaire, Y., 1996: Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. Mol. Cell. Endocrinol., 124: 173-183.

Förstner, U., Calmano, W., Ahlf, W. & Kersten, M., 1989: Ansätze zur Beurteilung der Sedimentqualität von Gewässern. Vom Wasser, 73: 25-42.

Förstner, U. & Müller, G., 1974: Schwermetalle in Flüssen und Seen. Springer-Verlag, Heidelberg, 225 pp.

Fossi, M.C., Savelli, C. & Casini, S., 1998: Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii.* Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. Comp. Biochem. Physiol. C, 121(1-3): 321-31.

Fretwurst, S., Gratzer, H., Stachel, B. & Ahlf, W., 1997: Erprobung einer Biotestkombination an einem Sedimentlängsprofil der Elbe, GDCh - Tagung 1997 in Lindau.

Frey, S., 2000: Analytik von Alkylphenolen, Umweltanalytiktage Nordrhein-Westfalen, Duisburg, pp. 1-2.

Friedrich, G., 1998: Integrierte Bewertung der Fließgewässer - Möglichkeiten und Grenzen, Integrierte ökologische Gewässerbewertung - Inhalte und Möglichkeiten. Münchner Beiträge zur Anwasser-, Fischerei- und Flussbiologie. Oldenbourg, München, Wien, pp. 35-56.

Friedrich, G. & Lacombe, J., 1992: Ökologische Bewertung von Fließgewässern. Limnologie aktuell, 3. Gustav Fischer, Stuttgart, 462 pp.

Friedrich, M., Fränzle, O. & Salski, A., 1996: Fuzzy clustering of existing chemicals according to their ecotoxicological properties. Ecological Modelling, 85: 27-40.

Fry, J.R., 1982: Activation systems in tissue culture toxicity studies. Toxicology, 25: 1-12.

Fuchs, S., Butz, J. & Holz, A., 1999a: Schwermetallbilanz für Neckar und Lahn. In: S. Fuchs und H.H. Hahn (Editors), Schadstoffe im Regenabfluss. IV Abschlusspräsentation des BMBF-Verbund-

projektes NIEDERSCHLAG - Schriftenreihe des ISWW.

Fuchs, T., Rapp, J. & Rudolf, B., 1999b: Starkniederschläge im Oktober 1998 in Mittel- und Westeuropa. DWD.

Gagné, F. & Blaise, C., 1998: Differences in the measurement of cytotoxicity of complex mixtures with rainbow trout hepatocytes and fibroblasts. Chemosphere. Aug, 37(4): 753-769.

Gagné, F. & Blaise, C., 1995: Evaluation of genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. Wat. Quality, 10.625-633.

Gagné, F., Pardos, M. & Blaise, C., 1999: Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. Bull. Environ. Cont. Toxicol., 62(6): 723-730.

Gagné, F., Trottier, S., Blaise, C., Sproull, J. & Ernst, B., 1995: Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. Toxicol. Letters, 78: 175-182.

Galassi, S. & Benfenati, E., 2000: Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. J Chromatogr A, 889(1-2): 149-54.

Geier, V., 1994. Effizienzkontrolle einer Renaturierungsmaßnahme am Neckar - Das Modellvorhaben "Flachwasserzone" im Hinblick auf die Förderung der limnischen und terrestrischen Fauna. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, Heidelberg.

Ginn, T.C. & Pastorok, R.A., 1992: Assessment and mangement of contaminated sediments in Puget Sound. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis, Boca Raton, pp. 371-401.

Gledhill, T., Sutcliff, D.W. & Williams, W.D., 1976: A revised key to the british species of Crustacea: Malacostraca-occuring in fresh water. Ambleside, 71 pp.

Glöer, P. & Meier-Brook, C., 1994: Süsswassermollusken, Hamburg, 136 pp.

Glück-Macholdt, C. & Lieser, K.H., 1988: Untersuchungen der Sorption von Schwermetallen an Schwebstoffen des Rheins mit Hilfe der Mikroautoradiographie. Vom Wasser, 70: 255-264.

Goksoyr, A. & Husoy, A.M., 1998: Immunochemical approaches to studies of CYPIA localization and induction by xenobiotics in fish. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (Editors), Fish Ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, pp. 165-202.

Goksoyr, A. & Förlin, L., 1992: The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquat. Toxicol., 22: 287-312.

Goodman, L.R., Hansen, D.J., Cripe, G.M., Middaugh, D.P. & Moore, J.C., 1985: A new early life-stage toxicity test using the californian grunion (*Leuresthes tenuis*) and results with chlorpyrifos. Ecotox. Environ. Safety, 10: 12-21.

Görge, G. & Nagel, R., 1990: Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Ecotox. Environ. Safety, 20: 246-255.

Götz, R., 1997: Dioxine und Furane. In: V. Maaß, C. Schmidt, R. Lüschow und T. Leitz (Editors), Sedimentuntersuchungen im Hamburger Hafen 1994/95. Ergebnisse aus dem Baggergutuntersuchungsprogramm. Stadt Hamburg, Wirtschaftsbehörde, Strom- und Hafenbau, Hamburg, pp. 61-64.

Gratzer, H. & Ahlf, W., 1999a: Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. UBA-Texte, 44/99: 171.

Gratzer, W. & Ahlf, W., 1999b: Ökotoxikologische Untersuchung von Feststoffen und Lösungen mit *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) als Testorganismus. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 246-251.

Green, R.H. & Montagna, P., 1996: Implications for monitoring: Study designs and interpretation of results. Can. J. Fish. Aquat. Sci, 53(11): 2629-2636.

Griest, W.H., Tyndall, R.L., Stewart, A.J., Caton, J.E., Vass, A.A., Ho, C.H. & Caldwell, W.M., 1995: Chemical characterization and toxicological testing of windrow composts from explosives-contaminated sediments. Environ. Toxicol. Chem., 14(1): 51-59.

Grifoll, M., Solanas, A.M. & Bayona, J.M., 1990: Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella* / microsome test. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19: 175-184.

Grifoll, M., Solanas, A.M. & Pares, R., 1988: Assessment of mutagenic activity of coastal sediments off Barcelona. Toxic. Assess., 3: 315-329.

Grummt, T., 2000. Sachstand - Empfehlung zum Aufbau einer Testbatterie. In: BMBF (Editor), Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung (PtWT+E), Forschungsvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächengewässer, Abschlussbericht, Dresden, pp. 214-217.

Gülden, M., Turan, A. & Seibert, H., 1997: Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. UBA-Texte 46/97: 1-362.

Gunkel, G., 1994a: Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 540 pp.

Gunkel, G., 1994b: Erfassung der genotoxischen Wirkung. In: G. Gunkel (Editor), Bioindikation in aquatischen Systemen - Bioindikation in limnischen und küstenahen Ökosystemen – Grundlagen, Verfahren und Methoden. Gustav-Fischer-Verlag, Jena & Stuttgart, pp. 339-342.

Gustafsson, E., Brunström, B. & Nilsson, U., 1994: Lethality and EROD-inducing potency of chlorinated chrysene in chick embryos. Chemosphere, 29(9-11): 2301-2308.

Haag, I., Kern, U. & Westrich, B., 1999a: Kombinierte Bewertung kontaminierter Gewässersedimente: Tiefenabhängige Messung von Erosionsrisiko und Sedimentqualität. Wasser & Boden, 51(5): 42-47.

Haag, I., Kern, U. & Westrich, B., 1999b: Mobilität von Schadstoffen in Sedimenten staugeregelter Flüsse - Dynamik und Bilanzierung von Schwebstoffen und Schwermetallen in einer Stauhaltung. Wissenschaftlicher Bericht Nr.99/11 (VA 21) für das Projekt Wasser-Abfall-Boden, Forschungszentrum Karlsruhe (PW 96 182), Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart, Stuttgart, online unter www.fzk.de.

Haag, I., Kern, U. & Westrich, B., 2000a: Assessing in-stream erosion and contaminant release by means of the end-member mixing analysis (EMMA). In: IAHS (Hrsg.), International Symposium on the Role of Erosion and Sediment Transport in Nutrient and Contaminant Transfer, Waterloo, Canada, pp. In press.

Haag, I., Kern, U. & Westrich, B., 2000b: Erosive Freisetzung von partikulären Stoffen aus Gewässersedimenten - Quantifizierung mit Hilfe der Quellkomponenten-Mischungsanalyse. Hydrologie und Wasserbewirtschaftung, 44: 235-244.

Haag, I., Kern, U. & Westrich, B., 2001: Erosion inverstigation and sediment quality measurements for a comprehensive risk assessment of contaminated sediments. Sci. Tot. Environ., 266: 249-257.

Haglund, P., Alsberg, T., Bergman, A. & Jansson, B., 1987: Analysis of halogenated polycyclic aromatic-hydrocarbons in urban air, snow and automobile exhaust. Chemosphere, 16(10-12): 2441-2450.

Hahn, M.E. & Stegeman, J.J., 1992: Phylogenetic distribution of the Ah receptor in non-mammalian species: implication for dioxin toxicity and receptor evolution. Chemosphere, 25: 931-937.

Håkanson, L., 1992: Sediment variability. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 19-35.

Halbfass, H., 1990: Limnologische Untersuchungen in Altrheinen. In: R. Kinzelbach und G. Friedrich (Editors), Biologie des Rheins - Limnologie Aktuell, Band 1. Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 455-460.

Hale, R.C., Smith, C.L., De Fur, P.O., Harvey, E., Bush, E.O., La Guardia, M.J. & Vadas, G.G., 2000: Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. Environ. Toxicol. Chem., 19(4): 946-952.

Halfon, E. & Reggiani, M.G., 1986: On ranking chemicals for environmental hazard. Environ Sci Technol, 20: 1173-1179.

Hall, K.J., McCallum, D.W., Lee, K. & Macdonald, R., 1998: Characterization and aquatic impacts of combined sewer overflows in Greater Vancouver, British Columbia. Wat. Sci. Technol., 10: 9-14.

Halldin, K., 1996: EROD Induction in Chick Embryo Liver and Precision Cut Chick Liver Slices: A Rapid Bioassay for Dioxine-like Compounds. Master thesis, Uppsala Universitet, Uppsala, 36 pp.

Hammer, J., 1995: Grundwasserbeeinflussung durch luftgetragene organische Schadstoffe. Heidelberger Beiträge zur Umwelt-Geochemie, Bd. 4: 300.

Hannigan, M.P., Cass, G.R., Penman, B.W., Crespi, C.L., Lafleur, A.L., Busby Jr., W.F., Thilly, W.G. & Simoneit, B.R., 1998: Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay. Environ. Sci. Technol., 32: 3502-3514.

Harkey, G.A., Landrum, P.F. & Klaine, S.J., 1994: Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. Environ. Toxicol. Chem., 13(8): 1315-1329.

Harries, J.E., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R., 1999: Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. Environ. Toxicol. Chem, 18(5): 932-937.

Hartung, J., 1991: Statistik - Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. R. Oldenburg, München - Wien, 973 pp.

Hauck, C., 1993: Biochemische und morphologische Untersuchungen an isolierten Fischzellen. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, Heidelberg, 191 pp.

Heidelberg, 1999. Umweltbericht 1995-1998, Amt für Umweltschutz der Stadt Heidelberg.

Heise, S., Maaß, V., Gratzer, H. & Ahlf, W., 2000: Ecotoxicolgical sediment classification – capabilities and potentials - presented for Elbe river sediments. Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, 22: 96-104.

Hellmann, H., 1991: Eisen, Titan und Aluminium in Sedimenten und Böden - ihr Zusammenhang mit der Korngröße und ihre Rolle als Referenzelemente. Vom Wasser, 78: 73-89.

Hellmann, H., 1996: Organische Spurenstoffe in Gewässerschwebstoffen. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie. ecomed, Landsberg am Lech, pp. 5-46.

Helma, C., Knasmüller, S. & Schulte-Hermann, R., 1994: Die Belastung von Wässern mit gen-

toxischen Substanzen. Z Umweltchem Ökotox, 6(5): 277-288.

Hendricks, A.J., 1994: Monitoring and estimating concentrations and effects of microcontaminants in the Rhine-delta: chemical analysis, biological laboratory assays and field obersevations. Wat. Sci. Technol., 3: 223-232.

Henschel, T., Calmano, W., Ahlf, W., Krebs, F. & Maaß, V., 1999: Gefährdungsabschätzung von Gewässersedimenten - Handlungsempfehlungen und Bewertungsvorschläge, Manuskript – Buch der GDCh, pp. 1-76.

Henschel, T., Kalbfus, W., Traunspurger, W., Ahlf, W. & Steinberg, C., 1997a: Erfassung sedimentgebundener Schadstoffe in einem abwasserbelasteten Flußstausee mit einer Biotestbatterie. Vom Wasser, 88(295-307).

Henschel, T., Traunsburger, W., Ahlf, W., Fenn, B., Popp, W., Kopf, W., Kohlpoth. M. & Steinberg, C., 1997b: Die Karower Teiche in Berlin, Nachklärbecken im Abwasserrieselfeldbetrieb: Bewertung des ökotoxikologischen Wirkpotentials sedimentgebundener Schadstoffe mit einer Batterie von Biotests, 2.Jahrestagung der SETAC-German Language Branch, Aachen.

Heylen, S. & dePauw, N., 1999: Mentum deformations in Chironomus larvae for assessment of freshwater sediments in Flanders, SETAC, Leipzig.

Hill, I.R., Matthiessen, P. & Heimbach, F., 1993: Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. In: I.R. Hill, P. Matthiessen und F. Heimbach (Hrsg.), Workshop on sediment toxicity assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Netherlands.

Hilscherova, K., Dusek, L., Kannan, K., Giesy, J.P. & Holoubek, I., 2000: Evaluation of cytotoxicity, dioxin-like activity and estrogenicity of complex environmental mixtures. Cent. Eur. J. Public. Health., 8 Suppl: 28-9.

Ho, K., 1997: Toxicity-base approach to environmental protection. Eur. Wat. Pollution Control, 7(4): 49-52.

Ho, K.T., Kuhn, A., Pelletier, M.C., Burgess, R.M. & Helmstetter, A., 1999a: Use of *Ulva lactuca* to distinguish pH-dependent toxicants in marine waters and sediments. Environ. Toxicol. Chem, 18(2): 207-212.

Ho, K.T., Kuhn, A., Pelletier, M.C., Hendricks, T.L. & Helmstetter, A., 1999b: pH-dependent toxicity of five metals to three marine organisms. Environ. Toxicol. Chem, 14: 235-240.

Ho, K.T., McKinney, R.A., Kuhn, A., Pelletier, M.C. & Burgess, R.M., 1997: Identification of acute toxicants in New Bedford Harbor sediments. Environ. Toxicol. Chem, 16(3): 551-558.

Ho, K.T.Y. & Quinn, J.G., 1993a: Bioassay-directed fractionation of organic contaminants in an estuarine sediment using the new mutagenic bioassay, Mutatox. Environ. Toxicol. Chem, 12: 823-830.

Ho, K.T.Y. & Quinn, J.G., 1993b: Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity as evaluated by Microtox. Environ. Toxicol. Chem., 12: 615-625.

Hofmann, W., 1971: Taxonomie und Palökologie subfossiler Chironomiden (Diptera) in Seensedimenten. Lit.-Arch. Hydrobiol. Beih. 6 (Ergebnisse der Limnologie), Stuttgart, 50 pp.

Hoke, R.A., Jones, P.D., Maccubbin, A.E., Zabik, M.J. & Giesy, J.P., 1994: Use of *In vitro* microbial assays of sediment extracts to detect and quantify contaminants with similar modes of action. Chemosphere, 28(1): 169-181.

Holcombe, G.W., Phipps, G.L. & Fiandt, J.T., 1982: Effect of phenol, 2,4-dimethylphenol, 2,4-dichlorophenol, and pentachlorophenol on embryo, larval, and early-juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Arch. Environm. Contam. Toxicol., 11: 73-78.

Hollert, H. & Braunbeck, T., 1997: Ökotoxikologie *in vitro* - Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoffen. Veröff. PAÖ, 21. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, 189 pp.

Hollert, H., Dürr, M., Dörr, I., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1996: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung der Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe von Zellkulturen aus Fischen. Veröff. PAÖ, 16: 469-488.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1998. Wie giftig sind Schwebstoffe und Sedimente des Neckars? Zur Eignung von Biotests und Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken für die Bewertung des Schadstoffpotentials in hydrologischen Fallstudien. In: H. Karrasch, W. Gamerith, T. Schwan, K. Sachs und U. Krause (Editors), HGG-Journal 13, Heidelberg, pp. 130-145.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000a: Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. Environ. Toxicol. and Chem., 19(3): 528-534.

Hollert, H., Dürr, M., Geier, V., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1998b: A novel *in vitro* approach to sediment toxicity assessment - Contamination of three Neckar sites (Germany). Zoology-Supplement, 101: 77.

Hollert, H., Dürr, M., Geier, V., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999a. Ökotoxikologie in vitro: Gefährdungspotential von Neckarsedimenten. In: J. Oehlmann und B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 444-462.

Hollert, H., Dürr, M., Haag, I., Winn, N., Holtey-Weber, R., Kern, U., Färber, H., Westrich, B.,

Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000b: A combined hydraulic and in vitro bioassay approach to assess the risk of erosion and ecotoxicological implications of contaminated sediments in a lock-regulated river system. In: BfG (Editor), Sediment assessement in European River Basins, Reihe: Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Berlin, pp. 156-160.

Hollert, H., Dürr, M., Islinger, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999b: Biotestverfahren zur Bestimmung des zelltoxischen Schädigungspotentials von Sedimenten und Schwebstoffen. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 256-261.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Pawlowski, S., Gratzer, H., Holtey-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Brack, W., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999c: Integrated assessment of sediments and surface waters in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of in vitro toxicity, chemistry and macrozoobenthos. In: SETAC (Hrsg.), 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Oral presentation, Philadelphia, USA.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Schöler, H., Gratzer, H., Holtey-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999d: Integrated sediment assessment in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of in vitro toxicity, chemistry and macrozoobenthos, Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Pawlowski, S., Islinger, M., Gratzer, H., Ahlf, W., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999e: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. Berichte Umweltforschung des Forschungszentrums Karlsruhe: online unter www.fzk.de.

Hollert, H., Dürr, M., Olsman, H., Halldin, K., Bavel, B.v., Brack, W., Tysklind, M., Engwall, M. & Braunbeck, T., 2001: Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the Neckar River. Ecotoxicology: submitted.

Hollert, H., Dürr, M., Winn, N., Islinger, M., Holtey-Weber, R., Färber, H., Haag, I., Kern, U., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999f: Risk Assessment of a flood event, Part 1: Cyto-, genotoxicity and enodocrine-disrupting potential of suspended matter, Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Hollert, H., Gratzer, H., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 1999g: Einleitung - Kapitel Ökotoxikologie. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 36-51.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 2000c: Möglichkeiten und Grenzen von *In vitro*-Biotests zur Erklärung einer gestörten Bachforellen-Reproduktion im Einzugsgebiet der Aare (Schweiz). In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner und A. Klumpp (Editors), Bioindikation - Biologische Testverfahren. Verlag Günther Heimbach, Stuttgart, pp. 209-214.

Hollert, H., Islinger, M., Siebert, I., Pawlowski, S. & Braunbeck, T., 1999h: Bestimmung des östrogen wirksamen Potentials von Sedimenten und Schwebstoffen mit Hilfe eines Vitellogenin-mRNA-Assays. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 290-296.

Hollert, H., Karaus, U., Dürr, M., Brack, W., Winn, N., Siebert, I., Wetterauer, B., Rudolf, M., Heise, S., Engwall, M., Erdinger, L., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 2000d: Integrierte Sedimentuntersuchungen und Bioassay-dirigierte Fraktionierungen - Zwei Konzepte zur Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg (Ö 97 004). In: F. Horsch, W.G. Filby, S. Gross und H. Krug (Editors), Diskussionskreis "Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe", Diskussionskreise beim Statusseminar BWPLUS 2000(Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung), online unter http://bwplus.fzk.de. BWPLUS-Berichte, pp. 1-20.

Hollert, H., Pawlowski, S. & Braunbeck, T., 2000e: Ökotoxikologische Belastung von Abwasserproben aus dem Kanton Bern / Schweiz, Zoologisches Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg.

Holtey-Weber, R., 2000: Chemische Analytik von endokrin wirksamen Substanzen. PhD Thesis, Manuskript.

Holtey-Weber, R., Färber, H., Schöler, H.F. & Hollert, H., 1999a: Spurenanalytik von Xenoöstrogenen: eine GC-MS/MS-Multimethode mit on-line-Derivatisierung, GDCh-Jahrestagung der Fachgruppe Ökotoxikologie, Jena.

Holtey-Weber, R.I., Färber, H.A. & Schöler, H.F., 1999b: On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS. Vom Wasser, in Druck.

Horne, A.J. & Goldmann, C.R., 1994: Limnology. McGraw-Hill International Editions, New York, 576 pp.

Huggett, R.J., Van Veld, P.A., Smith, C.L., Hargis, W.J., Vogelbein, W.K. & Weeks, B.A., 1992: The effects of contaminated sediments in the Elisabeth River. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 403-433.

Huttenlocher, F., 1972: Kleine Geographische Landeskunde. Schriftenreihe der Kommision für geschichtliche Landeskunde Baden-Württemberg, Karlsruhe. Braun.

Huuskonen, S., Koponen, K., Ritola, O., Hahn, M. & Lindström-Seppa, P., 1998: Induction of CYP1A and porphyrin accumulation in fish hepatoma cells (PLHC-1) exposed to sediment or water from a PCB-contaminated lake (Lake Kernaala, Finland). Mar. Environ. Res, 46(1-5): 379-384.

HVZ, 1998 : Hochwasservorhersagezentrale Baden-Württemberg. online unter: http://www.lfu.baden-wuerttemberg.de/lfu/hvz/

Ibelgaufts, H., 1990: Gentechnologie von A-Z. VCH-Verlag, Weinheim.

ICES, 1999: (International Council for the Exploration of the Sea) Report of the Joint Meeting of the Working Group on Biological Effects of Contaminants and the Working Group on Statistical Aspects of Environmental Monitoring. ICES CM 1999/E:9 Ref.: ACME, The Hague.

Illies, J., 1978: (Hrsg.) Limnofauna Europaea. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 523 pp.

Ingersoll, C.G., 1995: Sediment tests. In: G.M. Rand (Editor), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Taylor and Francis, Washington D.C., pp. 231-256.

Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit, D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P.F., Norberg-King, T.J. & Winger, P.V., 1995a: Toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications. Environ. Tox. Chem., 14(11): 1885-1894.

Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit, D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P.F., NorbergKing, T.J. & Winger, P.V., 1995b: Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem., 14(11): 1885-1894.

Ingersoll, C.G., Brumbaugh, W.G., Dwyer, F.J. & Kemble, N.E., 1994: Bioaccumulation of metals by *Hyalella azteca* exposed to contaminated sediments from the upper Clark Fork River, Montana. Environ. Toxicol. Chem, 13(12): 2013-2020.

Ingersoll, C.G., Dillon, T. & Biddinger, G.R., 1997: Ecological risk assessment of contaminated sediments. SETAC Special Publication Series. SETAC-Press, Pensacola, Florida, 389 pp.

Irmer, U., 2000: Requirements for the implementaion of the EC water framework directive in Germany. In: BfG (Editor), Sediment Assessement in European River Basins, Reihe: Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Berlin, pp. 26-37.

Irmer, U., Lehmann, Schmidtke, Rotard, Göggelmann, Miltenburger, H.G. & Müllerschön, H., 1986: Entwicklung und Erprobung eines kombinierten Untersuchungsverfahrens zum Nachweis und zur Bewertung mutagener Stoffe im Wasser - Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben CMT 48, Institut für Wasser-, Boden-, und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin - Dahlem.

Ishaq, R., 1999: Fractionation and analysis of chlorinated and non-chlorinated aromatic compounds in biotic and abiotic environmental samples. PhD thesis, Stockholm University, Stockholm, 1-50 pp.

Islinger, M., 2001: Nachweis Estrogen-induzierter Genexpression in Fischen und Hepatocyten-primärkulturen als Marker für endokrin wirksame Substanzen in der Umwelt. Doktorarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg, Heidelberg, 149 pp.

Islinger, M., Pawlowski, S. & Braunbeck, T., 1999a. Vittelogenin als Maker für östrogen wirksame Stoffe im Wasser. In: ATV-Schriftenreihe (Editor), Endokrine Stoffe. Verlag für Abwasser, Abfall und Gewässerschutz, Hennef, pp. 125-152.

Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A. & Braunbeck, T., 1999b: Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNAse protection-assay. Sci. Total. Environ., 15: 109-122.

Jarvis, A.S., Honeycutt, M.E., McFarland, V.A., Bulich, A.A. & Bounds, H.C., 1996: A comparison of the ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. Ecotox. Environ Safety., 33(2): 193-200.

Jensen, A. & Bro-Rasmussen, F., 1992: Environmental cadmium in Europe. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 125: 101-81.

Johansson, E., 1999: In Vitro Assays for Detection of Endocrine Disrupting Compounds: Estrogenic Activity in Recombinant Yeast Cells and Aromatase Inhibition in Chicken Embryo Ovaries, Master thesis, Uppsala University, Uppsala.

Johnson, B.T. & Long, E.R., 1998: Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem *in vitro* testing approach. Environ. Toxicol. Chem., 17(6): 1099-1106.

Kammann, U., Riggers, J.C., Theobald, N. & Steinhart, H., 2000: Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. Mut. Res.-Gen. Toxicol. Environ. Mut., 467(2): 161-168.

Kanan, K., Yamashita, N., Imagawa, T., Decoen, W., Khim, J.S., Day, R.M., Summer, C.L. & Giesy, J.P., 2000: Polychlorinated naphthalenes and polychlorinated biphenyls in fishes from Michigan waters including the Great Lakes. Environ Sci Technol, 34(4): 566-572.

Kannan, K., Khim, J.S., Villeneuve, D.L., Koh, C.H. & Giesey, J.P., 1999: Instrumental and Bioanalytical Measures of Dioxin-like Activity in Sediments from Masan Bay, Korea. Organohalogen compounds, 43: 23-27.

Karaus, U., 1999: Integrierte Sedimentbewertung mit *In vitro*-Biotests und Makrozoobenthosaufnahme. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg, Heidelberg. 142 pp.

Karbe, L., Mädler, K. & Janský, B., 1992: Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasser und Sediment in Elbe und Nordsee - Statusseminar zum Biotox-Programm. Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung der Universität Hamburg, 24, Hamburg, 69 pp.

Karbe, L., Mädler, K. & Westendorf, J., 1994: Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasser und Sediment in der Elbe und Nordsee (Biotox Elbe / Biotox Nordsee II) - Statusseminar am 7. Januar 1994. Berichte des Zentrums für Meeres- und Klimaforschung - Reihe E, 7, Hamburg, 151 pp.

Karrasch, H., 1988: Umweltprobleme des Oberrheingebietes ausgewählte Fallstudien. Geograficy Casopsis, 44: 137-167.

Katzenellenbogen, B.S., Bhardwaj, B., Fang, H., Ince, B.A., Pakdel, F., Reese, J.C., Schodin, D. & Wrenn, C.K., 1993: Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analysis using mammalian and yeast systems. J. Steroid Biochem., 47(1-6): 39-48.

Kemble, N.E., Brumbaugh, W.G., Brunson, E.L. & Dwyer, F.J., 1994: Toxicity of metal-contaminated sediments from the upper Clark Fork River, Montana, to aquatic invertebrates and fish in laboratory exposures. Environ. Toxicol. Chem., 13(12): 1985-1997.

Kennedy, S.W., Lorenzen, A., Jones, S.P., Hahn, M.E. & Stegeman, J.J., 1996: Cytochrome P4501A induction in avian hepatocyte cultures: a promising approach for predicting the sensitivity of avian species to toxic effects of halogenated aromatic hydrocarbons. Toxicol. Appl. Pharmacol., 141(1): 214-30.

Keppler, F., Eiden, R., Niedan, V., Pracht, J. & Schöler, H.F., 2000: Halocarbons produced by natural oxidation processes during degradation of organic matter. Nature, 403: 298-301.

Kern, U., 1997: Transport von Schweb- und Schadstoffen in staugeregelten Fließgewässern am Beispiel des Neckars. Mitteilungen des Institutes für Wasserbau, 93. Universität Stuttgart: 1-209.

Kern, U., Haag, I., Schürlein, V., Holzwarth, M. & Westrich, B., 1999: Ein Strömungskanal zur Ermittlung der tiefenabhängigen Erosionsstabilität von Gewässersedimenten: das SETEG-System. Wasserwirtschaft, 89: 72-77.

Kern, U. & Westrich, B., 1995: Sediment contamination by heavy metals in a lock regulated section of the river Neckar. Marine and Freshwater Res, 46: 101-106.

Kern, U. & Westrich, B., 1996: Sediment dynamics in a lock-regulated section of the Neckar river, Germany. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol., 47: 455-460.

Kern, U. & Westrich, B., 1997: Sediment budget analysis for river reservoirs. Water, Air and Soil Pollution, 99: 105-112.

Kern, U., Westrich, B., Kern, R. & Erdinger, L., 1996: Schwermetallbelastung des Neckars bei Lauffen während signifikanter Hochwasserereignisse, Jahrestagung der Fachgruppe Wasserchemie, pp. P15 : 1-3.

Khim, J.S., Kannan, K., Villeneuve, D.L., Koh, C.H. & Giesy, J.P., 1999a: Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 1. Instrumental analysis. Environ. Sci. & Technol. , 33(23): 4199-4205.

Khim, J.S., Villeneuve, D.L., Kannan, K., Koh, C.H. & Giesy, J.P., 1999b: Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 2. *In vitro* gene expression assays. Environ. Sci. & Technol., 33(23): 4206-4211.

Khim, J.S., Villeneuve, D.L., Kannan, K., Lee, K.T., Snyder, S.A., Koh, C.H. & Giesy, J.P., 1999c: Alkylphenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, and organochlorines in sediment from Lake Shihwa, Korea: Instrumental and bioanalytical characterization. Environ. Toxicol. Chem., 18(11): 2424-2432.

Klausnitzer, B., 1996: Käfer im und am Wasser, 2. Auflage. Die Neue Brehm-Bücherei, 567. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 200 pp.

Klee, O., 1993: Wasser untersuchen - Einfache Analysenmethoden und Beurteilungskriterien. Quelle und Meyer, Heidelberg - Wiesbaden, 245 pp.

Kleman, M. & Gustafsson, J.A., 1996: Interactions of procarcinogenic heterocyclic amines and indolocarbazoles with the dioxin receptor. Biological Chemistry, 377(11): 741-762.

Knörr, S. (2000): Life Cycle-Untersuchungen am Medaka (*Oryzias latipes*). Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg. Heidelberg.

Kocan, R.M., Sabo, K.M. & Landolt, M.L., 1985: Cytotoxicity / Genotoxicity: The Application of Cell Culture Techniques to The Measurement of Marine Sediment Pollution. Aquatic Toxicol., 6: 165-177.

Köck, G., 1996. Die toxische Wirkung von Schwermetallen auf Fische. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie. ecomed, Landsberg am Lech, pp. 3-37.

Koistinen, J., Soimasuo, M., Tukia, K., Oikari, A., Blankenship, A. & Giesy, J.P., 1998: Induction of

EROD activity in HEPA-1 mouse hepatoma cells and estrogenicity in MCF-7 human breast cancer cells by extracts of pulp mill effluents, sludge, and sediment exposed to effluents. Environ. Toxicol. Chem., 17(8): 1499-1507.

Korner, W., Bolz, U., Sussmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. & Hagenmaier, H., 2000: Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. Chemosphere, 40(9-11): 1131-1142.

Kraut, K.H. & Bondareva, O., 2000: Anwendung von Flockungsverfahren bei der Regenwasserbehandlung. Berichtreihe BWPLUS. Online unter http://bwplus.fzk.de/, 47: 13.

Krebs, F., 1988: Der pT-Wert: Ein gewässertoxikologischer Klassifizierungsmaßstab. GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium(32): 293-296.

Krebs, F., 1999. Ökotoxikologische Klassifizierung von Sedimenten mit Hilfe der pT-Wert-Methode. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 297-303.

Krieger, H. & Dietrich, D., 1999: SWTP effluents: embryotoxicity in zebrafish and xenopus embryos and salmonid E-receptors binding activity, Fischnetzseminar, Winterthur.

Krishnan, V. & Safe, S., 1993: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. Toxicol. Appl. Pharmacol., 120(1): 55-61.

Kryzer, D., 1991: Die Bedeutung anthropogener Einflüsse auf den Chemismus von Oberflächengewässern am Beispiel der Elsenz, Kraichgau. Diplomarbeit am Geographischen Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg.

Küchler, T., Wenzel, A., Fromme, H. & Otto, T., 2001: Occurence of natural and synthetic estrogens in the environment. Chemical and biological analysis. In preparation.

Kwan, K.K. & Dukta, B.J., 1990: Simple two-step sediment extraction procedure for the use in genotoxicity and toxicity. Tox. Assess, 5: 395-404.

Kwon, C.S., Grose, K.R., Riby, J., Chen, Y.H. & Bjeldanes, L.F., 1994: *In vivo* production and enzyme-inducing activity of indole[3,2-b] carbazole. J. of Agr. and Food Chem., 42(11): 2536-2540.

La Point, T.W. & Fairchild, J.F., 1992 : Evaluation of sediment contaminant toxicity: the use of freshwater community structure. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton, pp. 87-110.

Landel, C.C., Kushner, P.J. & Greene, G.L., 1995: Estrogen receptor accesory proteins: effects on receptor-DNA interactions. Environ. Health Perspect., 103: 23-28.

Landolt, M.L. & Kocan, R.M., 1984: Lethal and sublethal effects of marine sediment extracts on fish cells and chromosomes. Helgoländer Meeresuntersuchungen, 37: 479-491.

Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. & Nagel, R., 1995: Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere, 30(11): 2087-2102.

La Rocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Iacovella, N., Rodriguez, F., TurrioBaldassarri, L. & di Domenico, A., 1996: PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. Ecotox. Environ. Safety, 33(3): 236-245.

LAWA, 1998: Berurteilung der Wasserbeschaffenheit von Fließgewässern in der Bundesrepublik Deutschland - Chemische Gewässergüteklassifikation, LAWA-Arbeitskreis "Zielvorgaben" in Zusammenarbeit mit LAWA-Arbeitskreis "Quantitative Hydrologie der Fließgewässer", Berlin.

Lee, L.E., Clemons, J.H., Bechtel, D.G., Caldwell, S.J., Han, K.B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D. & Bols, N.C., 1993: Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome p450-dependent monooxygenase activity. Cell Biol. and Toxicol., 9(3): 279-294.

Legler, J., 2001: Development and application of *in vitro* and *in vivo* reporter gene assays for the assessment of (xeno-)estrogenic compounds in the aquatic environment, PhD-Thesis Wageningen, Niederlanden, 132 pp.

Legrand, C., 1992: Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. J. Biotechnol., 25: 231-243.

Lenz, D., 1991 : In vitro-Zytotoxizitätsuntersuchungen an der R1-Zellinie aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe, Karlsruhe.

Leppanen, C.J., Blanner, P.M., Allan, R.S., Benson, W.H. & Maier, K.J., 1998: Using a triad approach in the assessment of hazardous waste site leaching from a superfund site to an adjacent stream. Environ. Toxicol. Chem., 17(10): 2106-2113.

Leslie, H.A., Pavluk, T.I., de Vaate, A. & Kraak, M.H.S., 1999: Triad assessment of the impact of Cr Pollution on macrozoobenthos in the Chusovaya river (Russia), Annual European Meeting of the Society of Environmental Toxicology, Leipzig.

Letzel, T., Rosenberg, E., Wissiack, R., Grasserbauer, M. & Niessner, R., 1999: Separation and identification of polar degradation products of benzo[a]pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization- mass spectrometry

after optimized column chromatographic clean-up. J Chromatogr A, 855(2): 501-14.

Lewtas, J., 1988: Genotoxicity of complex mixtures: strategies for the identification and comparative assessment of airborne mutagens and carcinogens from combustion sources. Fundam. Appl. Toxicol., 10(4): 571-89.

LfU, 1994: (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg) Hochwasser Dezember 1993. Handbuch Wasser 2, Karlsruhe, 58 pp.

LfU, 1995: Dioxine in Böden Baden-Württembergs. http://www.uvm.baden-wuerttemberg.de/xfaweb/.

LfU, 1996: (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg) Schadstofftransport bei Hochwasser - Neckar, Rhein und Donau im Januar 1995. Handbuch Wasser 2, Karlsruhe, 65.

LfU, 1997: Umweltdaten 1995/96. Ministerium für Umwelt und Verkehr und Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg., Karlsruhe, 272 pp.

LfU, 1998: Jahresdatenbankkatalog 1997. CD-ROM.

LfU, 2000: Das Hochwasser vom Oktober/November 1998 in Baden-Wuerttemberg. Serie: Oberirdische Gewässer/Gewässerökologie.

LfU, 1992: Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung-Arbeitsanleitung, Handbuch Wasser 2, Karlsruhe, Loseblattsammlung.

Liess, M. & Schulz, R., 1997: Ökotoxikologische Bewertung von Pflanzenschutzmittel-Einträgen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen in Fließgewässer. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie. ecomed, Landsberg am Lech, pp. 3-44.

Lindegaard, C., 1995: Classification of water bodies and pollution. In: P.D. Armitage, P.S. Cranston und L.C.V. Pinder (Editors), The chironomidae - Biology and ecology of non-biting midges. Chapman and Hall, London, pp. 385-404.

Lindström-Seppa, P., Huuskonen, S., Kotelevtsev, S., Mikkelson, P., Raanen, T., Stepanova, L. & Hanninen, O., 1998: Toxicity and mutagenicity of waste waters from Baikalsk Pulp and Paper Mill: Evaluation of pollutant contamination in Lake Baikal. Mar. Environ. Res., 46(1-5): 273-277.

Liß, W., 1997: Vergleich mikrobieller Biotests zur ökotoxikologischen Bewertung kontaminierter Sedimente unter Berücksichtigung der Wirkpfade von Schadstoffen. Fortschritt-Berichte, Reihe 15 - Umwelttechnik, 176. VDI-Verlag, Düsseldorf, 163 pp.

Liß, W. & Ahlf, W., 1997: Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. Ecotox. Environ. Safety, 36(2): 140-147.

Liu, D., 1989: A rapid and simple biochemical test for direct determination of chemical toxicity. Tox. Assess., 4: 399-404.

Long, E.R., 2000a: Degraded sediment quality in US estuaries: A review of magnitude and ecological implications. Ecolog. Appl., 10(2): 338-349.

Long, E.R., 2000b: Spatial extent of sediment toxicity in US estuaries and marine bays. Environ. Monitoring Assess., 64(1): 391-407.

Luckenbach, T., Triebskorn, R., Müller, E. & Oberemm, A., 1999: Untersuchungen zur Wirkung anthropogener Gewässerbelastungen auf die Entwicklung von Bachforellen (*Salmo trutta fario* L.). In: J. Oehlmann und B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 399-408.

Lutz, I. & Kloas, W., 1999: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci. Tot. Environ., 225(1-2): 49-57.

Maaß, V., Schmidt, C., Lüschow, R. & Leitz, T., 1997: Sedimentuntersuchungen im Hamburger Hafen 1994/95. Ergebnisse aus dem Baggergutuntersuchungsprogramm, Heft 6. Stadt Hamburg, Wirtschaftsbehörde, Strom- und Hafenbau, Hamburg, 149 pp.

Machala, M., Matlova, L., Svoboda, I. & Nezveda, K., 1996: Induction effects of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and other widespread aromatic environmental pollutants on microsomal monooxygenase activities in chick embryo liver. Arch Toxicol, 70(6): 362-7.

Machala, M., Vonrácek, J., Bláha, L., Staffová, K., Kozubík, A., Hofmanová, J., Minksová, K., Cupr, P., Hrdlicka, A., Neca, J., Ulrich, R. & Holoubek, I., 1998: Cellular and biochemical indices for *in vitro* evaluation of toxicity of organic extracts from river sediments, Jahrestagung der SETAC-Europe, Bordeaux, pp. 3C/P36.

Mädler, K., 1992: Untersuchungen zum Makrozoobenthon und Fischbestand im sächsischen Bereich der Elbe (Epipotamal). In: L. Karbe, K. Mädler und B. Janský (Editors), Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasser und Sediment in Elbe und Nordsee - Statusseminar zum Biotox-Programm. Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung der Universität Hamburg, Hamburg, pp. 69.

Maltby, L., Boxall, A.B.A., Forrow, D.M., Calow, P. & Betton, C.I., 1995a: The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 2. Identifying major toxicants. Environ. Tox. Chem., 14(6): 1093-1101.

Maltby, L., Forrow, D.M., Boxall, A.B.A., Calow, P. & Betton, C.I., 1995b: The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 1. Field study. Environ. Tox. Chem., 14(6): 1079-1092.

Maron, D.M. & Ames, B.N., 1983: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mut. Res., 113: 173-215.

Martin, N., Schuster, I. & Peiffer, S., 1996: Two experimental methods to determine the speciation

of cadmium in sediment from the river Neckar. Acta hydrochim. hydrobiol., 24(2): 68-76.

Maruoka, S., Yamanaka, S. & Yamamoto, Y., 1986: Isolation of mutagenic components by high-performance liquid chromatography from XAD extract of water from the Nishitakase river, Kyoto City, Japan. Sci. Tot. Environ., 57: 29-38.

Marvin, C.H., Lundrigan, J.A., Carry, B.E.M. & Bryant, D.W., 1995: Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal tar contaminated sediment. Environ. Tox. Chem., 14(12): 2059-2066.

Marvin, C.H., McCarry, B.E., Villella, J., Allan, L.M. & Bryant, D.W., 2000a: Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: Bioassay-directed fractionation using the Ames *Salmonella*/microsome assay. Chemosphere, 41(7): 989-999.

Marvin, C.H., McCarry, B.E., Villella, J., Allan, L.M. & Bryant, D.W., 2000b: Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of genotoxic contamination in Hamilton Harbour. Part I: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and thia-arene compounds. Chemosphere, 41(7): 979-988.

Matlova, L., Machala, M., Nezveda, K., Granatova, M. & Nevorankova, Z., 1995: Biochemical screening of highly toxic aromatic contaminants in river sediment and comparison of sensitivity of biological model systems. Chemosphere, 30(7): 1363-71.

Matta, M.B., Cairncross, C. & Kocan, R.M., 1997: Effects of a polychlorinated biphenyl metabolite on early life stage survival of two species of trout. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 59: 146-151.

Matthiessen, P. & Sumpter, J.P., 1998: Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (Editors), Fish ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, pp. 319-335.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. & Collins, A., 1993: The single cell gel electrophoresis (comet assay): a European review. Mutat. Res., 288: 47-63.

Mersch-Sundermann, V., Dickgiesser, N., Kotter, K. & Harre, M., 1988: The mutagenicity of surface water, waste water and drinking water in the Rhine-Neckar region in the *Salmonella* microsome test (Ames Test). Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. B, 185(4-5): 397-410.

Metcalfe, C.D., Balch, G.C., Cairns, V.W., Fitzsimons, J.D. & Dunn, B.P., 1990: Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western Lake Ontario. Sci Total Environ, 94(1-2): 125-41.

Miltenburger, H.G., 1997: Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben BEO/ 21 013032 B: Validierung eines Zytotoxizitätstests als Ersatzmethode für den Fischtest nach DIN 38412, Teil 31: Phasen I und II: Im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

Mitchel, D.B., Santone, K.S. & Acosta, D., 1980: Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. J. Tissue Cult. Meth., 6(3 & 4): 113-116.

Moller-Pillot, H.K.M., 1984: De Larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera) (Inleiding Tanypodinae & Chironomidae), 3. Auflage. Nederlandse Faunistische Mededelingen 1 A (Stichting European - Invertebrate Survey Nederland, Leiden, 211-212 pp.

Monarca, S., Pasquini, P. & Arcaleni, P., 1995: Detection of mutagens in unconcentrated and concentrated drinking water supplies before and after treatment using a microscale fluctation test. Chemosphere, 14: 1069-1080.

Mosmann, T., 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65: 55-63.

Mudroch, A. & MacKnight, S.D., 1994a: Bottom sediment sampling. In: A. Mudroch und S.D. MacKnight (Editors), Handbook of techniques for aquatic sediments sampling. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 29-96.

Mudroch, A. & MacKnight, S.D., 1994b: Handbook of techniques for aquatic sediments sampling. Lewis Publishers, Boca Raton, 236 pp.

Müller, G., 1991: Die Ergebnisse der Untersuchungen der Neckarsedimente in den letzten 20 Jahren - Chronologie der Schwermetallbelastung., 3: 7-8.

Müller, G., 1992: Untersuchung der Neckar-Altsedimente und Bewertung ihres möglichen Einflusses auf die Gewässergüte und auf das Grundwasser, Institut für Sedimentforschung, Heidelberg.

Müller, G., 1993: Altsedimente in den Stauhaltungen des Neckars.

Müller, G. & Gastner, M., 1971: The "Karbonatbombe", a simple device for the determination of carbonate content in sediments, soils and other materials. Neues Jahrbuch für Mineralogie: 466-469.

Müller, G., Yahaya, A. & Gentner, P., 1993: Die Schwermetallbelastung der Sedimente des Neckars und seiner Zuflüsse: Bestandsaufnahme 1990 und Vergleich mit früheren Untersuchungen. Heidelberger Geowiss. Abh., 69: 1-91.

Munoz, M.J., Castano, A., Blazquez, T., Vega, M., Carbonell, G., Ortiz, J.A., Carballo, M. & Tarazona, J.V., 1994: Toxicity identification evaluations for the investigation of fish kills: a case study. Chemosphere, 29(1): 55-61.

Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., vandeGuchte, C. & Brouwer, A., 1996: Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A

novel *in vitro* bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. Fundamental And Applied Toxicology. Sep, 33(1): 149-160.

Nagel, R. & Isberner, K., 1998. Testing of chemicals with fish - a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (Editors), Fish Ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, pp. 337-352.

Navas, J.M. & Segner, H., 2000: Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. Aquatic Toxicol, 51(1): 79-92.

Nehls, S., Brack, W., Segner, H. & Schüürmann, G., 1998: Identification of genotoxic fractions of a contaminated sediment using the COMET-Assay and the SOS Chromotest, 8th annual Meeting of SETAC-Europe, Poster 3I/P016.

Neumann-Hensel, H., Ricking, M., Hollert, H. & Ahlf, W., 2000a: Empfehlung zur Bewertung von Sedimentbelastungen. Bodenschutz, 3: 111-117.

Neumann-Hensel, H., Ricking, M., Hollert, H., Ahlf, W., unter Mitarbeit von: u.M., Lay, J.-P. & Terytze, K., 2000b: Handlungsanleitung zur Gewässerbeurteilung anhand der Sedimentkontamination. Bericht an die Deutsche Bundesstiftung Umwelt und das Umweltbundesamt.

Nilsson, U.L. & Ostman, C.E., 1993: Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons: Method of analysis and their occurrence in urban air. Environ. Sci. Technol, 27(9): 1826-1831.

Norrgren, L., Brunström, B., Engwall, M. & Mwase, M., 1998: Biological impact of lipophilic sediment extracts from the Kafue River, Sambia, in microinjected rainbow trout yolk-sac fry and chick embryo livers exposed *in vitro*. Aquat. Ecosys. Health Manag., 1: 91-99.

OECD, 1997: OECD-Guidline 471- Bacterial reverse mutation test. Draft.

OECD, 2001a: 14-day fish assay for identification of potential endocrine dirsrupting chemicals. Draft proposal for a new OECD guideline: 15.

OECD, 2001b: Short-term reproduction test with Fathead Minnow for identification of endocrine disrupting chemicals. Draft proposal for a new OECD guideline: 15.

Oehme, M., Mano, S. & Mikalsen, A., 1987: Formation and presence of polyhalogenated and polycyclic compounds in the emissions of small and large-scale municipal waste incinerators. Chemosphere, 16(1): 143-153.

Oinonen, T., Saarikoski, S., Husgafvel-Pursiainen, A. & Lindros, K., 1994: Pretranslational induction of cytochrome P4501A enzymes by beta-naphtoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones. Biochem. Pharmacol., 48: 2189-2197.

Olsson, A. & Bergman, A., 1995: A new persistent contaminant detected in Baltic wildlife: Bis(4-chlorophenyl)sulfone. Ambio, 24: 119-123.

Olsson, A., Vitinsh, M., Plikshs, M. & Bergman, A., 1999a: Halogenated environmental contaminants in perch (*Perca fluviatilis*) from Latvian coastal areas. Sci. Tot. Environ., 239(1-3): 19-30.

Olsson, P.E., Westerlund, L., Teh, S.J., Billsson, K., Berg, A.H., Tysklind, M., Nilsson, J., Eriksson, L.O. & Hinton, D.E., 1999b: Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Ambio, 28(1): 100-106.

Östman, C. & Nilsson, U., 1992: Coupled Lc-Gc-Ms for Online Cleanup, Separation, and Identification of Chlorinated Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons at Picogram Levels in Urban Air. HRC-J. of High Resolut. Chrom. 15(11): 745-750.

Otto, D., Seppä, P.L. & Sen, C., 1994: Cytochrome P450 - dependent enzymes and oxidant-mediated responses in rainbow trout exposed to contaminated sediments. Ecotoxicol. Environ. Safety, 27: 265-280.

Oulmi, Y.B., T., 1996: Toxicity of 4-chloroaniline in early life-stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*): I. Cytopathology of liver and kidney after microinjection. Arch. Environ. Cont. Toxicol., 30: 390-402.

Paine, M.D., Chapman, P.M., Allard, P.J., Murdoch, M.H. & Minifie, D., 1996: Limited bioavailability of sediment PAH near an aluminum smelter: Contamination does not equal effects. Environ. Toxicol. Chem., 15(11): 2003-2018.

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. & Vrzoc, M., 1995: Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Environ. Mol. Mutagenesis, 26(4): 345-356.

Papoulias, D.M. & Buckler, D.R., 1996: Mutagenicity of Great Lakes sediments. J. of Great Lakes Res., 22(3): 591-601.

Papoulias, D.M., Buckler, D.R. & Tillitt, D.E., 1996: Optimization of the Ames/*Salmonella* mutagenicity assay for use with extracts of aquatic sediments. J. of Great Lakes Res., 22(3): 584-590.

Pardos, M. & Blaise, C., 1999: Assessment of toxicity and genotoxicity of hydrophobic organic compounds in wastewater. Environ. Toxicol., 14(2): 241-247.

Parker, W.R., 1997: On the characterisation of cohesive sediment for transport modelling. In: B. Neville (Editor), Cohesive sediments. Willey, Chichester, pp. 175-186.

Pascoe, G.A., Blanchet, R.J., Linder, G., Palawski, D., Brumbaugh, E.G., Canfield, T.J., Kemble, N.E., Ingersoll, C.G., Farag, A. & DalSoglio, J.A., 1994: Characterization of ecological risks at the milltown resevoir-Clark Fork river sediments superfund site, Montana. Environ. Toxicol. Chem, 13(12): 2043-2058.

Pascoe, G.A. & DalSoglio, J.A., 1994: Planning and implementations of a comprehensive ecological risk assessment at the Milltown reservoir-Clark Fork River superfund site, Montana. Environ. Toxicol. Chem., 13(12): 1943-1956.

Pawlowski, S., 1998: Nachweis (xeno-)östrogener Aktivität von Umweltchemikalien in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) durch Detektion der Vitellogenin-mRNA. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, 89 pp.

Pawlowski, S., Islinger, M., Hollert, H., Sägesser, M., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 2000: Endocrine activity in municipal waste water effluent samples of Switzerland assessed by vitellogenin-mRNA induction in isolated hepatocytes from male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Proceedings - Annual Meeting of the Society of Environmental Chemistry and Toxicology (World) in Brighton.

Pawlowski, S., Islinger, M., Volkl, A. & Braunbeck, T., 2000: Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18 degrees C. Toxicol. In Vitro, 14(6): 531-40.

Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D. & Porter, E.L., 1987: Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem .Physiol. C., 86(2): 233-45.

Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y. & Pakdel, F., 1997: Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. J. Mol. Endocrinol., 19(3): 321-35.

Pilz, K., 1999: Endokrin wirksame Substanzen im Oberflächenwasser, Abwasser und Sediment. Online unter: http://www.berlin.de/Land/Sen ArbSozFrau/BBGes/itox/bericht1/1ac.htm. Institut für Umweltanalytik und Humantoxikologie (ITox).

Pinter, I., 1991: Aktueller Gütezustand des Neckars - Perspektiven. In: G. Müller (Editor), Neckar-Umwelt-Symposium Oktober in Heidelberg. Heidelberger Geowiss. Abh., pp. 7-8 oder 62-73.

Pitsch, T., 1993: Zur Larvalentwicklung, Faunistik und Ökologie mitteleuropäischer Fließwasser-Köcherfliegen (Insecta, Trichoptera). Landschaftsentwicklung und Umweltforschung – Schriftenreihe des Fachbereiches Landschaftsentwicklung, Berlin, 317 pp.

Poli, P., Buschini, A., Restivo, F.M., Ficarelli, A., Cassoni, F., Ferrero, I. & Rossi, C., 1999: Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. Mutagenesis, 14(6): 547-56.

Porte, C. & Escartin, E., 1998: Cytochrome P450 system in the hepatopancreas of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 121(1- 3): 333-8.

Power, E.A. & Chapman, P.M., 1992. Assessing sediment quality. In: G.A. Burton (Editor), Sediment toxicity assessment. Lewis-Publishers, Boca Raton,, pp. 1-18.

Precht, M. & Kraft, R., 1992: Bio - Statistik 1. R. Oldenburger Verlag, München - Wien, 290 pp.

Prosi, F. & Segner, H., 1986: Biotestverfahren zur Abschaetzung der Bioverfuegbarkeit von Schwermetallen in Sedimenten des Neckars. Neckar-Umwelt-Symposium 22 -23.Oktober Heidelberg, 2. Heidelberg, 96-101 pp.

Prunescu-Arion, E. & Elian, L., 1965: Beitrag zum Studium der Fauna und der Ökologie der Gammariden im rumänischen Abschnitt der Donau. Arch. Hydrobiol Suppl. XX (Donauforschung II): 65-79.

Pudenz, S., Brüggemann, R., Luther, B., Kaune, A. & Kreims, K., 2000: An algebraic / graphical tool to compare ecosystems with respect to their pollution V: cluster analysis and Hasse diagrams. Chemosphere, 40: 1373-1382.

Quentin, K.E., Alexander, I. & Eichelsdörfer, D., 1988: Untersuchung und Beurteilung von Trink- und Schwimmbadwasser. Springer, Heidelberg.

Rao, S.S., Kwan, K.K. & Dukta, B.J., 1990: Toxicity associated with fluvial suspended particulates. Ger. J. Appl. Zool., 78: 78.

Rechenberg, B., 2000: Bewertung der Sedimentqualität mit Hilfe von Biotests mit Sedimentorganismen. In: BfG (Hrsg.), Wirkungsbezogene Sedimentuntersuchungen zur Ableitung von Qualitätsmerkmalen und Handlungsempfehlungen. BfG-Veranstaltungen, Bundesanstalt für Gewässerkunde - Außenstelle Berlin, pp. 1-3.

Reemtsma, T., Fiehn, O. & Jekel, M., 1999: A modified method for the analysis of organics in Industrial wastewater as directed by their toxicity to *Vibrio fischeri*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 363(8): 771-776.

Regierungspräsidium Stuttgart, Abteilung V., 1993: Altsedimente in den Stauhaltungen des Neckars, Regierungspräsidium, Stuttgart.

Ren, L., Lattier, D. & Lech, J.J., 1996: Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new estrogenic probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56(2): 287-294.

Reynoldson, T.B., Bailey, R.C., Day, K.E. & Norris, R.H., 1995: Biological guidelines for freshwater sediment based on BEnthic Assessment of SedimenT (the BEAST) using a multivariate approach for predicting biological state. Australien Journal of Ecology: 1-30.

Reynoldson, T.B. & Day, K.E., 1993: Freshwater sediments. In: P. Calow (Editor), Handbook of Ecotoxicology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 83-100.

Richter, C.A., Tieber, V.L., Denison, M.S. & Giesy, J.P., 1997: An *in vitro* rainbow trout cell bioassay for aryl hydrocarbon receptor-mediated toxins. Environ. Toxicol. Chem., 16(3): 543-550.

Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B. & Rahmani, R., 2001: Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. Aquat. Toxicol., 53(1): 65-76.

Robards, K., Haddad, P.R. & Jackson, P.E., 1994: Principles and practice of modern chromatographic methods. Academic Press, London, 418-423 pp.

Rönnpagel, K., Janßen, E. & Ahlf, W., 1998: Asking for the indicator function of bioassays evaluating soil contamination: Are bioassay results reasonable surrogates of effects on soil microflora? Chemosphere, 36(6): 1291-1304.

Rönnpagel, K., Liß, W. & Ahlf, W., 1995: Microbial bioassays to assess the toxicity of solid associated contaminants. Ecotox. Environ. Safety, 31: 99-103.

Rönnpagel, K., Neumann-Hensel, H. & Ahlf, W., 1999: Kontakttest für Feststoffe mit *Arthrobacter globiformis*. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 252-255.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. & Sumpter, J.P., 1998: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. Environ. Sci. & Technol, 32(11): 1559-1565.

Rudel, R.A., Melly, S.J., Geno, P.W., Sun, G. & Brody, J.G., 1998: Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. Environ. Sci. Technol., 32(7): 861-869.

Rudolf, M., 2000: Die Bedeutung unterschiedlichen Expositionswege für die Wirkung von Umweltgiften auf die Embryonalentwicklung von *Danio rerio*. Staatsexamensarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 175 pp.

Rump, H.H. & Krist, H., 1992: Laborhandbuch für die Untersuchung von Wasser, Abwasser und Boden. VCH-Verlag, Weinheim, 206 pp.

Sabbah, M., Radanyi, C., Redeuilh, G. & Baulieu, E.E., 1996: The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to it´s cognate DNA. Biochem. J., 314: 205-213.

Sachs, L., 1992: Angewandte Statistik - Anwendung stochasticher Methoden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 847 pp.

Sachs, L., 1993: Statistische Methoden - Planung und Auswertung. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 312 pp.

Saether, O.A., 1979: Chironomid communities as water quality indicators. Holarctic Ecology, 2: 65-74.

Saito, H. & Shigeoka, T., 1994: Comparative cytotoxicity of chlorophenols to cultured fish cells. Environ. Toxicol. and Chem, 13(10): 1649-1650.

Sallmolloff, M.R., Bell, J., Birkholz, D.A., Webster, G.R.B., Arnott, E.G., Pulak, R. & Madrid, A., 1983: Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments. Environ. Sci. Technol., 17: 329-334.

Salski, A., Fränzle, O. & Kandzia, P., 1996: Introduction - Special Issue Fuzzy logic in ecological modelling. Ecological Modelling, 85(1): 1-2.

Salski, A. & Kandzia, P., 1996: Fuzzy sets and fuzzy logic in ecological modelling. EcoSys, 4: 85-97.

Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H. & Goto, R., 1990: Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water. Mutat Res, 242(4): 313-7.

Schmedtje, U., 1998: Die ökologische Bewertung von Fließgewässern in Bayern, Integrierte ökologische Gewässerbewertung - Inhalte und Möglichkeiten. Münchener Beiträge zur Abwasser, Fischerei- und Flussbiologie. Oldenbourg, München, Wien, pp. 199-215.

Schmedtje, U. & Kohmann, F., 1988: Bestimmungsschlüssel für die Saprobien-DIN-Arten (Makroorganismen), München.

Schmid, P.E., 1993: A key to the larval Chironomidae and their first instars from Austrian Danube region streams and rivers, Part 1 (Diamesinae, Prodiamesinae and Orthocladiinae). In: Federal Institut for Water Quality (Editor), Wasser und Abwasser, Wien, pp. 514.

Schnurstein, A., 2000: Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) – Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring, Doktorarbeit am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg, Heidrlberg. 195 pp.

Schnurstein, A., Froschauer, A., Tischmeyer, A. & Braunbeck, T., 1999: Die Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) zum Nachweis des gentoxischen Potentials von Umweltproben. In: DVWK, U. Kern und B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 274-281.

Schöler, H.F. & Haiber, G., 1997: Bildung und Verbleib natürlicher halogenorganischer Verbindungen in Wasser, Böden und Sedimenten. In: J. Mattschulat (Editor), Geochemie und Umwelt. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 151-159.

Schönborn, W., 1992: Fließgewässerbiologie. Gustav Fischer- Verlag, Stuttgart, 504 pp.

Schrenk, D., Riebniger, D., Till, M., Vetter, S. & Fiedler, H.P., 1999: Tryptanthrins and other tryptophan-derived agonists of the dioxin receptor. Tryptophan, Serotonin and Melatonin, 467: 403-408.

Schrenk-Bergt, C. & Steinberg, C., 1998: Endokrine Substanzen in der aquatischen Umwelt. In: C. Steinberg, H. Bernhardt und H. Klappner (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie Teil Aquatische Ökotoxikologie. Ecomed, Landsberg, pp. 1-55.

Schrenk-Bergt, C. & Steinberg, C., 1999: Endokrine Substanzen - Bedeutung und Wirkmechanismen. In: J. Oehlmann und B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 521-526.

Schulte, A., 1995: Hochwasserabfluß, Sedimentransport und Gerinnebettgestaltung an der Elsenz im Kraichgau, Dissertation. Heidelberger Geographische Arbeiten. Selbstverlag des Geographischen Institutes Heidelberg, Heidelberg, 202 pp.

Schulz, M., Lewald, B., Kohlpoth, M., Rusche, B., Lorenz, K., Unruh, E., Hansen, P.D. & Miltenburger, H.G., 1995: Fischzellinien in der toxikologischen Bewertung von Abwasserproben. Altex, 12(4): 188-195.

Schüürmann, G. & Segner, H., 1994: Wirkungsforschung in der Chemischen Ökotoxikologie. UWSF Z. Umweltchem. Ökotox., 6: 351-358.

Schweder, H., 1992: Neue Indizes für die Bewertung des ökologischen Zustandes von Fließgewässern, abgeleitet aus der Makroinvertebraten-Ernährungstypologie. In: G. Friedrich und J. Lacombe (Editors), Ökologische Bewertung von Fließgewässern. Limnologie aktuell. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 353-377.

Schwoerbel, J., 1986: Methoden der Hydrobiologie - Süßwasserbiologie. UTB - Gustav Fischer, Stuttgart, 301 pp.

Sedlak, E., 1985: Bestimmungsschlüssel für mitteleuropäische Köcherfliegenlarven (Insecta, Trichoptera), Wien, 146 pp.

Segner, H., 1998: Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: T. Braunbeck, D.E. Hinton und B. Streit (Editors), Fish ecotoxicology - Experientia Supplement, Vol. 86. Birkhäuser, Basel/ Switzerland, pp. 1-38.

Segner, H. & Lenz, D., 1993: Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line. Toxic. in Vitro, 7: 537-540.

Servos, M.R., 1999: Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. Wat. Qual. Res. Journal of Canada, 34(1): 123-177.

Shin, P.K.S. & Fong, K.Y.S., 1999: Mutiple discriminant analysis of marine sediment data. Mar. Poll. Bull., 39: 285-294.

Siebert, I., 1999: Untersuchungen zum ökotoxikologischen Gefährdungspotential kleiner Fließgewässer im Raum Heidelberg mit Hilfe von *In vitro*-Biotests, chemischen Analysen und Aufnahmen des Makrozoobenthos. Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg, 130 pp.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L., 1988: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experiment. Cell Res., 175: 184-191.

Smeets, J.M., van Holsteijn, I., Giesy, J.P. & van den Berg, M., 1999: The anti-estrogenicity of Ah receptor agonists in carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. Toxicol. Sci., 52(2): 178-88.

Snow, E.T., 1992: Metal carcinogenesis: mechanistic implications. Pharmacol. Ther., 53(1): 31-65.

Song, Y. & Müller, G., 1993: Freshwater sediments: Sinks and sources of bromine. Naturwissenschaften, 80: 558-560.

Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. & Olea Serrano, F., 1995: The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. Environ. Health Perspect., 103(7): 113-122.

Sram, R.J., Binkova, B., Rossner, P., Rubes, J., Topinka, J. & Dejmek, J., 1999: Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. Mutat. Res., 428(1-2): 203-15.

Staffová, K., Kannan, K., Giesy, J.P., Holoubek, I., Ansorgova, A. & M. Machala., 1998: In *vitro* bioassays in assessment of AhR and ER-mediated activity of samples from rivers in the Czech Republic, Jahrestagung der SETAC-Europe, Bordeaux, pp. 3C/P011.

Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O´Block, S.T., Branson, D.R. & Harris, L.R., 1998: Bisphenol A: A Review of the Environmental Fate, Effects, and Exposure. Manuskript.

Stebbing, A.R.D., Dethlefsen, V., Addison, R.F., Carr, M., Chapman, P.M., Cofino, W.P., Heip, C., Karbe, L., Moore, M.N. & Vethaak, A.D., 1992: Overall summary and some conclusions from the Bremerhaven Workshop. Mar. Ecol. Progress Ser., 91: 323-329.

Stegeman, J.J. & Kloepper-Sams, P.J., 1987: Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals. Env. Health Persp., 71: 87-95.

Steinberg, C., 1999: Vorwort zur 8. Ergänzungslieferung. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie, Loseblattsammlung, 8. Ergänzungslieferung. Ecomed-Verlag, pp. 1-2.

Steinberg, C., Brüggemann, R., Hartmann, A., Heller, W., Kirchner, M., Lienert, D., Müller, K., Pestlin,

G., Scheunert, I., Seiler, K.-P., Ernst, D., Spieser, O. & Klein, J., 1996: Wirkungstests. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper und R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie. ecomed, Landsberg am Lech, pp. 1-67.

Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M. & Chadwick, D.B., 1998: DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. Mutat. Res., 399(1): 65-85.

Streit, B., unter Mitarbeit von T. Braunbeck, 1994: Lexikon Ökotoxikologie. VCH, Weinheim, 1-896 pp.

Strmac, M., 1999: Ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in kleinen Fließgewässern mit Hilfe von Zellkulturen sowie Embryonen und Larven des Zebrabärblings (*Danio rerio*). Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg: 216 pp.

Strmac, M. & Braunbeck, T., 2000: Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems. Toxicol In Vitro, 14(4): 361-77.

Studemann, D., Landolt, P., Sartori, M., Hefti, D. & Tomka, I., 1992: Ephemeroptera, Insecta Helvetica, 175 pp.

Sturm, R. & Gandraß, J., 1988: Verhalten von schwerflüchtigen Chlorkohlenwasserstoffen an Schwebstoffen des Elbe-Ästuars. Vom Wasser, 70: 265-280.

Sturm, R., Knauth, H.D., Reinhardt, K.H. & Gandra, J., 1986: Chlorkohlenwasserstoff - Verteilung in Sedimenten und Schwebstoffen der Elbe. Vom Wasser, 67: 23-38.

Suedel, B.C. & Rodgers, J.H.J., 1994: Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to particle-size distribution and organic matter content of formulated and natural freshwater sediments. Environ. Toxicol. Chem, 13(10): 1639-1648.

Sumpter, J.P. & Jobling, S., 1995: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Perspect., 103 (Suppl 7).

Sundvall, A., Maklund, H. & Rannug, U., 1984: The mutagenicity on *Salmonella typhimurium* of nitrobenzoic acids and other wastewater components generated in the production of nitrobenzoic acids and nitrotoluenes. Mut. Res., 137(71-78).

Suter, G.W., 1997: Overview of the ecological risk assessment framework. In: C.G. Ingersoll, T. Dillon und G.R. Biddinger (Editors), Ecological risk assessment of contaminated sediments. SETAC-Press, Pensacola, Florida, pp. 1-6.

Symader, W., 1988: Zur Problematik der Frachtermittlung. Vom Wasser, 71: 145-161.

Symader, W., Bierl, R. & Strunk, N., 1991: Die zeitliche Dynamik des Schwebstofftransportes und seine Bedeutung für die Gewässerbeschaffenheit. Vom Wasser, 77: 159-169.

Svenson, A., Beckmann, E., Remberger & Ricking, M. (2000) Elemental sulfur toxicity in sediments. Poster bei der Jahrestagung der SETAC GLB in Hamburg-Harburg.

Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O. & Singh, N.P., 1990: The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: C.M. Wittmer et al. (Editors), Biological Reactive Intermediates IV. Plenum Press, New York, pp. 157-164.

Toftgård, R., Franzén, B., Gustafsson, J.Å. & Löfroth, G., 1985: Characterization of TCDD-receptor ligands present in extracts of urban particulate matter. Environ. Int., 11: 369-374.

Traunspurger, W. & Drews, C., 1996: Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: A review. Hydrobiologia . Aug, 328(3): 215-261.

TrinkwV, 1990. Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe. In: C. Steinberg, W. Calmano, H. Klapper and R.-D. Wilken (Editors), Handbuch Angewandte Limnologie. ecomed, Landsberg am Lech, pp. 1-23.

True, C.J. & Heyward, A.A., 1990: Relationships between Microtox test results, extraction methods, and physical and chemical compositions of marine sediment samples. Tox. Assess., 5: 29-45.

Tyler, C.R. & Routledge, E.J., 1998: Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. Pure and Applied Chemistry, 70(9): 1795-1804.

Urbanski, J.A., 1999: The use of fuzzy sets in the evaluation of the environment of coastal waters. Internat. Journal of Geograh. Inform. Sc., 13(7): 723-730.

Vahl, H.H., 1997: Genotoxizität von Schwebstoffen und Sedimenten aus der Elbe. Berichte des Zentrums für Meeres- und Klimaforschung - Reihe E, 13, Hamburg, 145 pp.

Vahl, H.H., Karbe, L., Prieto-Alamo, M.-J., Pueyo, C. & Westendorf, J., 1995: The use of the *Salmonella* BA9 forward mutation assay in sediment quality assessment: mutagenicity of freshly deposited sediments of the river Elbe. J. of Aquat. Ecosys. Health, 4: 277-283.

Vahl, H.H., Karbe, L. & Westendorf, J., 1997: Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of *Salmonella* microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test. Mut Res, 394(1-3): 81-93.

Van den Berg, M. et al., 1998: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife, EROD. Environ. Health. Perspect., 106(12): 775-92.

Van Beelen, P. & Doelman, P., 1997: Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. Chemosphere, 34(3): 455-499.

Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Smolowitz, R., Woodin, B.R. & Stegeman, J.J., 1992: Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon- contaminated site. Carcinogenesis, 13(3): 505-507.

Vega, M.M., Castano, A., Blazquez, T. & Tarazona, J.V., 1994: Assessing organic toxic pollutants in fish-canning factory effluents using cultured fish cells. Ecotoxicology, 3: 79-88.

Vega, M.M., Fernandez, C., Blazquez, T., Tarazona, J.V. & Castano, A., 1996: Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. Environmental Pollution, 93(2): 135-139.

Vian, L., Vicent, J., Maurin, J., Fabre, I., Giroux, J. & Cano, J.P., 1995: Comparison of three *in vitro* cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. Toxic. in vitro, 9(2): 185-190.

Villeneuve, D.L., Crunkilton, R.L. & DeVita, W.M., 1997: Aryl hydrocarbon receptor-mediated toxic potency of dissolved lipophilic organic contaminants collected from Lincoln Creek, Milwaukee, Wisconsin, USA, to PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*) fish hepatoma cells. Environ. Toxicol. Chem., 16(5): 977-984.

Vogelbein, W.K. & Fournie, J.W., 1994: Ultrastructure of normal and neoplastic exocrine pancreas in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Toxicol Pathol, 22(3): 248-60.

Vogelbein, W.K., Fournie, J.W., Van Veld, P.A. & Huggett, R.J., 1990: Hepatic neoplasms in the mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated site. Cancer Res, 50(18): 5978-86.

Vos, G.J., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. & Vethaak, A.D., 2000: Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. Crit. Rev. in Toxicology, 30(1): 71-133.

Wang, 1999: Porewater toxicity testing: does it make sense? SETAC-Europe News, 10(1): 6-7.

Waringer, J. & Graf, W., 1997: Atlas der österreichischen Köcherfliegenlarven, unter Einschluß der angrenzenden Gebiete. Facultas-Universitäts-Verlag, Wien, 286 pp.

Weishaar, D., Gossrau, E. & Faderl, B., 1975: Normbereiche von alpha-HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substratoptimierten Testansätzen. Med. Welt1975, 26: 387-390.

Wenzel, A., Küchler, T., Henschel, K.P., Schnaak, W., Diedrich, M., Mueller, J.M., 1998: Konzentrationen oestrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien. Forschungsbericht 216 02 011/11, im Auftrag des Umweltbundesamtes, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Berlin.

West, W.R., Smith, P.A., Booth, G.M., Wise, S.A. & Lee, M.L., 1986: Determination of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment from the Black River (Ohio). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15: 241-249.

Westerlund, L., Billsson, K., Andersson, P.L., Tysklind, M. & Olsson, P.E., 2000: Early life-stage mortality in zebrafish (*Danio rerio*) following maternal exposure to polychlorinated biphenyls and estrogen. Environ. Toxicol. Chem., 19(6): 1582-1588.

Westrich, B., 1988: Fluvialer Festofftransport – Auswirkung auf die Morphologie und Bedeutung für die Gewässergüte. Schriftenreihe gwf Wasser Abwasser, 22, 173 pp.

Westrich, B., 1991: Dynamik des Stofftransports in Gestauten Flüssen: Anwendung auf den Neckar. In: G. Müller (Editor), Neckar-Umwelt-Symposium Oktober in Heidelberg. Reihe: Heidelberger Geowiss. Abh., pp. 85-92.

Wetterauer, B., 2001: Estrogene und antiestrogene Wirksamkeit von ausgewählten Umweltproben und Monosubstanzen in Hepatocytenkulturen männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg, Heidelberg.

Whyte, J.J., van den Heuvel, M.R., Clemons, J.H., Huestis, S.Y., Servos, M.R., Dixon, D.G. & Bols, N.C., 1998: Mammalian and teleost cell line bioassay and chemically derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalent concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Superior and Lake Ontario, North America. Environ. Toxicol. Chem., 17(11): 2214-2226.

Wiederholm, T., 1980a: Chironomids as indicators of water quality in swedish lakes. Acta Universitatis Carolinae - Biologica, 1978: 275-283.

Wiederholm, T., 1980b: Use of benthos in lake monitoring. Journal WPCF, 52(3): 537-547.

Wiederholm, T., 1983: chironomidae of the holarctic region, keys and diagnosis, 1, 457 pp.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H. & Steinberg, C., 2000: Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. Ecotoxicol. Environ. Saf., 45(2): 122-31.

Wildhaber, M.L. & Schmitt, C.J., 1998: Indices of benthic community tolerance in contaminated Great Lakes sediments: Relations with sediment contaminant concentrations, sediment toxicity, and the sediment quality triad. Environ. Monit. Assess., 49(1): 23-49.

Wilhelm, F., 1997: Hydrogeographie. Westermann Verlag, Braunschweig, 225 pp.

Wilhm, J.L., 1970: Range of diversity index in benthic macroinvertebrate populations. J. of Water Pollution Control Federation, 42: 221-224.

Winn, N., 2000. Integrierte Untersuchungen von Sedimenten und Schwebstoffen aus dem Einzugs-

gebiet des Neckars mit Hilfe von hydrologischen und chemischen Methoden und mikrobiellen Biotestsystemen. Diplomarbeit am Geographischen Institut der Universität Heidelberg

Winn, N., Hollert, H., Dürr, M., Gratzer, H., Schöler, H.F., Ahlf, W., Karrasch, H. & Braunbeck, T., 1999: Zur Eignung von mikrobiellen Testsystemen für eine integrierte Untersuchung kontaminierter Standorte, Statusseminar "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), Forschungszentrum Karlsruhe.

Wolf, K. & Quimby, M.C., 1962: Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. Science, 135: 1065-1066.

Zabel, E.W. & Peterson, R.E., 1996: TCDD-like activity of 2,3,6,7-tetrachloroxanthene in rainbow trout early life stages and in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). Environ. Toxicol. Chem., 15(12): 2305-2309.

Zadeh, L.A., 1965: Fuzzy sets. Information and Control: 338-353.

Zahn, T., 1995: Akute und subletale Cytotoxizitätstests mit Primärzellkulturen und Dauerzellinien zur Ermittlung der Toxizität akuter und subletaler Dosen von Umweltschadstoffen als Ersatz- und Ergänzungsmethode zum Fischtest. Dissertation, University of Heidelberg, Heidelberg, 218 pp.

Zahn, T., Hauck, C., Holzschuh, J. & Braunbeck, T., 1995: Acute and sublethal toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a novel approach risk assessment for chemicals and chemical mixtures. Zbl. Hyg., 196: 455-479.

Zahn, T., Hollert, H. & Braunbeck, T., 1996: Vergleich der Zytotoxizität von umweltrelevanten Chemikalien auf isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle und S9-supplementierte RTG-2-Zellen. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 89: 332.

Zeiger, E. & Pagano, D.A., 1984: Suppressive effects of chemicals in mixture on the *Salmonella* plate test response in the absence of apparent toxicity. Environ. Mutagen., 6: 683-694.

Zietz, B. & Pfeiffer, H., 2000: Mutagenes Potenzial von Wasser aus Flüssen, Seen und Meeren. gwf – Wasser Abwasser, 141: 164-171.

Zimmer, M. & Ahlf, W., 1994: Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. UBA-Texte 69/94, Umweltbundesamt, Berlin.

Zimmermann, H.-J., Angstenberger, J., Ivens, M., Kasper, C., Lieven, K., Meier, W., Minas, H.-J., Teitscheid, P. & Weber, R., 1995: Datenanalyse – Anwendung von DataEngine mit Fuzzy Technologien und Neuronalen Netzen. Intelligente Technologien. VDI-Verlag, 230 pp.

Zipperle, J., 1997: Untersuchung der gentoxischen Wirkung von Gewässern und Abwässern. In: LfU (Editor). Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, pp. 136.

Zipperle, J. & Deventer, K., 2000: Entwicklung und Erprobung einer Strategie zur Beurteilung der Sedimentbeschaffenheit auf der Basis von Wirktests. In: BfG (Hrsg.), Wirkungsbezogene Sedimentuntersuchungen zur Ableitung von Qualitätsmerkmalen und Handlungsempfehlungen. BfG, Berlin, pp. 9-14.

11 Wissenschaftliche Beiträge

Internationale und nationale Journalbeiträge:

Hollert, H., Dürr, M., Olsman, H., Halldin, K., van Bavel, B., Brack, W., Tysklind, M., Engwall, M. & Braunbeck, T., 2001: Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the Neckar River. Ecotoxicology: submitted.

Neumann-Hensel, H., Ricking, M., Hollert, H. & Ahlf, W., 2001: Sediment quality criteria approach on an ecotoxicological and chemical basis. Acta hydrobiologica: submitted.

Hollert, H., Heise, S., Pudenz, S., Brüggemann, R., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 2000: Application of a sediment quality triad and different statistical approaches (hasse diagrams and fuzzy logic) for the comparative evaluation of small streams. Ecotoxicology: submitted.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. *Environ. Tox. Chem., 19 (3): 528-534.*

Hollert, H., Dürr, M., Haag, I., Winn, N., Holtey-Weber, R., Kern, U., Färber, H., Westrich, B., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: A combined hydraulic and *in vitro* bioassay approach to assess the risk of erosion and ecotoxicological implications of contaminated sediments in a lock-regulated river system. In: BfG (Editor), Sediment assessement in European River Basins, Reihe: Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Berlin, pp. 156-160.

Neumann-Hensel, H., Ricking, M., Hollert, H. & Ahlf, W., 2000: Empfehlung zur Bewertung von Sedimentbelastungen. Bodenschutz, 3: 111-117.

Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A. & Braunbeck, T., 1999: Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNAse protection-assay. *Sci Total Environ, 15: 109-122.*

Bücher:

Hollert, H. & Braunbeck, T., 1997: Ökotoxikologie *in vitro*: Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoff. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 21: 181 S.*

Braunbeck, T., unter Mitarbeit von: Arnold, H., Bauer, I.., Briese, I.., Hauck, C., Hollert, H., Holzschuh, J., Islinger, M., Müller, F.& Zahn, T., 1995: Zelltests in der Ökotoxikologie – Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 11: 204 S.*

Buchbeiträge:

Dürr, M., Hollert, H., Braunbeck, T., Erdinger, L. & Sonntag, H.-G., 2000: Bioassay-dirigierte Fraktionierung von Sedimenten und Schwebstoffen anhand der toxischen Wirkungen auf RTG-2-Zellen. In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner and A. Klumpp (Editors), Bioindikation - Biologische Testverfahren. Verlag Günther Heimbach, Stuttgart, pp. 205-208.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 2000: Möglichkeiten und Grenzen von *In vitro*-Biotests zur Erklärung einer gestörten Bachforellen-Reproduktion im Einzugsgebiet der Aare (Schweiz). In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner and A. Klumpp (Editors), Bioindikation - Biologische Testverfahren. Verlag Günther Heimbach, Stuttgart, pp. 209-214.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: Ein Bewertungskonzept für gelöste und partikulär gebundene Schadstoffe - das Fallbeispiel eines Neckarhochwassers. In: A. Formin, U. Arndt, D. Elsner and A. Klumpp (Editors), Bioindikation - Biologische Testverfahren. Verlag Günther Heimbach, Stuttgart, pp. 215-219.

Hollert, H., Karaus, U., Dürr, M., Winn, N., Siebert, I., Wetterauer, B., Rudolf, M., Brack, W., Haag, I., Engwall, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: Integrierte Sedimentuntersuchungen und Bioassay-dirigierte Fraktionierungen – Zwei Konzepte zur Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg (Ö 97 004). In: F. Horsch, W.G. Filby, S. Gross and H. Krug (Editors), Diskussionskreis "Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe", Diskussionskreise beim Statusseminar BWPLUS (Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung), http://bwplus.fzk.de. BWPLUS-Berichte, 20 S.

Hollert, H., Dürr, M., Geier, V., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Ökotoxikologie *in vitro*: Gefährdungspotential von Neckarsedimenten. In: J. Oehlmann & B. Markert (Editors), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. ISBN 3-609-68370, Ecomed-Verlag, Stuttgart, pp. 444-462.

Hollert, H., Gratzer, H., Ahlf, W. & Braunbeck, T., 1999: Einleitung - Kapitel Ökotoxikologie. In: DVWK, U. Kern and B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 36-51.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Gratzer, H., Holtey-Weber, R. Ahlf, W., Färber, H., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. In: F. Horsch, W.G. Filby, S.

Gross & H. Krug (Editors), Diskussionskreis "Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe", Diskussionskreise beim Statusseminar BWPLUS (Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung), BWPLUS-Berichte, online unter http://bwplus.fzk.de. Vol. 15, 13 S.

Hollert, H., Dürr, M., Islinger, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Biotestverfahren zur Bestimmung des zelltoxischen Schädigungspotentials von Sedimenten und Schwebstoffen. In: DVWK, U. Kern and B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 256-261.

Hollert, H., Islinger, M., Siebert, I., Pawlowski, S. & Braunbeck, T., 1999: Bestimmung des östrogen wirksamen Potentials von Sedimenten und Schwebstoffen mit Hilfe eines Vitellogenin-mRNA-Assays. In: DVWK, U. Kern and B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 290-296.

Dürr, M., Hollert, H. & Erdinger, L., 1999: Bakterien-Kurzzeittest zur Bestimmung des genotoxischen Potentials von Wasser, Schwebstoffen und Sedimenten. In: DVWK, U. Kern & B. Westrich (Editors), Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern. DVWK-Schriften, Band 128. Kommissionsbetrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp. 263-267.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T. 1998: Wie giftig sind Schwebstoffe und Sedimente des Neckars? Zur Eignung von Biotests und Bioassay-dirigierten Fraktionierungstechniken für die Bewertung des Schadstoffpotentials in hydrologischen Fallstudien. In: H. Karrasch, W. Gamerith, T. Schwan, K. Sachs and U. Krause (Editors), HGG-Journal 13, *ISSN 0931-0061,* Heidelberg: 130-145.

Braunbeck, T., Hollert, H., Dürr, M. & Erdinger, L. 1997: Biotests in der Ökotoxikologie am Beispiel des Fischzelltests. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 22 : 241-256.*

Hollert, H., Dürr, M., Dörr, I., Erdinger, L., Zipperle, J. & Braunbeck, T. 1996: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung der Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe von Zellkulturen aus Fischen. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 16 : 469-488.*

Braunbeck, T., Berbner, T., Bieberstein, U., Erdinger, L., Geier, V., Hollert, H., Leist, E., Rahmann, N. & Zipperle, J. 1995: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 12 : 345 – 358.*

Kurzpublikationen und Poster-Kurzfassungen mit ISSN-Nummer:

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 1998: Possibilities & limitations of *in vitro* assays to explain disturbances of brown trout reproduction in the river Aare (Switzerland). Zoology-Supplement, 101: 78.

Hollert, H., Dürr, M., Geier, V., Erdinger, L. & Braunbeck, T. 1998: A novel *in vitro* approach to sediment toxicity assessment - Contamination of three Neckar sites (Germany). Zoology-Supplement, 101: 77.

Dürr, M., Hollert, H. & Erdinger. L., 1997: Ames-Test an nicht aufkonzentriertem Flußwasser aus Baden-Württemberg. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 21: 439f.*

Dürr, M., Hollert, H., Erdinger. L. & Sonntag, H.G. 1997: Erfassung gentoxischer Belastungen in Oberflächengewässern mit optimiertem Ames-Test – In: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1997, Hrsg.: Hygiene und Mikrobiologie - 49. Jahreskongress 5.-9. 10. 1997 in Jena. Einhorn-Presse-Verlag, ISSN 1433-3988. Reinbeck. P 480.

Dürr, M., Hollert, H., Erdinger, L., Braubeck, Th. & Sonntag, H.-G., 1997: Bioassay-dirigierte Fraktionierung von Sedimenten und Schwebstoffen anhand der toxischen Wirkungen auf RTG-2-Zellen. In: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (1997, Hrsg.): Hygiene und Mikrobiologie 49. Jahreskongress 5.-9. 10. 1997 in Jena. Einhorn-Presse-Verlag, ISSN 1433-3988. Reinbeck. P 474.

Dürr, M., Hollert, H., Braunbeck, T., Erdinger, L. & Sonntag, H.-G., 1996: Untersuchungen zur Cyto- und Genotoxizität verschiedener Kompartimente des Neckars bei Hochwasser. *Hyg. Med., Suppl., ISSN 0172-3790, 2:16*

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T. 1997: Cyto- and genotoxicity of suspended matter (SPM) and sediment of the River Neckar (Germany) during a Christmas flood – eingereicht als Abstract beim 8th Annual Meeting of SETAC-Europe, Bordeaux - France, 14-18 April 1998.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Gen- und Cytotoxizität von Schwebstoffen und Sedimenten des Neckars bei Heidelberg während des Weihnachtshochwassers 1995/96. *Verh. Dtsch. Zool., ISSN 0070-4342, 90.1 : 359.*

Hollert, H., Zipperle, J. & Braunbeck, T., 1997: Toxizität von Abwasserproben aus Baden-Württemberg im Test mit RTG-2-Zellen aus der Regenbogenforelle, Daphnien, Leuchtbakterien und Algen. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 21:441f.*

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Bioassaydirigierte Fraktionierung und bio-

chemische Untersuchungen an RTG-2-Zellen: ein Kombinationssystem zur Charakterisierung cytotoxischer Wirkungen von Sedimenten und Schwebstoffen. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 21:440f.*

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1996: Untersuchungen zur Cyto- und Genotoxizität verschiedener Kompartimente des Neckars bei einem Hochwasser im Winter 1995/96. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 16:585f.*

Holzschuh, J., Hollert, H., Islinger, M., Bieberstein, U., Ruff, N., Zahn, T. & Braunbeck, T., 1995: Akute Cytotoxizitätstests mit permanenten Fischzellinien aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) - ein Vergleich von Methoden. *Verh. Dtsch. Zool., ISSN 0070-4342, 88.1: 258.*

Zahn, T., Hollert, H.& Braunbeck, T. 1996: Zytotoxizität von 3,4-Dichloranilin bei S9-supplementierten RTG-2-Zellen und isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. *Veröff. PAÖ, ISSN 0943-0660, 16: 587f.*

Zahn, T; Hollert, H. & Braunbeck, T. 1996: Vergleich der Zytotoxizität von umweltrelevanten Chemikalien bei isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle und S9-supplementierten RTG-2-Zellen. *Verh. Dtsch. Zool., ISSN 0070-4342, 89.1.*

Poster-Kurzfassungen ohne ISSN-Nummer:

Hollert, H., Dürr, M., Brack, W., Heise, S. & Braunbeck, T., 2000: Sedimenttriade und Biotest-geleitete Fraktionierung - Zwei Konzepte zur Untersuchung und Bewertung von Sedimenten. In: BfG (Hrsg.), Wirkungsbezogene Sedimentuntersuchungen zur Ableitung von Qualitätsmerkmalen und Handlungsempfehlungen. BfG-Veranstaltungen, Bundesanstalt für Gewässerkunde - Außenstelle Berlin, pp. 1-5.

Holtey-Weber, R., Färber, H., Schöler, H.F. & Hollert, H., 2000: Analytik von Bisphenol A und endokrin wirksamen Substanzen im Wasser, Umweltanalytiktage Nordrhein-Westfalen, Duisburg.

Pawlowski, S., Islinger, M., Hollert, H., Sägesser, M., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 2000: Endocrine activity in municipal waste water effluent samples of Switzerland assessed by vitellogenin-mRNA induction in isolated hepatocytes from male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Proceedings - Annual Meeting of the Society of Environmental Chemistry and Toxicology (World) in Brighton.

Neumann-Hensel, H., Ricking, M., Hollert, H. & Ahlf, W., 2000: Konzept der Gewässerbewertung anhand der Sedimentkontamination. In: BfG (Hrsg.), Wirkungsbezogene Sedimentuntersuchungen zur Ableitung von Qualitätsmerkmalen und Handlungsempfehlungen. BfG-Veranstaltungen, Bundesanstalt für Gewässerkunde - Außenstelle Berlin, pp. 1-5.

Hollert, H., Dürr, M., Winn, N., Islinger, M., Holtey-Weber, R., Färber, H., Haag, I., Kern, U., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Risk Assessment of a flood event, Part 1: Cyto-, genotoxicity and enodocrine-disrupting potential of suspended matter, Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Hollert, H., Froschauer, A., Schnurstein, A., Dürr, M., Islinger, M., Sägesser, M., Ochsenbein, U., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Möglichkeiten und Grenzen von In vitro-Testsystemen zur Erklärung einer gestörten Bachforellen-Reproduktion im Kanton Bern / Schweiz, Statusseminar "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), Forschungszentrum Karlsruhe.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Froschauer, A., Schnurstein, A., Erdinger, L., Sägesser, M., Ochsenbein, U. & Braunbeck, T., 1999: Risk assessment of sewage and sediments with in vitro assays to explain disturbances of brown trout reproduction in Switzerland, Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Hollert, H., Wetterauer, B., Dürr, M., Winn, N., Haag, I., Kern, U., Westrich, B., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Ökotoxikologische Untersuchungen von Schwebstoffen und Sedimenten der Staustufe Lauffen - über die Gefahr einer Remobilisierung kontaminierter Altsedimente bei Hochwasserereignissen, Statusseminar "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), Forschungszentrum Karlsruhe.

Brack, W., Hollert, H., Kind, T., Segner, H. & Schüürmann, G., 1999: Effect-directed identification of EROD-inducing and mutagenic compounds in sediment extracts. In: SETAC (Editor), 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA.

Dürr, M., Hollert, H., Winn, N., Kaiser, P., Holtey-Weber, R., Färber, H., Gratzer, H., Ahlf, W., Schöler, H., Braunbeck, T. & Erdinger, L., 1999: Risk Assessment of a flood event, Part 2: Limnochemical parameters, chemical trace analyses and microbial testsystems., Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Holtey-Weber, R., Schöler, H., Färber, H. & Hollert, H., 1999: Spurenanalytik von Xenoöstrogenen: eine GC-MS/MS-Multimethode mit on-line-Derivatisierung. Jahrestagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Ökotoxikologie, Jena.

Karaus, U., Hollert, H., Dürr, M., Froschauer, A., Schnurstein, A. & Braunbeck, T., 1999: Ermittlung des genotoxischen Schädigungspotentials in Wasser und Sediment im Rahmen einer integrierten Sedimentbewertung mit Hilfe des Comet-Assays und Ames-Tests, Statusseminar "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), Forschungszentrum Karlsruhe.

Winn, N., Hollert, H., Dürr, M., Gratzer, H., Schöler, H.F., Ahlf, W., Karrasch, H. & Braunbeck, T., 1999: Zur Eignung von mikrobiellen Testsystemen für eine integrierte Untersuchung kontaminierter Standorte, Statusseminar "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), Forschungszentrum Karlsruhe.

Dürr, M., Hollert, H., Erdinger, L. & Sonntag, H.G., 1998: Ein optimierter Mutagenitätstest für die Bewertung von Oberflächenwasser, Posterbeitrag bei der Jahrestagung der deutschsprachigen Society of Environmental Toxicology & Chemistry, Zittau.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T. 1998: Bioassaydirigierte Fraktionierung und biochemische Untersuchungen an RTG-2-Zellen: ein Kombinationssystem zur Charakterisierung cytotoxischer Wirkungen von Sedimenten und Schwebstoffen, Posterbeitrag bei der Jahrestagung der deutschsprachigen Society of Environmental Chemistry & Toxicology, Zittau.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1998: Cyto- & genotoxicity of suspended matter (SPM) & sediment of the River Neckar (Germany) during a winter flood. Jahrestagung der europäischen Society of Environmental Toxicology & Chemistry, Bordeaux, Frankreich.

Dürr, M.; Hollert, H.; Braunbeck, T. & Erdinger, L. 1997: Bioassaydirigierte Fraktionierung und biochemische Untersuchungen an RTG-2-Zellen: ein Kombinationssystem zur Charakterisierung cytotoxischer Wirkungen von Sedimenten und Schwebstoffen – Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jahrestagung 1997: Wege und Beiträge der Chemie zum Sustainable Development: Stoffe und Umwelt. 3.-4. November 1997 im DKFZ Heidelberg. Posterkurzfassungen, LMP 52.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Untersuchungen zur ökotoxikologischen Belastung verschiedener Kompartimente des Neckars bei Heidelberg während eines Hochwassers – Tagungsband der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung vom 24.-25.2.1997, RWTH-Aachen, P12.

Hollert, H., Dürr, M., Barsch, D., Schulte, A., Schukraft, G., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Partikulär gebundene Schadstoffe – das Fallbeispiel eines Neckarhochwassers. Broschüre zu der Posterpräsentation beim 51. Geographentag Bonn vom 6.-11.10.1997. Poster P5.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Gen- und Cytotoxizität von Schwebstoffen und Sedimenten des Neckars bei Heidelberg während des Weihnachtshochwassers 1995/96 – Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jahrestagung 1997: Wege und Beiträge der Chemie zum Sustainable Development: Stoffe und Umwelt. 3.-4. November 1997 im DKFZ Heidelberg. Posterkurzfassungen, LMP 51.

Hollert, H., Zipperle, J. & Braunbeck, T., 1997: Zelltests in der Ökotoxikologie: Gefährdungspotential von Abwasserproben aus Baden-Württemberg – Tagungsband der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung vom 24.-25.2.1997, RWTH-Aachen, P13.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1996: Untersuchungen zur ökotoxikologischen Belastung verschiedener Kompartimente des Neckars bei Heidelberg während eines Hochwassers im Winter 1995/96 – Kurzfassungen der Vorträge und der Posterpräsentationen. Internationales LAWA-Symposium, unter Schirmherrschaft des BMU; „Lebensraum Gewässer - Nachhaltiger Gewässerschutz im 21.Jahrhundert“, 28. und 29.11.1996 in Heidelberg, p.38.

Hollert, H.; Zipperle, J. & Braunbeck, T., 1996: Zelltests in der Ökotoxikologie: Gefährdungspotential von Abwasserproben aus Baden-Württemberg – Kurzfassungen der Vorträge und der Posterpräsentationen. Internationales LAWA-Symposium, unter Schirmherrschaft des BMU; „Lebensraum Gewässer - Nachhaltiger Gewässerschutz im 21.Jahrhundert“, 28. und 29.11.1996 in Heidelberg, p.37.

Vorträge:

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Winn, N., Islinger, M., Holtey-Weber, R., Ahlf, W., Brack, W., Engwall, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2001: Use of a quality triad approach and bioassay-directed fractionation techniques to evaluate sediments in southern Germany. Angenommener Vortrag bei der Jahrestagung der Society of Environmental Toxicology and Chemistry in Madrid.

Hollert, H. & Braunbeck, Th., 2001: Untersuchungen zur Gefahr einer Remobilisierung von kontaminierten Altsedimenten in Stauhaltungen des Neckars. Eingeladener Vortrag am Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart.

Hollert, H., Dürr, M., Brack, W., Heise, S. & Braunbeck, T., 2000: Sedimenttriade und Biotestgeleitete Fraktionierung - Zwei Konzepte zur Untersuchung und Bewertung von Sedimenten. Symposium Wirkungsbezogene Sedimentuntersuchungen zur Ableitung von Qualitätsmerkmalen und Handlungsempfehlungen. Bundesanstalt für Gewässerkunde - Außenstelle Berlin. Eingeladener Vortrag.

Hollert, H. Dürr, M. & Braunbeck, Th., 2000: Sediment Quality Triad – a new integrated approach for the assessement of sediment toxicity. Kolloquium, MTM, Universität Örebro, Schweden.

Hollert, H., Karaus, U., Dürr, M., Brack, W., Winn, N., Rudolf, M., Gratzer, H., Engwall, M., van Bavel, B., Erdinger, L., Ahlf, W. & Th. Braunbeck, 2000: Ein differenzialdiagnostisches Bewertungssystem aus Sedimenttriade und wirkungsbezogener Fraktionierung zur Ermittlung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials und des Zustandes in situ eines komplex belasteten Mittelgebirgs-

baches. Vortrag bei der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung September 2000 in Hamburg.

Hollert, H., Heise, S., Pudenz, S., Brüggemann, R., Ahlf, W. & Th. Braunbeck, 2000: Die Anwendung von statistischen Methoden, Fuzzy Logic- und Hassediagramm-Technik für die vergleichende Bewertung der Befunde einer Sedimenttriade im Einzugsgebiet des Neckars. Vortrag bei der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung September 2000 in Hamburg.

Hollert, H., Karaus, U., Dürr, M., Winn, N., Siebert, I., Wetterauer, B., Rudolf, M., Brack, W., Haag, I., Engwall, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 2000: Integrierte Sedimentuntersuchungen und Bioassay-dirigierte Fraktionierungen – Zwei Konzepte zur Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. Vortrag beim Statuskolloquium BWPlus des Forschungszentrums Karlsruhe. März 2000 .

Hollert, H. & Braunbeck, T. 2000: Interdisziplinäre Untersuchungen des gelösten und partikulär gebundenen Schädigungspotentials von zwölf Fließgewässerstandorten mit *In vitro*-Toxizitätstests, Fraktionierungstechniken, chemischen Analysen und Aufnahmen des Makrozoobenthos, Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft des Zentrums für Meeres- und Klimaforschung. 24. Januar 2000. Eingeladener Vortrag.

Brack, W., Hollert, H., Kind, T. Segner, H. & Schüürmann, G., 2000: Identification of EROD-inducing and mutagenic compounds in contaminated river sediments. 21th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Pawlowski, S., Gratzer, H., Holtey-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Brack, W., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Integrated assessment of sediments and surface waters in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of *in vitro* toxicity, chemistry and macrozoobenthos. 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Schöler, H., Gratzer, H., Holtey-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Integrated sediment assessment in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of *in vitro* toxicity, chemistry and macrozoobenthos, Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Leipzig.

Hollert, H. Dürr, M. & Braunbeck, T., 1999: Sediment Quality Triad – a new integrated approach for the assessement of sediment toxicity. Kolloquium, Evolutionsbiologisk Centrum (EBC) Universität Uppsala, Schweden.

Braunbeck, T. & Hollert, H., 1999: Ökotoxikologische Charakterisierung kontaminierter Gewässer. Fachtagung Schwebstoffe und Schadstoffe in Gewässern des Deutschen Verbandes für Wasserwirtschaft und Kulturbau (DVWK) am Institut für Wasserwirtschaft der Universität Stuttgart. 27/28. September 1999.

Brack, W., Hollert, H., Kind, T. Segner, H. & Schüürmann, G., 1999: Effektorientierte Identifikation EROD-induzierender und mutagener Substanzen in Sedimentextrakten. Jahrestagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Ökotoxikologie, Jena.

Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Gratzer, H., Holtey-Weber, R. Ahlf, W., Färber, H., Karrasch, H., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1999: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. Statuskolloquium BWPlus des Forschungszentrums Karlsruhe. März 1999.

Brack, W., Hollert, H., Kind, T., Segner, H. & Schüürmann, G., 1999: Effect-directed identification of EROD-inducing and mutagenic compounds in sediment extracts. 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA.

Hollert, H., Dürr, M., Geier, V., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1998: Ökotoxikologie *in vitro*: Gefährdungspotential von Neckarsedimenten – Vortrag bei der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung Mai 1998 in Zittau.

Braunbeck, T., Berbner, T., Hollert, H., Holzschuh, J. & Leist, E. 1997: Sedimenttoxikologie *in vitro*: Möglichkeiten und Grenzen zur Bestimmung der Toxizität verschiedener Kompartimente in aquatischen Systemen – Vortrag bei der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung vom 24.-25.2.1997, RWTH-Achen.

Braunbeck, T., Hollert, H., Dürr, M., Dörr, I. & Erdinger, L., 1996: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen – Vortrag beim 4. Statuskolloquium „Projekt Angewandte Ökologie“ der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 26. und 27. März 1996 im Schloß Ettlingen.

Dürr, M., Hollert, H., Braunbeck, T., Erdinger, L. & Sonntag, H.-G., 1996: Untersuchungen zur Cyto- und Genotoxizität verschiedener Kompartimente des Neckars bei Hochwasser – Vortrag bei der 25. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin; Innsbruck, 23. Mai 1996.

Berichte:

Hollert, H., Pawlowski, S. & Braunbeck, T., 2000: Ökotoxikologische Belastung von Abwasserproben aus dem Kanton Bern / Schweiz, Zoologisches Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg.

Karaus, U., Hollert, H. & Braunbeck, T., 1999: Ergebnisse des Bakterienkontaktests mit Neckarsedimenten. Zwischenbericht an die Bundesanstalt für Gewässerkunde.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A. & Braunbeck, T., 1998: Ökotoxikologische Belastung von Abwasserproben aus dem Kanton Bern/ Schweiz - Abschlußbericht -, Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg, Aquatische Ökotoxikologie, Heidelberg.

Braunbeck, Th., Hollert, H., Dürr, M., Neumüller, D., Schnurstein, A., Erdinger, L., 1998: Dynamik des gentoxischen Potentials verschiedener Kompartimente in Fließgewässern. Abschlussbereicht an das Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Baden-Württemberg.

Hollert, H. & Braunbeck, T., 1996: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe von *In-vitro*-Testsystemen aus Fischen – Abschlußbericht des Projektes „Angewandte Ökologie“ der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg N° 9418.02. Heidelberg. 174 S.

Hollert, H.; Schukraft, G.; Dürr, M. & Erdinger, L., Braunbeck, T., 1996: Cyto- und Gentoxizität verschiedener Kompartimente eines industriell stark überprägten Vorfluters in den Neuen Bundesländern – Abschlußbericht an das Staatliche Amt für Umweltschutz (STAU), Sachsen/Anhalt: 35S.

Posterpräsentationen:

Rudolf, M., Hollert, H., Leist, E., Pätzold, B. & Th. Braunbeck, 2000: Ein *In situ*-Test mit Eiern und Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) zur Bestimmung der toxischen Wirkung von Sedimenten auf Fische. Poster bei der Society of Environmental Toxicology and Chemistry, „German Language Branch“-Tagung September 2000 in Hamburg.

Dürr, M., Hollert, H., Erdinger, L., Braubeck, T. Sonntag, H.G., 1997: Bioassay-dirigierte Fraktionierung von Sedimenten und Schwebstoffen anhand der toxischen Wirkungen auf RTG-2-Zellen. Poster beim Workshop des Ministeriums für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg „Sedimentationsprobleme in Gewässern, Erkundung – Behandlung - Beseitigung“. 6. und 7. Oktober 1997 im Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1997: Partikulär gebundene Schadstoffe – das Fallbeispiel eines Neckarhochwassers. Poster beim Workshop des Ministeriums für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg „Sedimentationsprobleme in Gewässern, Erkundung - Behandlung – Beseitigung“. 6. und 7. Oktober 1997 im Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart.

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. & Braunbeck, T., 1996: Untersuchungen zur toxikologischen Belastung verschiedener Kompartimente des Neckars bei Heidelberg während eines Hochwassers – Posterpräsentation, Austellung „Geographische Forschungsarbeiten über Heidelberg“, Foyer des „Prinz Carl“, Heidelberg vom 17 bis 25.9.1996.

12 Anhang: Empfehlung zur Bewertung von Sedimenten

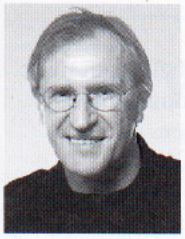
Empfehlung zur Bewertung von Sedimentbelastungen

H. Neumann-Hensel, M. Ricking, H. Hollert, W. Ahlf

Dr. Helga Neumann-Hensel
TU Hamburg-Harburg, Labor Dr. Fintelmann und Dr. Meyer, TU Hamburg-Harburg

Mathias Ricking
FU Berlin, FB Geowissenschaften

Henner Hollert
Universität Heidelberg, Zoologie I



Dr. Wolfgang Ahlf
TU Hamburg-Harburg

Zusammenfassung

Der Beitrag stellt eine Empfehlung zur Bewertung von Sedimentbelastungen mit Hilfe eines integrierten Ansatzes von ökotoxikologischen, chemisch-analytischen und ökologischen Verfahren vor. Die Sedimentqualität wird prioritär mit biologischen Methoden zum Nachweis einer Wirkung in Kombination mit chemischer Analytik überprüft. Ortsunabhängige Klassifikationsschemata bilden dabei die Grundlage für die Bewertungsmaßstäbe.

◆ **Schlüsselworte: Sedimentqualität, Ökotoxikologie, biologische und chemische Analytik, gestuftes Untersuchungskonzept, Klassifizierung, Bewertung**

Summary

The recommendations presented in this paper use an integrated approach which unites ecotoxicological, chemical andecological analysis methods to assess and screen the quality of sediments. For this reason biological methods in combination with the tools of chemical analysis are given priority when examining the quality of the sediment to establish adverse effects. The eximination patterns that make up. The basis for the assessement are set irrespective of the location.

◆ **Key words: Sedimentquality, ecotoxicology, biological and chemical analysis, examination strategy, classification, assessment**

1. Grundlagen und Anwendungsbereich

Die vorgelegte Empfehlung widmet sich dem Problem, wie der negative Einfluss von Umweltchemikalien auf und in Gewässersedimenten in unseren Flüssen möglichst umfassend und dennoch kostengünstig bewertet werden kann. Es ist offensichtlich, dass Kontaminationen in der Umwelt eine ökologische Bedeutung nicht allein durch ihre Anwesenheit, sondern durch ihre Wirkung erhalten. Daraus leitet sich ab, dass diese vitale Wechselbeziehung bei dem Entwurf von Bewertungsprogrammen durch eine Kombination von biologischen und chemischen Diagnosetechniken berücksichtigt werden sollte. Seit 1990 ist der Einsatz von Bioindikatoren im Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG/§47) festgeschrieben. Die Untersuchungen erfassen allerdings primär luftverunreinigende Stoffe [1].

Obwohl die sensitiven diagnostischen Umwelttechniken nicht komplett sind, ist eine weitere Verbreitung der ökotoxikologischen Methoden sinnvoll, damit das Potential der chemischen Analytik effektiver eingesetzt werden kann, nämlich dort, wo biologische Probleme demonstriert werden. Die Grundprinzipien der Beurteilungsstrategie berücksichtigen daher, dass die grundlegenden Kriterien einer Gewässerqualität prinzipiell biologisch sind, auch wenn diese gewöhnlich in chemischen Kategorien (Richtlinien) ausgedrückt wird. Aus diesem Grund wird die Sedimentqualität prioritär mit biologischen Methoden zum Nachweis einer Wirkung überprüft. In Kombination mit chemischen Analysen werden die diagnostischen Werkzeuge vereinigt zur Bewertung der Umweltqualität eingesetzt.

Die vorgeschlagene integrierte Umweltbewertung erscheint der am besten geeignete und fortschrittliche Weg einer Umweltbewertung zu sein und berücksichtigt den gegenwärtigen und zukünftigen Stand des Wissens.

2. Ziele

Die Empfehlung richtet sich an Behörden/Institutionen, die

- die Belastungs-/Schadstofferfassung mit biologischen und chemischen Methoden bestimmen wollen,
- eine Prognose der Effekte bei Einbringung von Baggergut in Gewässer (Ausbaggerung, Sanierung) und Beurteilung der Verwertungsmöglichkeit von Baggergut erzielen wollen,
- eine Dokumentation der Beeinträchtigung der Lebensgemeinschaften vor Ort ermitteln wollen.

3. Einleitung

Viele Schadstoffe, die aus den unterschiedlichsten Quellen in die Gewässer gelangen, sind kaum im Wasser gelöst. Sie lagern sich an Schwebstoffe und Sedimente an und werden so dem Wasser entzogen. Sedimente können dadurch zu Schadstoffsenken und -quellen in Gewässern werden, die ein andauerndes Gefährdungspotential darstellen. Eine Umweltqualitätsanalyse der Sedimente trägt daher zum Schutz der Gewässer bei.

Als Schutzgüter sind die aquatische Lebensgemeinschaft, die Berufs- und Sportfischerei, die Trinkwasserversorgung sowie Schwebstoffe und Sedimente selbst definiert [2].

Um die Sedimentqualität zu beurteilen, wird in der vorliegenden Empfehlung ein integrierter Ansatz von ökotoxikologischen, chemisch-analytischen und ökologischen Verfahren vorgestellt, der im Gegensatz zu anderen Bewertungsansätzen [3, 4, 5] die ökotoxikologische Wirkung als Maßstab und Veranlassung nutzt und nicht parallel oder nachgeschaltet die Wirkung bestimmt.

Die leistungsfähige chemische Analytik ist bedingt in der Lage, Ausgangssubstanzen und deren Metabolite zu erfassen. Über die Wirkung auf Organismen werden jedoch keine Informationen gewonnen. Allerdings ist die Zahl der zu analysierenden Stoffe so umfangreich, dass eine vollständige Erfassung sehr aufwendig und kostenintensiv wird und synergistische/antagonistische Effekte nicht berücksichtigt werden können.

Die ökotoxikologischen Tests geben Auskunft über die Wirkung, ohne den Stoff und damit die potentielle Quelle zu ermitteln. Dabei hat es sich gezeigt, dass eine allgemein ökotoxikologische Aussage mit nur einem Testsystem nicht möglich ist [z. B. 6, 7, 8]. Aus diesem Grunde wird eine Kombination von biologischen Testverfahren eingesetzt.

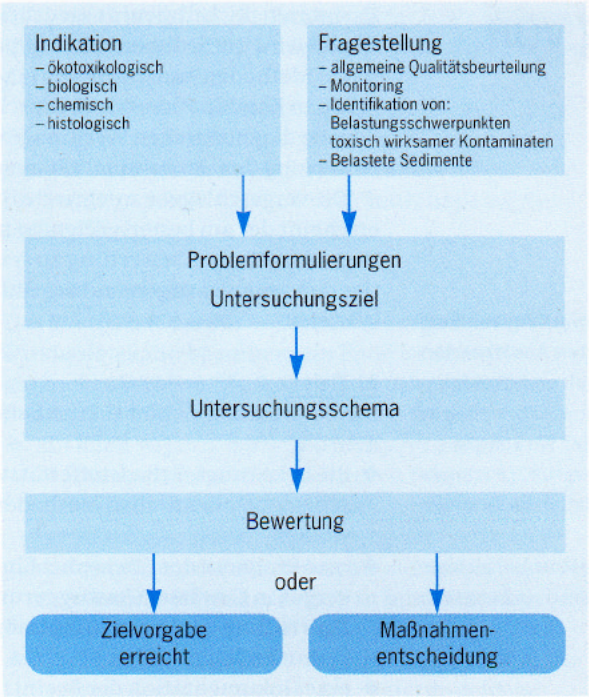


Abbildung 1: **Fließschema zum Verfahrensablauf**

Figure 1: **Flow chart of the conceptual processing**

Da mit Hilfe der gemessenen Wirkung im Biotest keine Aussagen über die Schädigung des Ökosystems getroffen werden können, wird als 3. Komponente die ökologische Untersuchung der Struktur vorgenommen. Anhand von Struktur und/oder Funktionsparametern lässt sich der Schädigungsgrad einer Biozönose erschließen [9].

Diese integrierte Vorgehensweise zur Bewertung von Ökosystemen wird von [10] empfohlen und wurde auch für die Sedimentbewertung dargestellt [z. B. 11].

Es ist nicht notwendig, die gesamte Untersuchungspalette für jedes Gewässer anzuwenden. Abhängig von Fragestellung, Indikation, Untersuchungsziel und den zur Verfügung stehenden Daten werden zusammenhängende Bausteine in einem Untersuchungskonzept erfasst. Die Anzahl der einzusetzenden Bausteine wird durch das Untersuchungsziel bestimmt.

Wann muss untersucht werden?

Untersuchungsanlass kann eine konkrete Fragestellung sein, wie z. B. die Qualitätsbeurteilung des Ist-Zustandes des Gewässers, Monitoring oder Überwachung. Auch eine konkrete Indikation ist ein Anlass für das Starten des Untersuchungsprogramms (Abb. 1). Eine Indikation ist gegeben, wenn:

- Kontaminationen durch Einleitungen oder Altlasten vorliegen
- Metallkonzentrationen die Richtwerte (> Zielvorgabe Klasse II_{Chemie}) überschreiten
- persistente organische Kontaminanten in erhöhten Konzentrationen (> Zielvorgabe Klasse II_{Chemie}) detektiert wurden
- in der benthischen Biozönose keine Indikatoren guter Wasserqualität (z. B. Amphipoden, Chironomiden) gefunden wurden
- Organismen, besonders Fische, abnormale Veränderungen aufweisen

Folgende Fragestellungen lassen sich formulieren:

- Wie ist die allgemeine Qualität des Gewässers?
- Ist ein Monitoring des Gewässers notwendig?
- Wo sind die Belastungsschwerpunkte des Gewässers?
- Welches sind die toxisch wirksamen Kontaminanten?
- Wie hoch sind Sedimente belastet?

4. Das Untersuchungsprogramm

Das Untersuchungsprogramm sieht ein Stufenverfahren vor (Abbildung 2). Wird durch die Ergebnisse eine Bewertungssicherheit erreicht, kann der Untersuchungsumfang begrenzt werden und so der Aufwand auf das tatsächlich Notwendige beschränkt werden.

4.1. Systembeschreibung

Am Anfang des Untersuchungsprogramms ist eine Systembeschreibung vorzunehmen. Diese Beschreibung kann in Form einer Sedimentkartierung dargestellt werden und sollte Angaben zur Fläche, über Zu- und Abflüsse, Gewässernutzung und -benutzung, Gewässerausbau und -zustand sowie über das Gewässersediment enthalten.

4.2. Probennahme

Die Sedimententnahme sollte bis in maximal 50–100 cm Tiefe erfolgen.

Stufe 1: Mischprobe

Raster: Rasterverfahren (z. B. Zentrum und Satelliten auf Umfang eines Kreises)
Zufallsverfahren

Stufe 2 und 3: Kern mit entsprechenden Teilproben

4.3. Probenaufbereitung und Gewinnung der Testphasen

Die Probenlagerung der zu untersuchenden Sedimente ist analog ISO/DIS 5669-15 Part 15 vorzunehmen. Bei der Probenaufbereitung und der Gewinnung der einzusetzenden Testphasen ist bei der 1. Stufe und Rasterproben eine entsprechende Homogenisierung und die Untergliederung in die Fraktionen < 2000 µm und < 63 µm vorzunehmen.

Eluat:

Mit Überkopfschüttlern (20 $Umin^{-1}$) sind bei einem Feststoff/Flüssigkeitsverhältnis von 1:2 bis 1:2,5 für 24 h bei 4 °C die Eluate zu gewinnen.

Porenwasser:

Zentrifugation des Gesamtsediments bei mindestens 2000 g, 30 min. Die Herstellung soll unmittelbar im Anschluss an die Probennahme erfolgen.

Methanolextrakt:

1 Teil Sediment und 3 Teile Methanol zur Bestimmung der bioverfügbaren Fraktion [12, 13]. Sie werden als verdünnte wässrige Extrakte unterhalb der lösungsmitteleigenen Toxizität (< 10% MeOH) im Test eingesetzt.

Organischer Extrakt:

Für die Biotests des Bausteins 3; Soxhlet-Extraktion mit Aceton, Lösungsmitteltausch zu Dimethylsulfoxid. Die Extrakte werden als verdünnte wässrige Extrakte un-

terhalb der lösungsmitteleigenen Toxizität im Test eingesetzt [14, 15].

4.4. Untersuchungsbausteine

Im Untersuchungsschema (Abbildung 2) bilden die ökotoxikologische Wirkung und die Bioverfügbarkeit den Steuerparameter des weiteren Ablaufs nach der 1. Stufe. Steuerparameter für die Entscheidung nach der 2. Stufe bilden die Ergebnisse der chemisch-analytischen Untersuchung.

4.4.1. Toxizitätstests

In der 1. Stufe wird eine Testbatterie mit mikroorganismischen Verfahren zur Erfassung des ökotoxikologischen Wirkpotentials eingesetzt. In der Grundstufe stehen Methoden und Testorganismen im Vordergrund, die mit einer Kontrolle als Bezugsgröße arbeiten und die schnell und kostengünstig durchführbar sind. Es sind genormte Verfahren anzuwenden.

Das vorgeschlagene Testset ist durch Mehrfachuntersuchungen bereits feldvalidiert [16] und kann durch weitere Methoden ergänzt werden. Vorschläge sind in der 3. Stufe dargestellt.

Nach den sedimentchemischen Ergebnissen und je nach Fragestellung können weitere Trennung ändern ökotoxikologische Untersuchungen notwendig sein, z.B. Tests mit standorteigenen Organismen, Tests zur Erfassung chronischer Wirkungen und die Identifizierung toxisch wirksamer Kontaminanten (TIE). Die Anwendung der Testmethoden sind für die 3. Stufe vorgesehen und unter Baustein 2 zusammengestellt.

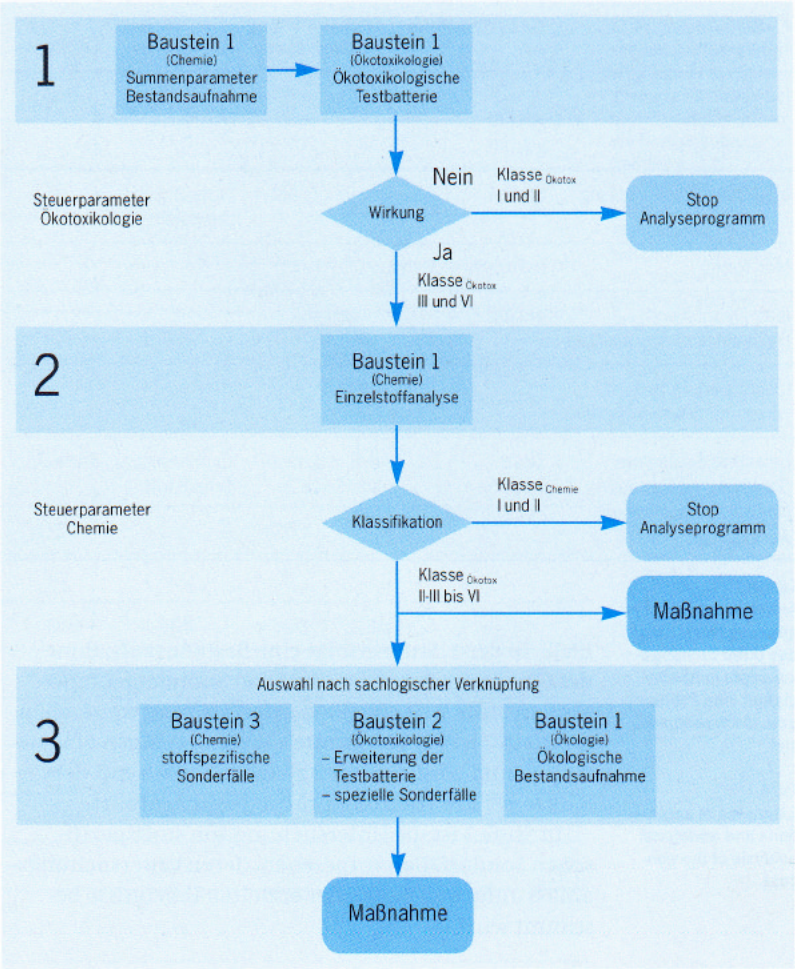


Abbildung 2: **Fließschema für das Untersuchungsprogramm, Erläuterung der Klassen siehe Kap. 5.**

Figure 2: **Flow chart of the analysis program. Classes are explained in chapter 5.**

Baustein 1:

Algenwachstumshemmtest (Eluat)	DIN 38412 L 33
Leuchtbakterientest (Eluat)	DIN 38412 L 34
Sedimentkontakttest (Gesamtsediment)	DIN-Entwurf

Baustein 2 (Erweiterung der Testbatterie)

Nematodentest (Gesamtsediment)	[17]
Chironomidentest (Gesamtsediment)	[18]
Lemna	[19]
Mutagenitätstest (Ames-Test)	[20]
Biotestgeleitete Extraktion	[21, 22]
Zelltest, akute Toxizität (RTG-2 Zellen)	[14, 15]
Fischeitest, Toxizität und Teratogenität Gesamtsediment)	[22, 23]
Tests zur Erfassung spezifischer Wirkungen Genotoxizität: Comet-Assay	[24, 25]
Endokrine Wirksamkeit: Dot-Blot-Assay Tests mit standorteigenen Organismen	[26]

4.4.2. Chemisch-analytische Verfahren

Die Untersuchungen sind mit genormten Verfahren durchzuführen. Das Untersuchungsprogramm orientiert sich an dem der ATV/HABAK [27] und der ARGE-

Wir machen Bodenschutz möglich ...

seit über 15 Jahren in mehr als

100 Gutachten und Projekten im Inland,

über 25 im Ausland sowie elf F+E-Vorhaben

für das UBA und den BMFT

KOMPETENZ und ERFAHRUNG

BSD Bodenschutzdienst für Städte und Gemeinden GmbH

ß B$_m$ Seminarzentrum Bodenschutz$_{mobil}$

bfb$_{++}$ büro für bodenbewertung Dr. Wolfram D. Kneib

Adresse: Rehsenweg 75 D 24148 Kiel

Telekommunikation via **AD+L** *Zentrale*

Tel. (0049) 0431 720500 – Fax.720540

e-mail ADL-Zentrale@t-online.de

Problem/ Untersuchungsziel	Vorgehensweise	Ergänzungen Ökotoxikologie	Chemie	Ökologie
Indikation chemisch biologisch	 gestuft gestuft			
allg. Qualitätsbeurteilung	Stufe 1		Stufe 2 zeitgleich	
Monitoring	individuell gestalten			
Identifikation von Belastungsschwerpunkten	gestuft			
Identifizierung toxisch wirksamer Kontaminanten		Stufe 3		
belastete Sedimente Sanierung im Gewässer Natural Attenuation mit Abdeckung	Stufe 1 zeitliche Betrachtung	evtl. ergänzen aus Stufe 2 oder 3	identifizierter Schadstoff	Stufe 3

Tabelle 1: **Anwendungs- und Ergänzungsvorschläge des Untersuchungskonzepts in Abhängigkeit vom Problem bzw. Untersuchungsziel**

Table 1: **Examples of applications and additional analysis of the concept.**

ELBE. In der 1. Stufe erfolgt eine Bestandsaufnahme des Gewässers durch Erheben von Summenparametern. In Stufe 2 ist eine Einzelstoffprüfung vorgesehen. Baustein 2 ist bei bestimmten Fragestellungen obligatorisch und wird dann zeitgleich in Stufe 1 mit dem Baustein 1 der Toxizitätsprüfung durchgeführt.

In Stufe 3 ist die Untersuchung von stoffspezifischen Sonderfällen vorgesehen, deren Untersuchungsanlass aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse bestimmt wird.

Baustein 1 (Bestandsaufnahme und Summenparameter)

pH-Wert	DIN 38414 S5, EN 12176
Trockensubstanzgehalt	DIN 38414 T 6
Organischer Kohlenstoff, gesamt (TOC)	DIN 38409 H 3
Korngröße	DIN 19683-2
Redoxpotential	
Gesamtphosphor	DIN 38414 S12
Gesamtstickstoff	Kjeldahl
Mineralölkohlenwasserstoffe	DIN 38409 H 18[1]
EOX	DIN 38414 S 17

[1] Die momentan gültige Norm mit IR-Spektroskopie wird durch eine Methode mit GC-FID ersetzt.

Klasse 1: sehr gering	alle Tests unter 20% Hemmung – statistisch ist dies die Grenze für eine Sicherheit des Nachweises von tatsächlich vorliegenden Effekten
Klasse 2: schwach	60 % der eingesetzten Tests unter 20–40%, davon mindestens 1 Test über 20% Hemmung, 1 Test < 20%
Klasse 3: mittel	mindestens 1 Test über 50% Hemmung, aber alle Biotests unter 80% Hemmung
Klasse 4: stark	mindestens 1 Test über 80% oder mindestens 60 % der eingesetzten Tests über 50% Hemmung
Klasse 5: extrem stark belastet	mindestens 3 Tests über 80% Hemmung

Tabelle 2: **Ökotoxikologische Klassifikationsschema (nach [16])**

Table 2: **Ecotoxicological classification scheme (acc. to [16])**

Baustein 2

Schwermetalle wie Pb, Cr, Cd, Cu, Zn, Ni, Hg	DIN 38406 S7 (Aufschluss)
und zusätzlich As	EN ISO 11885 E22 (ICP/AAS)
PAK-EPA	DIN 38414 F 18
PCB6	DIN 38414 S 20
HCH, HCB	DIN 38407 F 2
DDD, DDE	DIN 38407 F 2

Baustein 3

C/N	
CRS	
H_2S[2]	
TBT, TPT inkl. Metabolite	
o-Phosphat Mobilisierungsvermögen[3]	[28]
Sulfidbindungskapazität (AVS-SEM)	[29]
Säureneutralisierungskapazität	[30]
Xenoöstrogen wirksame Substanzen	[31]

4.4.3. Ökologische Verfahren

Die ökologische Analyse soll nachgeschaltet zu den ökotoxikologischen und chemisch-analytischen Untersuchungen angeschlossen werden. Bei der biozönotischen Strukturanalyse handelt es sich um ein schwieriges und komplexes Verfahren. Die Struktur eines Ökosystem kann darüber hinaus durch eine Vielzahl natürlicher Stressoren beeinflusst werden. Eine Interpretation und Bewertung der Daten ist bislang nicht allgemeingültig etabliert. Aus diesem Grunde ist eine ökologische Sedimentuntersuchung erst in der 3. Stufe als eine Option zur Informationsverdichtung angesiedelt. Bei konkreten Fragestellungen kann sie auch bereits in der Stufe 1 oder 2 durchgeführt werden.

Baustein 1

Analyse der Struktur der benthischen Biozönose
Analyse der Ökosystemstruktur

Bei der Untersuchung zur Sedimentqualität muss die Frage berücksichtigt werden, zu welchem Zweck die Untersuchung vorgenommen werden soll. In Abhängigkeit vom Untersuchungszweck wird die Vorgehensweise des Untersuchungsprogramms bestimmt. In der folgenden Tabelle sind schematisch Anwendungsvorschläge und entsprechende Vorgehensweisen und Ergänzungsvorschläge in Abhängigkeit vom Problem bzw. vom Untersuchungsziel dargestellt.

5. Bewertung

Stufe 1

Bei der Bewertung der Toxizitätsdaten werden sowohl die Einzelergebnisse als auch eine Integration der Wirkungen mit der Testbatterie berücksichtigt.

Zur Beurteilung der Resultate der Biotests (Baustein 1) wird folgende Klassifikation vorgeschlagen (betrachtet werden die Effekte der Originalprobe):

Hohe Toxizitäten in Einzelnachweisen können durch die Betrachtung der Verdünnungsstufe abgesichert werden. Als Ergebnis gilt der G-Wert. Dies ist der

[2] Momentane Frischwasser- und Meerwasserkriterien der US-EPA sind 2 µg/L H_2S und 35 µg/L NH_3 bei 25 °C und pH 8 [33].

[3] Die Zielvorgabe für Oberflächengewässer liegt bei 20 µg/l ortho-P (US-EPA).

Stoff [ng/g TS]	I	I–II	II (ZV)	II–III	III	III–IV	IV	V	VI
DDT, DDD, DDE, je	n.n.	< 20	< 40	< 100	< 200	< 400	> 400		
HCB	n.n.	< 5	< 40	< 100	< 200	< 400	> 400		
HCH-Isomeren, je	n.n.	< 5	< 60	< 20	< 50	< 100	> 100		
PCB-Kongenere, je	n.n.	< 2	< 5	< 10	< 25	< 50	> 50		
PAH (Summe EPA)* [µg/g TS]	< 1		1–4		4–10		10–20	20–35	> 35
MKW (DIN H 18)* [µg/g TS]	n.n.		50–250		250–500		500–1000	1000–2500	
AOX [µg/g TS]	n.n.	< 20	< 50	< 100	< 250	< 500	> 500		
TBT/TeBT je	n.n.	< 10	10– < 25	25– < 75	75– < 150	150–250	> 250		
Spurenmetalle [µg/g TS] < 20 µm	I**	I–II	II (ZV)	II–III	III	III–IV	IV	BLAK QZ ZV	
Hg	0.2–0.4	< 0.5	< 0.8	< 5	< 10	< 25	> 25	0,8	
Cd	0.2–0.4	< 0.5	< 1.2	< 5	< 10	< 500	> 25	1,2	
Pb	25–30	< 50	< 100	< 150	< 250	< 500	> 500	100	
Cu	20–30	< 40	< 60	< 150	< 250	< 500	> 500	80	
Zn	90–110	< 150	< 200	< 500	< 1000	< 2000	> 2000	400	
Cr	60–80	< 90	< 100	< 150	< 250	< 500	> 500	320	
Ni	10–30	< 40	< 50	< 150	< 250	< 500	> 500	120	
As	3–5	< 10	< 20	< 40	< 70	< 100	> 100	–	

* in Anlehnung an Umweltbehörde Hamburg
** Hintergrundwert der Elbe

Tabelle 3:
ATV-Klassifikationsschema (ARGE-Elbe), ergänzt um die Stoffgruppen PAK und MKW in Anlehnung an die Umweltbehörde Hamburg [33]

Table 3:
ATV Classification scheme (ARGE-Elbe) with additional compounds according to [33].

kleinste Wert des Verdünnungsfaktors G, in dessen Testansatz die Hemmung £ 20 % beträgt.

Eine Probe gilt bei Überschreitung folgender G-Werte als belastet:

Algenwachstumshemmtest: $G_A > 4$
Leuchtbakterientest: $G_L > 8$
Kontakttest: derzeit keine Empfehlung

Stufe 2

Als Klassifikationsgrundlage der chemisch-analytischen Daten wird das erweiterte Schema der Hamburger Strom- und Hafenbaubehörde angewandt, das in Tabelle 3 und 4 aufgeführt ist. Die Datenbasis für die Tabelle 4 stellen Sedimentanalysen der Havel, Spree, Ems und Weser, außerhalb des Einflussbereiches der Elbe, Mulde und Saale dar.

Als vorläufige Bewertungsmaßstäbe für die Sedimentbelastung dienen die bei der Baggertätigkeit subhydrischer Böden erfassten Daten und die Werte des ATV-Regelwerkes Abwasser und Abfall [2]. Einschränkend ist zu der vorläufigen Bewertung zu sagen, dass diese an den Grenz- und Richtwerten für Trinkwasser sowie akuten Wirkdaten für aquatische Lebewesen orientiert sind. Weder Langzeiteffekte, noch die Tatsache, dass die NOEC-Werte vieler Organismen unterhalb der Zielvorgabe liegen, werden ausreichend berücksichtigt.

Stoff [ng/g TS]	I	I–II	II (ZV)	II–III	III	III–IV	IV	V	VI
DDT, DDD, DDE, je	n.n	< 2	< 5	< 10	< 20	< 50	> 50		
HCB	n.n	< 2	< 5	< 10	< 20	< 50	> 50		
HCH-Isomeren, je	n.n	< 2	< 5	< 10	< 20	< 50	> 50		
PCB-Kongenere, je	n.n	< 2	< 5	< 10	< 20	< 50	> 50		
PAK (Summe EPA) [µg/g TS]	< 1		1–4		4–10		10–20	20–35	> 35
MKW (DIN H 18)* [µg/g TS]	n.n		50–250		250–500		500–1000	1000–2500	
TBT/TeBT, je	n.n	< 10	10– < 25	25– <75	75– <150	150–250	> 250		

Tabelle 4:
ATV-Klassifikationsschema (ARGE-Elbe) für organische Kontaminanten, modifiziert für nicht-elbespezifische Kontaminationen [34], ergänzt um die Stoffgruppen PAK und MKW in Anlehnung an die Umweltbehörde Hamburg [33]

Table 4:
ATV Classification scheme (ARGE-Elbe) with additional compounds according to [34], adapted to non Elbe River contaminated samples [34].

Die Konzentrationen der Klasse II als Zielvorgabe für Stoffe im Sediment haben den Charakter von Orientierungswerten und stellen keine Grenzwerte dar [33]. Welche Maßnahmen beim Überschreiten der Konzentrationen eingeleitet werden müssen, ist im Einzelfall zu entscheiden. Ein Handlungsbedarf ist gegeben.

Wann kann das Analysenprogramm gestoppt werden?
Nach der 1. Stufe:
In der Testbatterie werden keine Wirkungen nachgewiesen
($\leq$ Klasse$_{\text{Ökotoxikologie}}$ II).
Nach der 2. Stufe
Zielvorgabe erreicht ($\leq$ Klasse$_{\text{Chemie}}$ II)
Wenn die Zielvorgabe erreicht ist, aber in der 1. Stufe sehr deutliche Wirkungen nachgewiesen wurden (2 Tests über 80 % Hemmung), dies aber nicht erklärbar ist, muss dem Problem auf den Grund gegangen werden. Ist die Zielvorgabe nicht erreicht, der Kontaminant identifiziert, müssen entsprechende Maßnahmen ergriffen werden.

Maßnahmen:
- Sanierung
- Baggerung
- Subaquatische Deponierung mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen

Die Ergebnisse der Stufe 3 sind sehr komplex und müssen im Zusammenhang mit den Stufen 1 und 2 bewertet werden. Da die Methoden als Erweiterungsvorschläge je nach Resultaten verstanden werden, werden die Bausteine 3 nicht im Ganzen, sondern nur Teilbereiche untersucht, abhängig von den Untersuchungsergebnissen und der Fragestellung.

Ausblick:
Mit der vorgestellten Empfehlung soll eine wirkungsbezogene Aussage zur Gewässerbeurteilung anhand der Sedimentkontamination erreicht werden, die die Aufstellung von Sedimentqualitätskriterien ermöglicht. Nach erfolgreicher Validierung soll den mit dem Gewässerqualitätsmanagement beauftragten Institutionen ein Fließschema zur Beurteilung vorgeschlagen werden, dass z. T. aufwendige und teure Untersuchungsprogramme minimiert und gleichzeitig ein realistisches Bild der Gewässersituation liefert.

Die Untersuchung und Bewertung ist von ausgewiesenen Einrichtungen durchzuführen.

Danksagung
Wir danken Herrn Prof. Dr. Terytze (UBA) und Herrn Dr. Lay (DBU) für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit.

Literaturangaben

[1] **Zimmermann, R.-D.; Umlauf-Zimmermann, R. (1994):** Von der Bioindikation zum Wirkungskataster. USWF - Z. Umweltchem. Ökotox., 6, 50–54.
[2] **ATV-Regelwerk Abwasser-Abfall (1997):** Merkblatt ATV-M362, Teil 1: Umgang mit Baggergut; Bad Honnef.
[3] **Anlauf, A. (1995):** Ökotoxikologische Untersuchungen von Baggergut und Sedimenten im Bereich der neuen Bundesländer – Jahresbericht 1994; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz und Berlin.
[4] **Ingersoll, C.G.; Dillon, T.; Lick, W. (1997):** Ecological risk assessment of contaminated sediments; SETAC Special Publication Series, SETAC-PRESS, Pensacola, Florida.
[5] **DVWK (1999):** Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern; DVWK-Schriften, 128.
[6] **Dutka, B.; Walsh, K. Kwan, K.; el Shaarawi, A.; Liu, D.; Thopson, K. (1986):** Priory site selection for degraded areas based on microbial and toxicant screening tests; Water Poll. Res. J. Canada, 21, 267–282.
[7] **Ahlf, W. (1995):** Biotests an Sedimenten; In: Steinberg, Bernhard, Klapper: Handbuch Angewandte Limnologie; Ecomed Verlagsgesellschaft; Landsberg/Lech.
[8] **Wenzel, A.; Nenzda, M.; Hartmann, P.; Kanne, R. (1997):** Testbattery for the assessment of aquatic toxicity; Chemosphere, 35, 307–322.
[9] **Nusch, E. (1996):** Ökologische Parameter als Bewertungskriterien in der Ökotoxikologie; in: Frimmel, F.; Gordalla, B. (Hrsg.): Gewässergütekriterien, Ergebnisse eines Rundgesprächs; Deutsche Forschungsgemeinschaft; VCH Verlagsgesellschaft.
[10] **Karr, J. (1993):** Defining and assessing ecological integrity: beyond water Quality; Environ. Toxicol. Chem., 12, 1521–1531.
[11] **Ahlf, W. (1995):** Ökotoxikologische Sedimentbewertung; UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 84–91.
[12] **Kwan, K.; Dutka, B. (1990):** Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays; Toxicity Assessment, 5, 395–404.
[13] **Kelsey, J.; Alexander, M. (1997):** Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds; Environ. Toxicol. Chem., 16, 582-585.
[14] **Hollert, H.; Braunbeck, T. (1997):** Ökotoxikologie in vitro – Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoffen; Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Veröff. PAÖ, 21, 1–189
[15] **Hollert, H.; Dürr, M.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. (2000):** Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood; Environ. Toxicol. Chem. 19, 528–534.
[16] **Ahlf, W.; Gratzer, H. (1998):** Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe; UBA-Texte 41/99.
[17] **Traunspurger, W.; Haizer, M.; Höss, S.; Beier, S.; Ahlf, W.; Steinberg, C. (1997):** Ecotoxicological Assessment of Aquatic Sediments with Caenorhabditis elegans Maupus (Nematoda) - A new method for

Im Februar 2001 wird die

Einbanddecke

für den Jahrgang 2000 der Fachzeitschrift

Bodenschutz

ausgeliefert. Preis je Einbanddecke DM 23,–/€ 11,76/ öS 168,–/sfr. 21,–, zuzgl. Versandkosten. Es können jedoch nur etwa so viele Einbanddecken angefertigt werden, wie Bestellungen vorliegen.

Wir bitten Sie deshalb, Ihre Bestellung möglichst umgehend aufzugeben, damit die pünktliche Lieferung sichergestellt ist.

Prüfen Sie die Ihnen vorliegenden Hefte des Jahrgangs 2000 auf ihre Vollständigkeit und bestellen Sie fehlende Hefte nach. Preis je Heft DM 21,–/€ 10,34/öS 153,–/sfr. 19,– für Abonnenten (Lieferungsmöglichkeit vorbehalten).

ESV ERICH SCHMIDT VERLAG
Berlin Bielefeld München
www.erich-schmidt-verlag.de
e-mail: esv@esvmedien.de
www.umweltonline.de

testing liquid medium and whole sediment samples; Environ. Toxicol. Chem., 16, 245–250.
[18] **ASTM – American Society for Testing and Materials (1994)**: ASTM/E 1383–94 – Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates.
[19] **EPA (1996)**: Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850440, Aquatic toxicity test using Lemna ssp. Tiers I and II, Public draft.
[20] **Dürr, M.; Hollert, H.; Erdinger, L. (1999)**: Bakterien-Kurzzeittest zur Bestimmung des genotoxischen Potentials von Wasser, Schwebstoffen und Sedimenten; In: Kern, U.; Westrich, B. (Hrsg.): Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern; DVWK-Schriften, 128, Bonn, 263–267.
[21] **Brack, W.; Altenburger, R.; Ensenbach, U.; Möder, M.; Segner, H.; Schüürmann, G. (1999)**: Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediments in the industrial region of Bitterfeld (Germany) – A contribution to hazard assessment; Arch. Environ. Cont. Toxicol., 37, 164–174.
[22] **Hollert, H.; Karaus, U.; Dürr, M.; Winn, N.; Siebert, I.; Wetterauer, B.; Rudolf, M.; Brack, W.; Haag, I.; Engwall, M.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. (2000)**: Integrierte Sedimentuntersuchungen und Bioassay-dirigierte Fraktionierungen – Zwei Konzepte zur Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg (Ö 97 004); In: Horsch, F.; Filby, W.; Gross, S.; Krug, H. (Hrsg.): Diskussionskreis „Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe", Diskussionskreise beim Statusseminar BWPLUS; online unter http://bwplus.fzk.de/
[23] **Ensenbach, U. (1998)**: Embryonic development of fish – A model to assess the toxicity of sediments to vertebrates; Fres. Environ. Bull., 7, 531–538.
[24] **Berbner, T.; Rahman, N.; Braunbeck, T. (1999)**: Induction of P450 1A and DNA damage in isolated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) heparocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; Biomarkers, 4, 214–228.
[25] **Schnurstein, A.; Froschauer, A.; Tischmeyer, A.; Braunbeck, T. (1999)**: Die Einzelzellgelektophorese (Comet-Assay) zum Nachweis des genotoxischen Potentials von Umweltproben; In: Kern, U.; Westrich, B. (Hrsg.): Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern; DVWK-Schriften, 128, Bonn, 274–281.
[26] **Islinger, M.; Pawlowski, S.; Hollert, H.; Völkl, A.; Braunbeck, T. (1999)**: Measurement of vitellogenin mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNAse protection-assay; Science of the Total Environ., 233, 109–122.
[27] **ATV-Regelwerk Abwasser-Abfall (1998)**: Merkblatt ATV-M 362, Teil 3: Hinweise zum Untersuchungsprogramm; Bad Honnef.
[28] **Hupfer, M.; Steinberg, C. (1997)**: Auswirkungen von Restaurierungsverfahren auf den Phosphat-Rückhalt in Seesedimenten; DGM 41, 6, 238–245.
[29] **Howard, D.; Evans, R. (1993)**: Acid-volatile sulfide (AVS) in a seasonally anoxic mesotrophic lake: Seasonal and spatial changes in sediment AVS; Environ. Toxicol. Chem., 12, 1051–1057.
[30] **Förstner, U. (1989)**: Contaminated sediments; Lecture notes in Earth Sciences, 21.
[31] **Holtey-Weber, R.I.; Färber, H.A.; Schöler, H.F. (1999)**: On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS. Vom Wasser, in Druck.
[32] **Wang, F.; Chapman, P. (1999)**: Biological implications of sulfide in sediment – a review focusing on sediment toxicity; Environ. Toxicol. Chem, 18, 2526–2532.
[33] **Maaß, V.; Schmidt, C.; Lüschow, R.; Leitz, T. (1997)**: Sedimentuntersuchungen im Hamburger Hafen 1994/1995; Ergebnisse aus dem Baggeruntersuchungsprogramm, Heft 6.
[34] **Ricking, M.; Pachur, H-J. (1999)**: Methodisches Konzept zur vergleichenden Messung von chlorierten Kohlenwasserstoffen in Sedimenten als Entscheidungsbasis für Sanierungsmaßnahmen; Abschlußbericht DBU AZ 06936.

Anschrift der Verfasser

Dr. Helga Neumann-Hensel
Dr. Fintelmann und Dr. Meyer
Handels- und Umweltschutzlaboratorien GmbH
Mendelsohnstraße 15 D, 22761 Hamburg

Mathias Ricking
FU Berlin
ENOG
FB Geowissenschaften
Maltheserstraße 74–100, Haus B, 12149 Berlin

Henner Hollert
Universität Heidelberg
Zoologisches Institut I
AG Aquatische Ökotoxikologie
Im Neuenheimer Feld 230, 69121 Heidelberg

Dr. Wolfgang Ahlf
Technische Universität Hamburg-Harburg
Arbeitsbereich Umweltschutztechnik
Eißendorferstraße 40, 21071 Hamburg

Bodenkunde

ecoTech

ecoTech Umwelt-Meßsysteme GmbH
Siemensstraße 8
D-53121 Bonn
Fon (0228) 61 47 99
Fax (0228) 61 48 86
www.ecoTech-Bonn.de

- Glas-Saugkerzen
- Kunststoff-Saugkerzen
- Glas-Laborsäulen
- TDR/FDR/TDT-Geräte
- Tensiometer/-Logger
- Bohrausrüstung
- Monitoring-Stationen

ÖKOLOGIE · METEOROLOGIE · HYDROLOGIE · BODENKUNDE

Klicken Sie doch mal auf

www.umweltonline.de

Der Umwelt-Fachinformationsdienst aus dem Erich Schmidt Verlag – ständig aktuelle und informative Online-Daten zum Deutschen Umweltrecht für Fachleute aus Forschung und Praxis.

ESV ERICH SCHMIDT VERLAG Berlin Bielefeld München
www.erich-schmidt-verlag.de
e-mail:esv@esvmedien.de

Neuauflage

Vollmachten im Unternehmen

Handlungsvollmacht – Prokura – Generalvollmacht

Von Dr. REIMER SPITZBARTH, Rechtsanwalt, und Dr. NICOLA PREUß, Wiss. Ass. am Lehrstuhl für Zivilprozessrecht, Bürgerliches Recht und Arbeitsrecht, Ruhr-Universität Bochum
4., völlig überarbeitete Auflage 2000, 158 Seiten, 14,4 x 21 cm, kart., DM 49,80/€ 25,46/öS 364,-/sfr. 46,-. ISBN 3 503 05864 8
Grundlagen und Praxis des Wirtchaftsrechts, Band 4

Dieses nun bereits in 4. Auflage erscheinende Buch erläutert die Voraussetzungen und Rechtsfolgen der rechtsgeschäftlichen Stellvertretung. Darüber hinaus werden die dem Kaufmann zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Bevollmächtigung – von den verschiedenen Formen der Handlungsvollmacht über die Prokura bis zur gesetzlich nicht geregelten Generalvollmacht – vorgestellt und ihre rechtlichen Probleme erörtert.

Bitte fordern Sie ausführliche Informationen unter der Fax-Nr. 030 / 25 00 85 19 an.

ESV ERICH SCHMIDT VERLAG Berlin Bielefeld München
www.erich-schmidt-verlag.de
e-mail:esv@esvmedien.de