

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplombiologe Steffen Keiter
aus: Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 2007

Der Fischrückgang in der Donau – Ein Modell zur Bewertung der Belastung von Sedimenten

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck
Zoologisches Institut, Universität Heidelberg
Prof. Dr. Heinz Karrasch
Institut für Geographie, Universität Heidelberg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg im Zeitraum von September 2003 bis September 2007 erstellt und von der Bundesanstalt für Gewässerkunde und dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst gefördert. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die aktiv oder passiv zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sollte ich jemanden vergessen haben, so möge er mir das bitte nachsehen, denn es war sicherlich nicht böse gemeint.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thomas Braunbeck für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit hier am Zoologischen Institut in Heidelberg anzufertigen. Er hat mir immer den nötigen Freiraum dafür gelassen, die vorliegende Arbeit nach meinen Vorstellungen durchzuführen und meine eigenen Gedanken und Ideen zu entwickeln. Außerdem möchte ich mich für viele hilfreiche Tipps, Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bedanken möchte ich bei Herrn Prof. Dr. Karrasch für die Übernahme des Korreferats.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Henner Hollert für seine intensive Betreuung während der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Außerdem dafür, dass er mir die Möglichkeit geboten hat internationale Erfahrungen auf Konferenzen und in anderen wissenschaftlichen Institutionen zu sammeln. Letztendlich auch für die Herstellung sehr guter und nachhaltiger Kontakte, insbesondere nach Schweden.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Melanie Böttcher, Stefanie Grund und Nadja Seitz für ihr sehr großes Engagement und die exzellente Arbeit bedanken, wodurch diese Studie in diesem Umfang erst möglich wurde.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karl Wurm für die Unterstützung bei der Probennahme und seine Hilfsbereitschaft.

Bei Susanne Heise möchte ich mich für die große Hilfe bei der Einarbeitung in Fuzzy-Logik bedanken.

Bei Helena Olsman, Magnus Engwall und Bert van Bavel möchte ich mich für die unkomplizierte Bereitstellung ihrer Räumlichkeiten an der Universität Örebro und für viele der Experimente aus dieser Dissertation sowie einer sehr schönen Zeit in Schweden bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen eifrigen Korrekturlesern Eva Lammer, Thomas Wehe und Nina Haink. Eva Lammer möchte ich ganz besonders für ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihr `offenes Ohr´ danken.

Bei allen die einen Teil ihres Lebens am Zoologischen Institut verbringen oder verbracht haben möchte ich mich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken; namentlich sind das besonders: Gisela Adam, Lisa Baumann, Miriam Beigel, Conny Bernecker, Bernhard Glass, Nina Haink, Susanne Knörr, Philipp Kremer, Thomas Kosmehl, Eric Leist, Gabriele van der Linden, Jens Otte,

Michael Reuscher, Paula Soares Rocha, Emanuela Rota, Kerstin Schaudt, Florian Schmidt, Thomas-B. Seiler, Jan Wölz und Hanno Zielke.

Mein großer Dank gilt meiner Familie die mich stets sehr stark unterstützt hat und besonders auch in schwierigen Zeiten immer für mich da war.

Susanne jag älska dig! Tack så mycket för öm hjälp.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Hintergründe zum Fischrückgang an der oberen Donau	3
1.1.1 Fischbestände	4
1.1.2 Prädation durch fischfressende Vögel	5
1.1.3 Morphologische Situation der oberen Donau	5
1.1.4 Nährtierbestand	5
1.1.5 Belastung durch organische Schadstoffe	6
1.1.6 Entwicklung der Gewässergüte	7
1.2 Ursachen von Gewässerverschmutzung und Sedimentbelastung	10
1.3 Integrative Bewertung von Fließgewässern in der Ökotoxikologie	11
1.4 Eingesetzte Methoden zur integrativen Bewertung der Donau	14
1.4.1 Chemische Analysen	14
1.4.2 <i>In vitro</i> -Biotestbatterie	16
1.4.3 <i>In vivo</i> - und <i>In situ</i> -Untersuchungen	20
1.4.4 Limnologische Untersuchungen	21
1.5 Bewertung biologischer Wirkdaten	21
1.6 Untersuchungsziele und Fragestellung	22
2. Material und Methoden	25
2.1 Sedimente	25
2.1.1 Probennahme	25
2.1.2 Probenaufbereitung	25
2.1.3 Multilayer-Fraktionierung	26
2.2 Chemische Analysen	27
2.2.1 Kohlenstoffgehalt	27
2.2.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	28
2.2.3 Polychlorierte Biphenyle, Dioxine und Furane	28
2.2.4 Schwermetalle	28
2.3 <i>In vitro</i> -Untersuchungen	29
2.3.1 Ames-Test	29
2.3.2 Bakterienkontakttest mit <i>Arthrobacter globiformis</i>	30
2.3.3 Fischeitest mit <i>Danio rerio</i>	32
2.3.4 Zellkultur	36

2.3.5	Cytotoxizitätstest/Neutralrottest	37
2.3.6	Testverfahren zur Ermittlung der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit	38
2.3.6.1	EROD-Assay	38
2.3.6.2	DR-CALUX-Assay	39
2.3.6.3	GPC.2D-Assay	40
2.3.7	Tests zur Bestimmung der Gentoxizität und Mutagenität im eukaryotischen System	41
2.3.7.1	Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen und <i>Danio rerio</i>	41
2.3.7.2	Mikronukleustest mit der Zelllinie RTL-W1	42
2.4	<i>In vivo</i> - und <i>In situ</i> -Testverfahren	43
2.4.1	Elektronenmikroskopie	43
2.4.2	Mikronukleustest mit Erythrocyten aus der Barbe	46
2.5	Limnologische Untersuchungen	47
2.6	Statistische Methoden und Bewertungsverfahren	49
2.6.1	Mittelwertvergleiche	49
2.6.2	Regression und Korrelation	51
2.6.3	Chi-Quadrat-Test	52
2.6.4	Methoden zur Bewertung/Klassifizierung der Biotestergebnisse	52
2.6.4.1	Variabilität der Biotestverfahren	52
2.6.4.2	Toxizitätsstufen der Biotestverfahren	53
2.6.4.3	Statistische Bewertungsmethoden	54
3.	Weight-of-Evidence Studie in der Donau	57
3.1	Die Probenstandorte und ihre hydromorphologische Charakterisierung	57
3.2	Chemische Analyse von prioritären Schadstoffen	60
3.2.1	Physikalische und limnochemische Parameter	61
3.2.2	Belastung mit organischen Schadstoffen	65
3.2.3	Kohlenstoffgehalt der Sedimentproben	68
3.2.4	Schwermetallbelastung der Sedimente	69
3.3	Bakterientoxizität mit <i>Arthrobacter globiformis</i>	71
3.3.1	Bakterienkontakttest mit nativen Sedimenten	72
3.3.2	Bakterienkontakttest mit Sedimentextrakten	73
3.3.3	Vergleich der beiden Expositionspfade	74
3.4	Cytotoxizität im Neutralrottest mit der Zelllinie RTL-W1	76
3.4.1	Cytotoxizität der Sedimentextrakte und der Multilayer-Fraktion	77
3.4.2	Vergleich der Cytotoxizität zwischen Donau, Rhein und Neckar	77
3.4.3	Vergleich Cytotoxizität und PAH-Kontamination	78
3.5	Embryotoxizität und Teratogenität im Fischeitest mit <i>Danio rerio</i>	80
3.5.1	Embryotoxizität der verschiedenen Kontrollen	81

3.5.2	Embryotoxizität der Sedimentextrakte	81
3.5.3	Embryotoxizität der nativen Sedimentproben	86
3.5.4	Sauerstoffzehrung im Fischeitest mit nativen Sedimenten	92
3.5.5	Vergleich der beiden Expositionspfade (natives Sediment vs. acetonisches Extrakt)	93
3.5.6	Korrelation zwischen chemischer Analyse und Embryotoxizität	95
3.5.7	Vergleich der Donau mit anderen Flusssystemen	96
3.6	Dioxin-ähnliche Wirksamkeit	98
3.6.1	Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der verschiedenen Proben	99
3.6.2	Chem-TEQs - Anteil der Induktion im Biotest	100
3.6.3	Bewertung der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit	103
3.6.4	Schlussfolgerungen	105
3.7	Mutagenität im Ames-Test	107
3.7.1	Ergebnisse im Ames-Test	108
3.7.2	Bewertung der Mutagenität der Donauproben	111
3.8	Gentoxizität und Mutagenität in eukaryotischen Systemen	113
3.8.1	Mutagenität im Mikrokerntest	114
3.8.1.1	Mikrokerntest <i>in vitro</i> mit der Zelllinie RTL-W1	114
3.8.1.2	Mikrokerntest <i>in vivo</i> mit Erythrocyten aus der Barbe	117
3.8.1.3	Vergleich <i>In vivo</i> - und <i>In vitro</i> -Mikrokerninduktion	119
3.8.2	Gentoxizität im Comet-Assay	120
3.8.2.1	Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1	120
3.8.2.2	Comet-Assay mit Embryonen von <i>Danio rerio</i>	121
3.8.2.3	Bewertung der gentoxischen Effekte im Comet-Assay	122
3.8.2.4	Vergleich der beiden eingesetzten Comet-Assay-Varianten	125
3.8.3	Korrelation zwischen Gentoxizität/Mutagenität und PAH-Konzentrationen	126
3.8.4	Beurteilung des gentoxischen und mutagenen Potentials der Donau(-sedimente)	127
3.9	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	130
3.9.1	Gewicht und Länge der Versuchstiere	130
3.9.2	Bewertung und Interpretation der ultrastrukturellen Befunde	131
3.9.3	Gesamtbeurteilung der ultrastrukturellen Veränderungen	139
3.10	Gesamtbewertung des ökotoxikologischen Belastungspotentials der Donau im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes	141
3.10.1	Standortbezogenen Bewertung der Donau	141
3.10.2	Statistische Bewertung der Belastung der Donau	148
3.10.3	Der Fischrückgang in der Donau und die Europäische Wasserrahmenrichtlinie	151

4.	Klassifizierung von Sedimenten unter Verwendung eines Fuzzy-Logik-Expertensystems	153
4.1	Toxizitätsstufen und Variabilität der Biotests _____	154
4.1.1	Vergleich der Verfahren zur Bestimmung der linguistische Variablen _____	155
4.1.2	Variabilität der <i>In vitro</i> -Testsysteme _____	157
4.1.3	Zugehörigkeitsfunktionen _____	160
4.2	Regelbasis der Fuzzy-Logik _____	162
4.3	Ergebnisse der Klassifizierung mittels der Fuzzy-Logik _____	164
4.4	Berücksichtigung der ökologischen Relevanz in der Klassifizierung _____	166
4.5	Bewertung der Klassifizierung von Sedimenten mittels der Fuzzy-Logik _____	168
5.	Literatur	171

Abkürzungen

4-NQO	4-Nitroquinolin- <i>N</i> -oxid	TC	Total Carbon
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor	TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -Dioxin
AIP	AhR Interacting Protein	TEF	TCDD Equivalent Factor
AOX	Absorbierbare organisch gebundene Halogene	TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
ARNT	AhR Nuclear Translocator	TEQ	TCDD Equivalent Concentration
ATV	Abwassertechnischen Vereinigung e.V.	TIC	Total Inorganic Carbon
BfG	Bundeanstalt für Gewässerkunde	TIE	Toxicity Identification Evaluation
BMU	Bundesministerium für Umwelt	TOC	Total Organic Carbon
BP	Boxplot	WOE	Weight-of-Evidence
BSB5	Biochemischer Sauerstoff-Bedarf		
CDI	Concentration Depent Induction Factor		
DCM	Dichlormethan		
DCP	3,5 Dichlorphenol		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DRE	Dioxin-Responsive-Element		
EC	Effect Concentration		
EDA	Effekt-dirigierte Analyse		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EPA	Environmental Protection Agency		
EROD	7-Ethoxresorufin- <i>O</i> -Deethylase		
EU-WRRL	Europäische Wasserrahmenrichtlinie		
EV	Empirisches Verfahren		
FKS	Fötale Kälberserum		
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution		
HCB	Hexachlorbenzol		
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography		
HSP	Heat Shock Protein		
IF	Induktionsfaktor		
L15	Leibovitz Medium		
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser		
LfU	Landesanstalt für Umweltschutz		
LMA	Low Temperature Melting Agarose		
LOE	Line-of-Evidence		
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration		
MEM	Minimal Essential Medium		
MF	Multilayer-Fraktion		
mt	moderat-toxisch		
NMA	Normal Temperature Melting Agarose		
NR	Neutralrotretention		
nt	nicht-toxisch		
OD	Optische Dichte		
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe		
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PCB	Polychlorierte Biphenyle		
PCDD	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -Dioxine		
PCDF	Polychlorierten Dibenzofurane		
REP	Relative Potency Factor		
rER	raues endoplasmatisches Reticulum		
r_p	Korrelationskoeffizient nach Pearson		
r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman		
RTL	Rainbow Trout Liver		
SEQ	Sedimentäquivalent		
sER	glattes endoplasmatisches Reticulum		
t	toxisch		

As far as the laws of mathematics refer to reality, they are not certain, and as far as they are certain, they do not refer to reality!

Albert Einstein

Zusammenfassung

Die Fischbestände in der Donau zwischen Sigmaringen und Ulm sind trotz bestandsstützender Maßnahmen und einer verbesserten Wasserqualität seit Ende der 80er Jahre stark rückläufig. In einer Pilotstudie konnte für Sedimente aus der Donau ein hohes ökotoxikologisches Belastungspotential festgestellt werden. Als Folge dieser Ergebnisse wurde eine Weight-of-Evidence-Studie initiiert, um mögliche Ursachen des Fischrückgangs und Belastungsschwerpunkte zu identifizieren. Hierfür wurde in einer umfangreichen Biotestbatterie das Schädigungspotential von Sedimentextrakten und nativen Sedimenten überprüft. Außerdem wurden ultrastrukturelle Veränderungen an der Leber aus Barben untersucht. Mutagene Effekte in Barben wurden mittels des Mikrokerntests an Erythrocyten bestimmt. Zur Erfassung des Makrozoobenthos, wurden im jahreszeitlichen Verlauf dreimal deren Bestände aufgenommen. Des Weiteren wurden neben limnologischen Parametern auch die Konzentration von Schwermetallen und prioritärer organischer Schadstoffe (PAHs, PCBs und PCDD/Fs) in Sedimenten gemessen.

Durch die Messung der limnologischen Parameter konnte die Donau weitestgehend der Gewässergüte II zugeordnet werden. Auch der Gehalt der Schwermetalle ging im Vergleich zu früheren Jahren deutlich zurück (Güteklasse I oder I-II). Bei der Belastung mit organischen Substanzen erreichten die Mehrzahl aller Standorte die ATV-Güteklassen I oder II. Überraschend hohe PAH-Konzentrationen wurden in den Sedimenten aus dem Zufluss Schwarzach (Güteklasse V) und dem Öpfinger Stausee (Güteklasse III) gemessen. Bei der Ermittlung der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit (DR-CALUX- und EROD-Assay) konnte jedoch festgestellt werden, dass ein Großteil der hohen Induktion durch unbekannte, nicht-prioritäre Schadstoffe verursacht wurde. Auch in allen anderen *In vitro*-Tests, wie dem Neutralrottest und Fischeitest, konnten sehr hohe Effekte beobachtet werden, die teilweise sogar das ökotoxikologische Potential des Rheins erreichten. Insbesondere im Fischeitest konnte eine deutliche Entwicklungsverzögerung nach Exposition mit nativen Sedimenten beobachtet werden. Hierbei wurden zwei Expositionsszenarien gegenübergestellt und insgesamt eine höhere genotoxische Belastung für Sedimentextrakte als für native Proben nachgewiesen. Im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen und embryonalen Zellen von *Danio rerio* konnte eine sehr hohe Genotoxizität festgestellt werden. Diese Belastung ist auch im Zusammenhang mit den hohen PAH-Konzentrationen zu interpretieren, die mit den Testergebnissen aus dem Comet-Assay gut korrelieren. Des Weiteren konnten die Ergebnisse im *In vitro*-Mikrokerntest sehr gut auf die *In vivo*-Ergebnisse mit Barben-Erythrocyten übertragen werden, was deren hohe ökologische Relevanz zur Bewertung der Donau unterstreicht. Die stark ausgeprägten ultrastrukturellen Störungen der Hepatocyten von Barben aus Ehingen und Rottenacker manifestierten sich in fast allen Zellstrukturen. Aus den Untersuchungen aller Standorte ergibt sich eine sehr heterogene Belastungssituation an der Donau. Die Ergebnisse lassen jedoch die Identifizierung einzelner „Hot Spots“ bzw. gering belasteter Standorte zu. So konnte für die Sedimente aus der Lauchert, Riedlingen und Jochenstein meist keine oder nur geringe Effekte festgestellt werden. Dagegen wurde für die Schwarzach sowie für die Standorte Rottenacker, Ehingen und den Öpfinger Stausee eine sehr hohe ökotoxikologische Belastung nachgewiesen. Für Sigmaringen aber auch Ehingen ergab sich ein inhomogenes Belastungsmuster. Insbesondere durch die aufgenommenen *In vivo*- und *In situ*-Parameter konnten die Ergebnisse der *In vitro*-Tests weitestgehend bestätigt werden.

Die in dieser Weight-of-Evidence-Studie verwendeten Tests bzw. die Kombination der verschiedenen Lines-of-Evidences stellen ein sehr gut geeignetes Konzept dar, um nachzuweisen, dass an der Donau eine erhebliche ökotoxikologische Belastungssituation vorliegt, die auch sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Fischpopulationen nimmt. In Hinblick auf die europäische Wasserrahmenrichtlinie muss davon ausgegangen werden, dass die obere Donau den geforderten ökologisch guten Zustand zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erreicht. Daraus leitet sich auch ein dringender Handlungsbedarf ab, um der Forderung der WRRL gerecht zu werden und das Ökosystem Donau in seiner Gesamtheit zu schützen sowie eine weitere Verschlechterung zu vermeiden.

Im zweiten Teil dieser Studie wurde durch ein Fuzzy-Logik Expertensystem ein ortsunabhängiges Klassifizierungskonzept zur Bewertung von Sedimenten entwickelt. Hierbei wurden zunächst verschiedene mathematische Verfahren (Normalverteilung, Normalisierung, Boxplot- und empirisches Verfahren) verwendet, um die Daten ausgewählter *In vitro*-Tests in drei Toxizitätsstufen zu unterteilen. Hierbei wurden sowohl das Boxplot als auch das empirische Verfahren favorisiert, da sie die Möglichkeit bieten, die Sensitivität der Biotests gegenüber komplexen Umweltproben zu berücksichtigen. Des Weiteren wurde zur Bildung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs für die Fuzzy-Logik, die Variabilität der Biotests herangezogen. Hierfür wurden die testspezifischen Positiv- und/oder Negativkontrollen verwendet und mittels mathematischer Verfahren der graduelle Zugehörigkeitsbereich bestimmt. Um der ökologischen Relevanz der verschiedenen Tests in der Klassifizierung Rechnung zu tragen, wurden die Toxizitätsstufen der Testverfahren entsprechend ihrem biologischen Organisationsniveau angepasst. Dadurch konnte ein Klassifikationsmodell entwickelt werden, das die inhärenten epistemischen und linguistischen Unsicherheiten von ökotoxikologischen Biotests (Reaktionsspektrum und Variabilität der Biotests sowie deren ökologische Relevanz) berücksichtigt.



1. Einleitung

In der Bewertung von aquatischen Ökosystemen und den Folgen anthropogener Gewässerverschmutzung dominierten in der Vergangenheit chemische Untersuchungen. Allein aufgrund der Vielzahl der zu untersuchenden Zielsubstanzen müssen jedoch rein chemische Analysen unvollständig bleiben (Chapman et al. 2002, Chapman & Hollert 2006). Auch bleiben Fragen der Bioverfügbarkeit, Metabolisierung und Interaktion der Chemikalien in Abhängigkeit wechselnder Umweltbedingungen durch die reine chemische Analytik unbeantwortet. Daher haben sich seit einigen Jahren ökotoxikologische Testverfahren etabliert, um die Belastungssituation in Gewässern exakter abbilden zu können, da sie beispielsweise auch Effekte unbekannter Substanzen integrieren aber auch synergetische und antagonistische Wechselwirkungen chemischer Verbindungen berücksichtigt werden (Arcaro et al. 1998, Billiard et al. 2006, White 2002). Zum Zweck einer umfassenden ökotoxikologischen Beurteilung aquatischer Systeme müssen außerdem nach Chapman et al. (1992) Freilanduntersuchungen integriert werden, da sie die Situation *in situ* wiedergeben. In der vorliegenden Studie sollen daher im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt werden:

- (1) mittels eines integrativen Bewertungskonzepts (Weight-of-Evidence-Ansatz) das ökotoxikologische Schädigungspotential der oberen Donau zu untersuchen, um mögliche Ursachen des Fischrückgangs und Belastungsschwerpunkte zu identifizieren;
- (2) ein Bewertungssystem zu entwickeln, dass es ermöglicht, mit Hilfe von Mechanismus-spezifischen Biotestergebnissen Sedimente nach ökotoxikologischen Gesichtspunkten zu klassifizieren.

1.1 Hintergründe zum Fischrückgang an der oberen Donau

Seit einigen Jahren wird in verschiedenen Flüssen in Europa, USA und Kanada ein Rückgang von Fischpopulationen beobachtet (Burkhardt-Holm et al. 2005, Cook et al. 2003, de Lafontaine et al. 2002, Faller et al. 2003, Keiter et al. 2006). Insbesondere in der Schweiz betrug die Differenz im Gesamtfischbestand zwischen 1991 und 1996 bis zu 85 % (Bernet & Burkhardt-Holm 2000). Um die Ursachen dieses Phänomens aufzuklären, wurde 1998 das Projekt „Fischnetz“ initiiert (Burkhardt-Holm & Segner 2002, Schmidt et al. 1999). Innerhalb eines Zeitraums von fünf Jahren sollte der Rückgang der Fischereierträge dokumentiert, die Gründe dafür aufgeklärt und Methoden entwickelt werden, um die Situation zu verbessern (Burkhardt-Holm & Segner 2002). Im Abschlussbericht (Fischnetz 2004, Burkhardt-Holm et al. 2005) des Projekts wurden drei Hauptgründe für den Rückgang der Fischbestände genannt: (1) unangepasste Bewirtschaftungsmaßnahmen (falsche Menge, Alter, Genetik usw. von Fischen), (2) infektiös bedingte Erkrankungen, vor allem die proliferative Nierenkrankheit und (3) schlechte Habitatqualität, wie beispielsweise fehlende Unterstände, Laichgebiete, Ruhe- und Schutzzonen für die unterschiedlichen Lebensstadien, ungenügende Nahrung und chemische Verschmutzung bzw. Abwasserbelastung. Bei der Ursachenanalyse in den verschiedenen Fließgewässern der Schweiz konnte jedoch gezeigt werden, dass keiner der untersuchten Einzelfaktoren für den Fischfangrückgang allein verantwortlich gemacht werden konnte.

Seit den 80er Jahren ist die Entwicklung der Fischbestände in allen von Fischereivereinen bewirtschafteten Donauabschnitten zwischen Sigmaringen und Ulm ebenfalls stark rückläufig (Keiter et al. 2006, Wurm 2001). So betrug der angelfischereiliche Nettoertrag zu Beginn der 80er Jahre in den meisten Gewässerabschnitten noch zwischen 20 und 50 kg/ha. Er sank zu Beginn der 90er Jahre auf einen Wert von unter 20 kg/ha und ging im Jahr 2000 auf fast Null zurück (Wurm 2001). Im

vergleichbaren Zeitraum verbesserten sich jedoch, durch den Neu- und Ausbau von Kläranlagen entlang der Donau und ihrer Zuflüsse die Wasserqualität und damit die Gewässergüte nach der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA 1998). In den folgenden Abschnitten sollen bisherige Untersuchungen in der oberen Donau vorgestellt und zusammengefasst werden, die sich mit der Entwicklung der Gewässergüte und möglichen Ursachen zum Fischrückgang in der oberen Donau beschäftigten. Diese Untersuchungen stellen im Gegensatz zu dem Projekt Fischnetz lediglich einzelne, kleinere Projekte dar, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Ihr Schwerpunkt richtete sich überwiegend auf die Entwicklung der Gewässergüte. Im Jahr 2000 wurde von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) der Fischrückgang in der oberen Donau intensiv untersucht und dokumentiert. Im Anschluss daran wurde in Kooperation mit dem Institut für Zoologie der Universität Heidelberg eine Pilotstudie initiiert, die mit Hilfe verschiedener *In vitro*-Biotestverfahren feststellen sollte, ob eine ökotoxikologische Belastung in den Donausedimenten vorliegt (Keiter et al. 2006).

1.1.1 Fischbestände

Die Donau bildet zwischen Sigmaringen und Ehingen ein Übergangsgebiet zwischen Äschen- und Barbenregion (Gebhardt 1995). Neben diesen beiden Fischarten, die auch in vergangenen Zeiten zu den häufigsten Fischarten in der Donau zählten, waren auch Nase (*Chondrostoma nasus*), Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Rotauge (*Rutilus rutilus*) dominierend. Im Jahr 1990 konnten in der Donau zwischen Zwiefaltendorf und Ulm 35 Fischarten registriert werden, wovon 6 Arten (z.B. *Anguilla anguilla*) nicht heimisch sind und durch Besatz der Fischereiverbände in die Donau gelangt waren. Nach historischen Angaben (Schulz & Troschel 1990) wurden ehemals jedoch 39 Fischarten in der Donau beschrieben, was einem Defizit von 10 heimischen Arten entspricht. Zu diesen entweder ausgestorbenen oder nur sehr selten vorkommenden Arten gehören z.B. Aland (*Leuciscus idus*) und Zingel (*Zingel zingel*; Schulz & Troschel 1990).

Insbesondere die Äsche (*Thymallus thymallus*) ist von diesem Rückgang betroffen. So konnte diese Fischart zwar regelmäßig bei Befischungen unterhalb von Sigmaringen gefangen werden, war dort jedoch nur in geringer Dichte vorhanden. In Ehingen war trotz intensiver Besatzmaßnahmen mit einsömmrigen Äschen ein gravierender Bestandsrückgang nicht aufzuhalten (Abb. 1.1). So wurden in den Jahren von 1984 bis 1989 jährlich etwa 3000 Jungfische in der Donau ausgesetzt, gleichzeitig ging jedoch die Fangquote der Äsche fast auf Null zurück (Schulz & Troschel 1990). Auch in den Donauzuflüssen, z.B. Lauchert und Biber, zeichnete sich die gleiche Entwicklung ab und die dort ehemals großen Äschenbestände gingen dramatisch zurück. In der Lauchert konnten 1982 noch über 120 Äschen gefangen werden, ab 1994 jedoch keine einzige mehr (Schulz & Troschel 1990).

Ein Rückgang der Weißfischbestände (Barbe, Döbel, Nase und Rotauge) in der Donau konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. In einigen Flussabschnitten ging der Weißfischfang zwar deutlich zurück. In der Mehrzahl der pachtlosen Flussabschnitte waren jedoch eher periodische

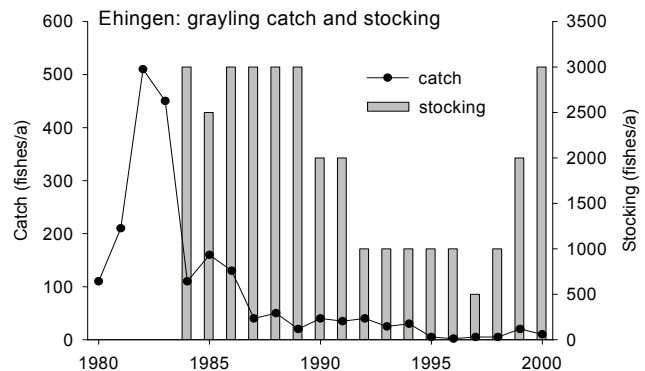


Abb. 1.1: Äschenfang und -besatz an der Donau bei Ehingen (nach Seitz 2005 und Wurm 2001).

Schwankungen als ein gerichteter Trend zu erkennen (Wurm 2001). Möglicherweise liegt die Ursache dafür an der Vorliebe der Angler für Salmoniden, als an der tatsächlichen Bestandssituation der Weißfische. Dennoch konnte ein eindeutiger Rückgang der Barbenpopulationen ab Beginn der 90er Jahre sowohl in den Fangaufzeichnungen der Angler als auch bei den Elektrobefischungen registriert werden. Im Bereich von Ehingen konnten in der ersten Hälfte der 80er Jahre noch bis zu 500 Barben in einem Jahr gefangen werden, im Jahre 1999 fast keine mehr (Wurm 2001).

1.1.2 Prädation durch fischfressende Vögel

Dem Einfluss fischfressender Vögel – insbesondere von Kormoran und Gänsesäger – auf Fischpopulationen wird in der Literatur eine nicht unerhebliche Bedeutung beigemessen (Engström 2001). Insbesondere die Kormoranbestände an der Donau haben in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Der starke Rückgang der Äschen- und anderer Fischbestände an der Donau zu Anfang und Mitte der 90er Jahre deckt sich zeitlich häufig mit den Kormoraneinfällen in diesem Bereich (mündliche Mitteilungen zitiert in Wurm 2001). Bei einem Nahrungsbedarf von ca. 400 Gramm Fisch pro Tag ist es daher unschwer vorstellbar, dass ein beträchtlicher Anteil des fischereilichen Ertrags durch den Kormoran dezimiert wird. Jedoch kann die Prädation durch den Kormoran nicht die einzige Ursache für den Fischrückgang darstellen, da dieser Rückgang schon vor dem Kormoraneinfall eingesetzt hatte. Insofern hat der Kormoran hier die rückläufige Entwicklung der Fischbestände lediglich verstärkt (Wurm 2001).

1.1.3 Morphologische Situation der oberen Donau

Seit dem Beginn der Industrialisierung und der Intensivierung der Landwirtschaft wurden massive Eingriffe in Form von Flussbegradigungen, Uferverbauungen, Wasserausleitungen oder die Entfernung von Ufergehölzen vorgenommen (Aarts et al. 2004, Fischnetz 2004, Wurm 2001) und dadurch den Flüssen immer mehr Raum genommen. Damit erhöhte sich auch das Bedürfnis nach Hochwasserschutz und die Gewässer wurden weiter eingeengt sowie die Ufer und Sohlen stabilisiert. Anthropogen beeinträchtigte Gewässer zeichnen sich deshalb meist durch monotone Verhältnisse aus (Aarts et al. 2004, Fischnetz 2004). Sie bieten insbesondere für Fische eine schlechte Qualität und begrenzte Zahl an Laich- und Versteckmöglichkeiten (Humphries & Lake 2000).

In den Jahren von 1820 bis 1889 wurden zur Gewinnung von Kulturland ca. 60 km der Donau zwischen Scheer und Ulm nach dem Vorbild von Tulla's Rheinkorrektur begradigt (Ramsch 1989). Die wasserbaulichen Eingriffe, vor allem zwischen Scheer und Riedlingen (Begradigung, Fixierung der Uferböschung, Einengung des Abflussquerschnittes), führten flussaufwärts von Riedlingen zu erheblichen Erosionsprozessen, während es unterhalb von Riedlingen zu Auflandungstendenzen kam (Ramsch 1989). Von 1922 bis 1926 wurden im Bereich von Öpfingen und Donaustetten Stauseen angelegt, allerdings nicht im Donaubett selbst sondern in den angrenzenden Talauen. In den 40er- und 70er-Jahren des 20. Jahrhunderts wurde schließlich die Mehrzahl der ehemaligen Flussschlingen, die noch als Altwässer bestanden und mit der Donau in Verbindung standen, im Zuge von Kultivierungsarbeiten entfernt. Daher befinden sich heute weite Abschnitte der Donau zwischen Sigmaringen und Ulm in einem naturfernen oder sogar naturfremden Zustand (Konold 1991).

1.1.4 Nährtierbestand

Veränderungen in den morphologischen Verhältnissen in einem Gewässer (Verbauungen, Eindolungen von Zuflüssen, Hochwasser, Schwebstoffe), physikalischen Faktoren (Licht, Temperatur)

oder Chemikalieneintrag (Nähr- oder Schadstoffe) bewirken Veränderungen im Makrozoobenthosbestand und haben damit auch Einfluss auf das Nahrungsangebot für Fische. Eine quantitative Erfassung des Makrozoobenthos in der oberen Donau im Jahr 2001 ergab, dass besonders in naturnahen Gerinneverhältnissen mit entsprechend gut und vielfältig strukturierten Sohlesubstraten die Nährtierbiomasse hoch war, wobei Werte über 50 g/m^2 erreicht wurden (Wurm 2001). Die durchschnittliche Nährtiermasse in der oberen Donau hingegen betrug nur 20 g/m^2 . Durch die Verbauung und Kanalisation sind jedoch die Bedingungen für gute Nahrungsverhältnisse eingeschränkt, und man muss daher in vielen Bereichen der oberen Donau von einem Mittelwert von 10 g/m^2 ausgehen. Innerhalb des Makrozoobenthos dominierten vor allem Gammariden, mit einigem Abstand folgten Trichopteren und Ephemeropteren (Wurm 2001).

1.1.5 Belastung durch organische Schadstoffe

Daten zur Belastung der oberen Donau aufgrund organischer Schadstoffe sind insgesamt sehr lückenhaft vorhanden und nur für wenige Standorte bekannt. Außerdem wurde erst spät mit der Messung organischer Verbindungen in Donausedimenten begonnen. Ab dem Jahr 1994 wurden erstmals von der Landesanstalt für Umweltschutz (LfU) Baden-Württemberg Analysen organischer Schadstoffe in Sedimenten vom Standort Scheer durchgeführt (LfU 2004). Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden verschiedene PAHs (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), PCBs (polychlorierte Biphenyle) aber auch HCB (Hexachlorbenzol), der Summenparameter AOX (Absorbierbare organisch gebundene Halogene) und andere persistente Verbindungen gemessen. In Abbildung 1.2 sind die Ergebnisse der PAH-Analysen dargestellt. Hierbei ist eine deutliche Abnahme der PAH-Konzentrationen zwischen 1994 und 2000 zu erkennen und ab dem Jahr 2001 wieder eine leicht ansteigende Tendenz. Des Weiteren sind im Vergleich mit anderen Fließgewässern z.B. Rhein und Neckar die Konzentrationen insgesamt hoch (Tab. 1.1).

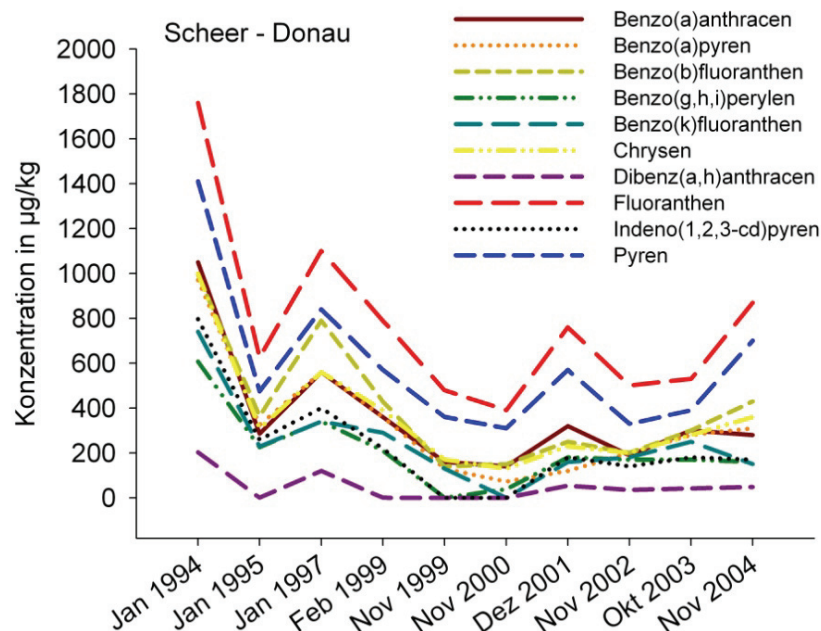


Abb. 1.2: Konzentrationen zehn verschiedener PAHs in Sedimenten vom Standort Scheer im zeitlichen Verlauf. Daten aus „Beschaffenheit der Fließgewässer - Jahresdatenkatalog 1972 - 2004“; LfU Baden-Württemberg.

Tab. 1.1: Vergleich aus der Summe von 10 verschiedenen prioritären PAHs (vgl. Abb. 1.2) zwischen Donau, Rhein und Neckar im zeitlichen Verlauf. Daten aus „Beschaffenheit der Fließgewässer - Jahresdatenkatalog 1972 - 2004“; LfU Baden-Württemberg.

Donau Scheer		Rhein Albbruck-Dogern		Rhein Birsfelden		Neckar Deizisau		Neckar Lauffen	
Datum	[µg/kg]	Datum	[µg/kg]	Datum	[µg/kg]	Datum	[µg/kg]	Datum	[µg/kg]
01.1994	9533	-	-	-	-	01.1994	4151	01.1994	8943
01.1995	3100	-	-	01.1995	1000	01.1996	5604	01.1996	7481
01.1997	5610	01.1997	2660	01.1997	250	01.1997	3690	01.1997	20240
02.1999	3620	11.1998	120	10.1998	720	12.1998	9870	11.1998	5020
11.1999	1570	11.1999	240	10.1999	100	10.1999	1060	10.1999	3825
11.2000	1230	11.2000	704	11.2000	646	10.2000	1221	10.2000	2630
12.2001	2824	11.2001	2283	11.2001	489	10.2001	3030	10.2001	9030
11.2002	2145	10.2002	667	10.2002	1002	10.2002	3754	10.2002	3445
10.2003	2722	10.2003	904	10.2003	871	10.2003	678	10.2003	7610
11.2004	3478	11.2004	659	12.2004	407	11.2004	1210	11.2004	1209

1.1.6 Entwicklung der Gewässergüte

Zu Beginn der 50er Jahre erfolgte im Auftrag des Innenministeriums (Abt. VI, Straßen- und Wasserbau, Abwicklungsstelle Tübingen und der Stadt Ulm) eine Erstellung des biologischen und z.T. auch chemischen Güteprofils der Donau zwischen Riedlingen und Ulm (Weinmann 1952). In den Ergebnissen dieser Studie wurde nicht von einer Verunreinigung der Donau durch giftige Abwässer ausgegangen. Jedoch wurde festgestellt, dass sowohl industrielle Abwässer als auch die direkten Einleitungen aus Haushalten und der Landwirtschaft für die Verschmutzung der Donau von Bedeutung sind.

In den 60er Jahren wurde eine deutliche Verschlechterung der Gewässergüte an der Donau registriert. Ursachen hierfür waren: (1) ein gesteigertes Abwasseraufkommen, (2) häusliche und industrielle Abwasser wurden entweder überhaupt nicht oder nur unzureichend geklärt, (3) eine Steigerung der Zellstoffproduktion in Ehingen und (4) die Errichtung zahlreicher Stauwerke, die die Fließgeschwindigkeit und damit auch das Selbstreinigungsvermögen des Flusses herabsetzten. Daher wurde 1964 bei einer biologischen Güteuntersuchung für die Donau zwischen Beuron und Ehingen lediglich ein befriedigender Gewässerzustand (β -mesosaprob) festgestellt (Mauch 1964).

Ab dem Jahr 1973 analysierte der Zweckverband Landeswasserversorgung wöchentlich Wasserproben aus der Donau. Dabei wurden an allen Untersuchungsstandorten erhebliche Gewässerverschmutzungen festgestellt, die sich in den ermittelten Güteklassen von III und III - IV widerspiegeln (Tab. 1.2; LAWA 1998, LfU 2004). In den folgenden Jahren zwischen 1974 und 1975 erreichte die Verschmutzung der Donau ihren Höhepunkt. So erreichte z.B. der Sauerstoffgehalt im Bereich des Öpfinger Kraftwerks Konzentrationen von nahezu 0 mg/ml. Die Landeswasserversorgung bewertete folglich den Ablauf des Öpfinger Stausees in ihren Untersuchungen zwischen 1973 und 1980 als stark belastet. Auch die Schwermetallbelastung, insbesondere durch Quecksilber, wurde durch Analysen von Hölzinger (1977) als katastrophal für das Ökosystem eingeschätzt. So wurde beispielsweise im Muskelfleisch zweier Barben aus dem Öpfinger Stausee Quecksilberkonzentrationen von 0,39 und 0,6 ppm Hg nachgewiesen. Der in Österreich festgelegte Hg-Höchstwert für Süßwasserfische beträgt 0,5 ppm (Köck 1996).

Tab. 1.2: Einteilung der Gewässergüteklassen nach chemischen, physikalischen und biologischen Parametern (nach LAWA 1998).

Güteklassen	Bezeichnung	Saprobiebereich	Saprobien-index	BSB ₅ [mg/L]	NH ₄ -N [mg/L]	O ₂ -Min. [mg/L]
Güteklasse I	unbelastet	Oligosaprobie	1,0 - < 1,5	1	höchstens Spuren	> 8
Güteklasse I - II	gering belastet	Oligosaprobie mit β-mesosaprobem Einschlag	1,5 - < 1,8	1 - 2	um 0,1	> 8
Güteklasse II	mäßig belastet	ausgeglichene β-Mesosaprobie	1,8 - < 2,3	2 - 6	< 0,3	2 - 6
Güteklasse II - III	kritisch belastet	β-α-mesosaprobe Grenzzone	2,3 - < 2,7	5 - 10	< 1	> 4
Güteklasse III	stark verschmutzt	ausgeprägte α-Mesosaprobie	2,7 - < 3,2	7 - 13	0,5 - mehrere mg/L	> 2
Güteklasse III - VI	sehr stark verschmutzt	Polysaprobie mit α-mesosaprobem Einschlag	3,2 - < 3,5	10 - 20	mehrere mg/L	< 2
Güteklasse IV	übermäßig verschmutzt	Polysaprobie	3,5 - 4,0	> 15	mehrere mg/L	< 2

BSB₅ = Biochemischer Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen; NH₄-N = Ammoniumgehalt; O₂-Min = minimaler Sauerstoffgehalt

Bereits zu Beginn der 80er Jahre wurde durch das Institut für Seenforschung und Fischereiwesen in Langeragen nur noch eine mittlere Belastung der Donau ober- und unterhalb des Öpfinger Stausees festgestellt (MELUF 1982). Auch bei Untersuchungen von Hölzinger im Jahr 1982 wurde eine merkliche Verbesserung der Gewässergüte an der Donau bestätigt (zitiert in Wurm 2001). Diese Verbesserung ist insbesondere auf den Neu- und Ausbau von Kläranlagen zurückzuführen, der sich an der Donau und ihrer Zuflüsse vor allem Ende der 70er und zu Beginn der 80er Jahre vollzog (Wurm 2001). Immer wieder wurde auch die Rolle der Zellstofffabrik in Ehingen mit Hinblick auf die Gewässergüte untersucht. Durch den Ausbau der betriebseigenen Kläranlage im Jahr 1989 erfolgt die Reinigung der Produktionsabwässer der Zellstofffabrik in einer anaeroben und einer aeroben Stufe. Die Emission der Zellstofffabrik konnte dadurch so weit gesenkt werden, dass keine Auswirkungen auf die hydrobiologischen und hydrochemischen Parameter anzunehmen waren (Schmitz 1991). Im Folgenden konnte unterhalb von Ehingen eine Verbesserung sowohl der organischen Verschmutzung als auch der Sauerstoffversorgung registriert werden. Seither wurde die Donau unterhalb von Ehingen der Gewässergüteklasse II zugeordnet (Tab. 1.3; Braukmann & Vobis 1998, LfU 2004).

Tab. 1.3: Gewässergüteklassen ausgewählter Standorte der Donau zwischen Sigmaringen und Öpfingen zwischen 1968 und 2004 (LfU 2004).

	1968	1974	1981	1986	1991	1998	2004
Unterhalb Sigmaringen	-	III - IV	II - III	II	III	II - III	II - III
Lauchert	II	II	II	II	II	II	II
Schwarzach	-	III - IV	II - III	II - III	II - III	II - III	II
Riedlingen-Daugendorf	-	III - IV	II	-	II - III	II	II
Rottenacker	-	III	II	II	II	II	II
Ehingen-Nasgenstadt	III - IV	III - IV	II - III	II	II	II	II
Öpfingen	-	-	II - III	II - III	II - III	II	II

Im Zeitraum von 1988 bis 1995 wurden im Rahmen des Integrierten Donauprogramms umfangreiche chemisch-physikalische und biologische Analysen im Bereich zwischen Sigmaringen und Ulm durchgeführt (Groß 1990, 1991, Gebhardt 1995). Diese Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Donau im Schnitt der Güteklasse II zuzuordnen war. Aufgrund von zum Teil erheblichen Stoßbelastungen der Kläranlagen Sigmaringen, Mengen und Ehingen entsprach die Donau zeitweise der Güteklasse III (Groß 1990, 1991, Gebhardt 1995, LfU 2004). Beachtenswert waren bei diesen Untersuchungen die Maximalwerte des BSB₅ (biochemischer Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen), der beispielsweise unterhalb der Kläranlage Sigmaringen Werte über 8 bzw. 11 mg O₂/L annahm. Analysen aus dem Jahr 2001 zeigten nach wie vor zeitweilig hohe Belastungen mit organisch leicht abbaubaren Stoffen (Hertel et al. 2001, Wurm 2001), die zu dieser starken Erhöhung der BSB₅-Werte führten.

Im Jahr 2000 wurde im Auftrag des Umweltbundesamtes als Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit von Duft et al. (2003) eine ökotoxikologische Sedimentkartierung der großen Flüsse Deutschlands durchgeführt. Dabei wurden auch Sedimente aus Pfohren und Scheer von der oberen Donau hinsichtlich verschiedener chemischer (Schwermetalle und PAHs) und biologischer Analysen (Chironomiden- und Nematodentest) untersucht. Diese Standorte wurden der ökotoxikologischen Zustandsklasse III (mäßiger Zustand in Pfohren) und IV (unbefriedigender Zustand in Scheer) zugeordnet. Die Klassifizierung orientierte sich dabei an der ökologischen Klassifizierung der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL 2000).

Die im Jahr 2001 von Wurm durchgeführten Untersuchungen verschiedener Parameter wie Wassertemperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, BSB₅, Ammonium-, Nitrat-, Nitrit-, Phosphat- und Sauerstoffgehalt zeigten größtenteils zufriedenstellende Ergebnisse. So ist beispielsweise die Donau von toxischen Ammoniakkonzentrationen weit entfernt, und der BSB₅ liegt entlang der Untersuchungsstrecke im Durchschnitt zwischen 1,8 und 3,4 mg O₂/L, was mit der Gewässergüteklasse II vereinbar ist (Hertel et al. 2001, LfU 2004, Wurm 2001). Zu diesem Zeitpunkt wurden aber zeitweise BSB₅-Werte von bis zu 8 mg O₂/L gemessen werden, die allerdings auf eine Sekundärverschmutzung in den Sommermonaten durch übermäßiges Wachstum von Algen und Wasserpflanzen zurückgeführt wurden.

Die bisher beschriebenen hydrochemischen und hydrobiologischen Parameter konnten im Wesentlichen durch den Auf- und Ausbau der Kläranlagen entlang der Donau und ihrer Zuflüsse deutlich verbessert werden. Trotz dieser Maßnahmen verschlechterte sich der Fischereiertrag. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Entwicklungen ließ sich jedoch nicht mit den bisher erfassten Daten entlang der Donau erklären. Aufgrund dessen wurde im Jahr 2002 eine Pilotstudie zum ökotoxikologischen Schädigungspotential von Abwasser-, Schwebstoff- und Sedimentproben durchgeführt (Keiter et al. 2006). Ziel dieser Studie war die Untersuchung eines möglichen ökotoxikologischen Schädigungspotentials von Wasser- und Sedimentproben aus der Donau. Alle Proben wurden entweder nativ, um die biologische Verfügbarkeit der partikulär gebundenen Schadstoffe zu überprüfen, oder als Extrakte, um das biologische Schädigungspotential zu testen, in einer *In vitro*-Biotestbatterie untersucht. Dabei wurde insbesondere an den Standorten Sigmaringen, Ehingen und Öpfingen ein erhöhtes ökotoxikologisches Belastungspotential festgestellt. Ein Zusammenhang mit dem Fischrückgang konnte daher nicht ausgeschlossen werden (Keiter et al. 2006). Vereinzelt wurden auch Ergebnisse verschiedener Biotestverfahren mit Ergebnisse aus dem Rhein und/oder Neckar verglichen, wobei die Donau stets ähnlich hohe oder deutlich höhere toxische Effekte aufwies (Hollert et al. 2002a, 2003, Keiter et al. 2006, König 2002, Kosmehl et al. 2004, Ulrich et al. 2002). Es

wurde daher empfohlen, umfassendere ökotoxikologische Untersuchungen zu initiieren, die im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes folgende Komponenten mit einbeziehen sollten (Keiter et al. 2006):

- Histopathologische Tests an ausgesuchten Fischarten.
- Zeitliche Fortsetzung und räumliche Ausdehnung der bereits in der Pilotstudie eingesetzten Biotests an Wasser-, Sediment- und Schwebstoffproben.
- Erweiterung der chemischen Analysen vor allem auf persistente organische Verbindungen.
- Integration der Donauzuflüsse in das Untersuchungskonzept, da nicht auszuschließen war, dass auch sie einen Einfluss auf den Rückgang der Fischpopulation in der Donau haben.

In der aktuellen Diskussion über die Umsetzung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie wurden in der Bestandsaufnahme der deutschen Flusseinzugsgebiete durch das Bundesministerium für Umwelt (BMU) 49 % des untersuchten Wasserkörper der Donau als „vorläufig erheblich verändert“ klassifiziert (Anonymous 2005, Hollert et al. 2007). Daher wurde die Erreichung des Ziels des guten ökologischen Zustandes für 55 % der untersuchten Wasserkörper als „unwahrscheinlich“ und zu 23 % als „unsicher“ bewertet (BMU 2005). Im Gegensatz zu Rhein und Elbe – mit ihren hohen Belastungen durch prioritäre Substanzen – ist es für 91 % der Wasserkörper an der Donau wahrscheinlich, dass sie den guten chemischen Zustand erreichen werden, bei 8 % ist es unsicher und nur bei 1 % unwahrscheinlich (BMU 2005). Trotzdem wurde insbesondere für viele Donauzuflüsse eine unakzeptable hohe Belastung mit organischen Schadstoffen festgestellt, weshalb voraussichtlich das Erreichen des Zieles des guten ökologischen Zustands als unwahrscheinlich oder unklar anzusehen ist (BMU 2005, Netzband 2007). Das BMU sieht als Grund hierfür vor allem das Fehlen oder eine ungenügende Abwasseraufbereitung in den meist ländlichen Gebieten.

1.2 Ursachen von Gewässerverschmutzung und Sedimentbelastung

Gewässer werden seit Beginn der Industrialisierung zunehmend mit synthetischen Stoffen belastet. Ein großer Teil dieser Stoffe ist schwer abbaubar und reichert sich aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in der Nahrungskette an und verfügen damit über ein hohes Gefahrenpotential für Mensch und Umwelt. Durch den Bau und die Modernisierung von Kläranlagen konnte eine Vielzahl chemischer Verbindungen – vor allem leicht abbaubare – dem Abwasser entzogen werden. Jedoch gibt es zahlreiche Substanzen, die durch Klärung des Wassers nicht eliminiert werden können. Zum Beispiel können über Kläranlagenabwässer hormonaktive Substanzen in die Oberflächengewässer gelangen und dort die Reproduktionsfähigkeit aquatischer Organismen nachhaltig beeinträchtigen (Garcia-Reyero et al. 2001, Klopman & Chakravarti 2002, Murk et al. 2002, Schrenk-Bergt & Steinberg 1998, Sole et al. 1999). Eine weitere Schadstoffquelle neben Klärwerksabwässern ist das Regenwasser, welches Chemikalien von Straßen und Dächern sowie Agrochemikalien aus der Landwirtschaft in die Gewässer einschwemmt (Brown & Peake 2006, Huwe 2002, Schweigert et al. 2001, van Metre et al. 2000). Auch Luftschadstoffe, die sich als Stäube auf verschiedensten Oberflächen ablagern, können durch das Regenwasser in Flüsse gespült werden (Erdinger et al. 2004).

Viele Schadstoffeinträge, die aus den unterschiedlichsten Quellen in die Gewässer gelangen, sind kaum im Wasser gelöst, z.B. Schwermetallverbindungen, Pestizide, halogenierte Kohlenwasserstoffe und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Ahlf 1995). Diese Verbindungen sind vorwiegend lipophil und persistent, und werden dem Wasser dadurch entzogen, indem sie an

Schwebstoffe binden und sedimentieren (Brack et al. 2000, Bro-Rasmussen 1996, Legler et al. 2002, Rieß et al. 1997).

Sedimente sind geogenen oder biogenen Ursprungs und setzen sich aus Tonmineralien, Carbonaten, Quarzsanden oder organischen Partikeln zusammen, die von organischen oder anorganischen Substanzen umhüllt sind (Cornelissen et al. 2005, Doucette 2003, Power & Chapman 1992, Zimmer & Ahlf 1994). Sie sind integraler Bestandteil aquatischer Ökosysteme und bieten Habitate für eine artenreiche benthische Mikro- und Makrofauna (Heise & Apitz 2007). Sie stellen außerdem im Stoffkreislauf der Gewässer ein Reservoir für organisches und anorganisches Material dar (Ahlf & Heise 2005, Burton 1995, Netzband 2007). Anthropogene Beeinträchtigungen der Sedimentbeschaffenheit insbesondere durch Akkumulation von Schadstoffen stellen die ökologische Funktion der Sedimente in Frage und bedingen die Notwendigkeit ihrer Überwachung im Rahmen langfristiger Monitoringprogramme durch Umweltbehörden (Bergmann & Maass 2007, BfG 2000, Nendza 2002).

Sedimente wurden in den letzten Jahren in der Ökotoxikologie als bedeutende Senke und Quelle für die Belastung von aquatischen Systemen erkannt. Trotzdem sieht die EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL; EU-WRRL 2000) keine angemessene Berücksichtigung der Sedimentqualität vor (Förstner 2002, Bergmann & Mass 2007). In der durch die Europäische Kommission veröffentlichten Tochterdirektive der WRRL wird zwar als Qualitätsnorm für die Gewässerbelastung die Ermittlung der Konzentrationen prioritärer Stoffe in Sedimenten vorgeschlagen, aber die Bedeutung der Sedimente als sekundäre Langzeitquelle für Schadstoffe wird dabei vernachlässigt (Hollert et al. 2007). Zur Untersuchung und Bewertung der Beschaffenheit eines Fließgewässers ist es daher von großer Bedeutung, nicht nur die Wasserqualität von Fließgewässern zu analysieren, sondern auch Sedimente und Schwebstoffe auf ihr ökotoxikologisches Belastungspotential hin zu untersuchen (Hill et al. 1993, Hollert et al. 2007).

1.3 Integrative Bewertung von Fließgewässern in der Ökotoxikologie

Durch die Komplexität und Dynamik aquatischer Ökosysteme kann eine mögliche Beeinträchtigung durch Umweltschadstoffe nur durch die Kombination chemischer und biologischer Verfahren festgestellt werden (Chapman et al. 1992, Chapman & Hollert 2006). Da es in der aquatischen Ökologie und Ökotoxikologie jedoch keine allgemeingültigen Verfahren zur ökologischen Risikobewertung gibt, werden oftmals integrative chemische und ökotoxikologische Umweltuntersuchungen durchgeführt, um mögliche nachteilige Effekte gegenüber einem Ökosystem durch Schadstoffe zu bestimmen (Alcock et al. 2003, Solomon & Sibley 2002). Das Weight-of-Evidence-Konzept (WOE) bietet die Möglichkeit, Schlussfolgerungen aus einer Vielzahl verschiedener Daten zu ziehen, denn durch Einzelmessungen kann keine überzeugende Schlussfolgerung hinsichtlich eines ökologischen Risikos getroffen werden (Johnston et al. 2002). In einer WOE-Studie können unterschiedliche Beweislinien (Lines-of-Evidence = LOE) nach Beurteilung des entsprechenden Anwenders unterschiedlich gewichtet werden, um so das ökologische Risiko nach Gesichtspunkten der ökologischen Relevanz zu bestimmen (Burton & Nordstrom 2004, Johnston et al. 2002). Des Weiteren können durch die systematische Kombination verschiedener LOEs auch Unsicherheiten der einzelnen Beweislinien ausgeglichen werden sowie durch die logische Verknüpfung der verschiedenen Daten eine Stützung der Gesamtaussage erreicht werden (Chapman & Hollert 2006, Cook et al. 1999, Johnston et al. 2002).

In einem von Chapman et al. (1992) entwickelten Sedimentbewertungskonzept sollen zum Zweck einer umfassenden integrierenden Beurteilung des Zustandes eines Ökosystems die folgenden

fünf verschiedenen Messungen kombiniert werden: (a) chemische Sedimentanalyse, (b) Sedimenttoxizitätstest, (c) Geweberückstandsanalysen, (d) pathologische Untersuchungen und (e) biozönotische Untersuchungen. Soll jedoch lediglich geklärt werden, ob eine Kontamination eines Gewässers vorliegt und ob Lebensgemeinschaften im Sediment Schadeffekte zeigen, so genügt ein vereinfachter 3-Komponenten-Ansatz zur integrierten Bewertung (Ahlf 1995, Ahlf et al. 2002). Nach Chapman et al. (1992) sollte in diesem Falle eine Sedimentbewertungstriade (Sediment Quality Triad) mit folgenden LOEs eingesetzt werden: (a) Sedimentchemie, (b) Sedimenttoxizität in biologischen Tests und (c) Messung von Feldeffekten der benthischen Lebensgemeinschaft (Abb. 1.3). Obwohl jede einzelne dieser Komponenten wichtige Informationen zum Systemzustand liefert, gelangt keine für sich zu einer umfassenden Bewertung. So kann beispielsweise mittels chemischer Analytik zwar die Anwesenheit und Konzentration bestimmter Schadstoffe gemessen werden, dennoch müssen chemische Analysen aufgrund der gewaltigen Zahl – man geht von rund 100 000 verschiedenen zu analysierenden organischen Zielsubstanzen aus – unvollständig bleiben (Ahlf 1995, Alcock et al. 2003, Braunbeck et al. 1994b, Chapman et al. 2002, Hollert et al. 2000). Zudem weisen viele Schadstoffe unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen Organismen auf, oder erst ihre Metabolite stellen die biologisch aktiven Substanzen dar (Ahlf 1995, Heise et al. 2000). Auch die Angaben über Schadstoffkonzentrationen können nicht genutzt werden, da sie keine Auskunft über ihre Bioverfügbarkeit geben, die von der Interaktion der Organismen untereinander und von verschiedenen Umweltfaktoren abhängt (Ahlf 1995, Liß & Ahlf 1997). Außerdem bleiben bei reiner chemischer Analytik synergetische und antagonistische Effekte zwischen organischen Substanzen unberücksichtigt (Billiard et al. 2006, Preston et al. 2000). Des Weiteren können verschiedene Chemikalien, die zwar nur in geringen Konzentrationen in einem Fließgewässer nachgewiesen wurden, bei chronischer Exposition schwerwiegende Schäden in Organismen verursachen (Fent 2001, Handy et al. 2003, Vos et al. 2000).

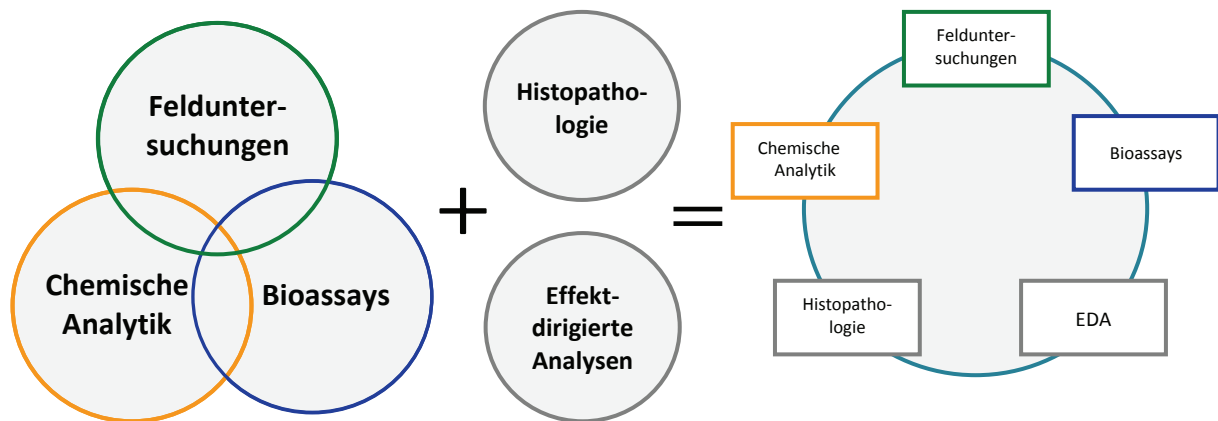


Abb. 1.3: Konzeptionelle Weiterentwicklung der Sedimenttriade (links) von Chapman et al. (1992) zu einer Weight-of-Evidence-Studie (WOE; Chapman & Hollert 2006) durch die Hinzunahme weiterer Beweislinien (Lines-of-Evidence), wie hier z.B. histopathologische und Effekt-dirigierte Analysen (EDA).

Dagegen liegen die wichtigsten Vorteile von *In vitro*-Sedimenttoxizitätstests im Vergleich zu chemischen Analysen darin, dass sie die Effekte aller in der Probe vorliegenden Chemikalien integrieren (Chen & White 2004, Handy et al. 2003). Außerdem wird nicht nur die Bioverfügbarkeit, das Vorhandensein und die Konzentration eines Schadstoffes aufgezeigt, sondern auch ihre Effekte auf Organismen. Auch werden die Wirkungen von Abbauprodukten sowie synergetische und antagonistische Effekte mit untersucht, die bei chemischen Analysen nur teilweise berücksichtigt

werden (Handy et al. 2003). Eine Extrapolation der Daten auf Freilandorganismen ist dennoch schwierig, denn es ist wenig bekannt über ökologische Gesetzmäßigkeiten und Ordnungsprinzipien (Zimmer & Ahlf 1994), weshalb auch die Gefahr besteht, dass Ergebnisse aus *In vitro*-Biotest in ihrer Aussagefähigkeit überfordert werden (Ahlf 1995, Fent 2004). Sie können jedoch unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden und sind im Vergleich zu Freilanduntersuchungen in der Durchführung weniger zeitintensiv, so dass ihre Anwendung für Routineüberwachungen ebenso zweckmäßig ist wie für zielgerichtete Untersuchungen bestimmter Standorte (Heise et al. 2000).

Bei der Erfassung des *In situ*-Zustandes werden oftmals Struktur und Funktion der benthischen Infauna herangezogen, weil diese Organismen vergleichsweise standorttreu sind. Bei diesen Untersuchungen werden als die häufigsten Parameter die Diversität sowie deren Abundanz und Dominanzverhältnisse aufgenommen. Jedoch sind solche Freilandstudien verhältnismäßig zeitintensiv und bergen die Gefahr, natürliche Veränderungen in der Biozönose als anthropogen verursachte Schädigung des Ökosystems zu deuten. Des Weiteren können in Freilandstudien keine Vorhersagen über mögliche Folgen einer Verschmutzung getroffen, sondern lediglich eine Bestandsaufnahme vorgenommen werden, wenn die Kontamination bereits stattgefunden hat (Solomon & Sibley 2002).

Insbesondere die beiden ersten Komponenten (Sedimentchemie und Sedimenttoxizität) des Sedimentbewertungskonzeptes nach Chapman et al. (1992) wurden in einer Vielzahl von Sedimenttriaten unverändert eingesetzt (Chapman & Hollert 2006). Die Spezifizierung der letzten LOE ist im Sinne einer umfassenden ökologischen Risikobewertung nicht mehr auf die ursprüngliche Untersuchung der Benthosgemeinschaft beschränkt, sondern hat sich hingegen zu Untersuchungen über Störungen in der standortbezogenen Biozönose gewandelt. Chapman und Hollert (2006) beschreiben hierfür insgesamt 14 alternative LOEs die sich in vier Kategorien zusammenfassen lassen:

- (1) Die ursprüngliche LOE (Messung von Feldeffekten) kann durch z.B. Histopathologie an Fischen mit sedimentbezogener Lebensweise ersetzt oder ergänzt werden.
- (2) Veränderung der existierenden LOE: *In situ* oder Sedimentkontakttests bzw. Kolonisationsexperimente.
- (3) Zusätzliche LOEs: Exposition von Crustaceen und Feststellung deren Gesundheitszustandes, Untersuchung von Oberflächenwasser, Struktur der Bakteriengemeinschaft, Mechanismus-spezifische Biotests, Biomagnifikation.
- (4) LOEs zur Feststellung der Kausalität: Habitatmorphologie, *In situ*-Sedimentkontakttests und Laboruntersuchungen zur Feststellung der Toxizität, Biomarker und effektspezifische Endpunkte, effektdirigierte Analysen (EDA), Toxicity Identification Evaluation (TIE).

Folglich müssen in Abhängigkeit von Fragestellung und ökologischer Relevanz sowie expositions- und effektbezogener Bewertung spezifische LOEs ausgewählt werden, um im Sinne einer integrativen Risikobewertung eine möglichst umfassende Aussage über den Zustand des Ökosystems treffen zu können. Als Konsequenz kann sich dann eine Triade zu einer Tetrade, Pentade oder sogar Hexade entwickeln (Chapman & Hollert 2006). In der vorliegenden Studie soll unter Berücksichtigung der konzeptionellen Weiterentwicklung der Triade die obere Donau untersucht werden, um unter anderem mögliche ökotoxikologische Ursachen für den Fischrückgang zu ermitteln. Der Rückgang einer Fischpopulation stellt jedoch eine komplexe Problematik dar, die vielfältige Ursachen haben kann. Im Schweizer Projekt Fischnetz wurden eine Vielzahl von Hypothesen aufgestellt und diese sehr ausführlich getestet, um dem Fischrückgang in der Schweiz auf die Spur zu kommen (Burkhardt-

Holm et al. 2005, Fischnetz 2004). Für die Bewertung der oberen Donau kann jedoch durch die vorangegangenen Studien die Auswahl der Komponenten stark eingeschränkt werden. Insbesondere in der Pilotstudie zum Schädigungspotential verschiedener Kompartimente (Wasser-, Sediment- und Schwebstoffproben) aus dem Jahr 2002 (Keiter et al. 2006) wurde festgestellt, dass die obere Donau eine hohe ökotoxikologische Belastung aufweist. Daraus ergab sich die Notwendigkeit die obere Donau unter Berücksichtigung des Weight-of-Evidence-Konzeptes und insbesondere der Integration verschiedener *In situ*-Parameter genauer zu untersuchen.

1.4 Eingesetzte Methoden zur integrativen Bewertung der Donau

1.4.1 Chemische Analysen

Im Sinne einer möglichst umfassenden Bewertung zur Belastungssituation eines Ökosystems ist es unverzichtbar, neben verschiedenen Biotests chemische Daten zu erfassen. Weil jedoch Ökosysteme mit einer Vielzahl von Xenobiotika und weniger mit einzelnen Schadstoffen belastet werden (Preston et al. 2000, van den Berg et al. 1998), wurde bei den chemischen Analysen ein möglichst breites Spektrum prioritärer Schadstoffe ausgewählt, von denen auch bekannt ist, dass sie durchaus Ökosysteme, Populationen und die damit verbundenen Organismen negativ beeinträchtigen können. Im Folgenden soll kurz beschrieben werden, welche Substanzklassen in diesem Projekt näher untersucht wurden und welche Effekte sie auf Organismen ausüben können.

Schwermetalle: Schwermetalle liegen in Ökosystemen in der Regel zu über 90 % gebunden an suspendierte Partikel oder als schwerlösliche Metallsalze vor. Ihr Schicksal in Gewässern, die Aufnahme in Organismen und ihre Toxizität ist abhängig von pH-Wert, Alkalinität, Redoxpotential und von der Konzentration anorganischer und organischer Liganden im Medium (Burton 1991, Calmano et al. 1992, Fent 2004). Metalle können als Stäube durch die Atmosphäre weit verteilt werden und gelangen so in Gewässer und Böden. Durch ungeklärte industrielle Abwässer wurden vor allem Mitte des letzten Jahrhunderts hohe Konzentrationen an Schwermetallen in die Umwelt eingeleitet. Schwermetalle können unter bestimmten Milieubedingungen auch aus Sedimenten freigesetzt werden, z.B. bei Remobilisierungsereignissen, die zu Oxidationsprozessen führen (Hollert et al. 1999), und können daher als potentiell bioverfügbar betrachtet werden (Calmano et al. 1992). Jedoch weisen auch organische Metallverbindungen eine hohe ökotoxikologische Relevanz auf. So führt die Belastung von Fischen mit Tributylzinn zur Hemmung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (Brüschweiler et al. 1996, Fent 2004). Diese Enzyme spielen unter anderem eine zentrale Rolle bei der Entgiftung von Fremdstoffen (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Dioxin-ähnlichen Substanzen; Berbner et al. 1999, Brack et al. 2000, Katchamart et al. 2002, Oinonen et al. 1994).

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe: PAHs gehören zu den am weitesten verbreiteten organischen Schadstoffen in der Umwelt. Sie entstehen hauptsächlich bei unvollständigen Verbrennungsprozessen organischer Verbindungen, der Produktion und Verbrennung von Kraftstoffen oder bei Waldbränden und Vulkanausbrüchen (Bosveld et al. 2002, Brown & Peake 2006, Incardano et al. 2004, Luo et al. 2006, Stark et al. 2003). Weitere Quellen sind unter anderem auch: Straßenabrieb, Öl aus Motoren und Asphaltoberflächen (Brown & Peake 2006). Zum weitaus größten Teil gelangen sie über Regen- bzw. Abwasserrinnen und als Luftstäube in aquatische Systeme. Während die Konzentrationen von PAHs in städtischen Abwässern seit den 70er Jahren stetig zurückgingen, hat sich die Anreicherung von PAHs in der aquatischen Umwelt aufgrund einer

zunehmenden Zersiedelung und einem damit einhergehenden Anstieg des Straßenverkehrs immer weiter erhöht (Incardano et al. 2004, Lima et al. 2003, van Metre et al. 2000). Wegen ihrer lipophilen Eigenschaften absorbieren sie in aquatischen Ökosystemen vorzugsweise an Schwebstoffen und reichern sich in Sedimenten an, die folglich eine Senke und Quelle für PAHs darstellen. Es sind auch die gleichen inhärenten chemischen Eigenschaften, die dafür verantwortlich sind, dass sich PAHs im Gewebe von wasserlebenden Organismen anreichern (Nakata et al. 2003, Ruddock et al. 2002, Stark et al. 2003). Dort sind sie hoch toxisch und verursachen eine Reihe verschiedener spezifischer Effekte, wie z.B. akute Toxizität, Mutagenität, Karzinogenese, Hepatotoxizität, Immunsuppression, endokrine Dysfunktion und teratogene Effekte (Barron et al. 2004, Bickham et al. 2000, Blaha et al. 2006, D'Adamo et al. 1997, Gercken et al. 2006, White 2002, White & Claxton 2004). Außerdem sind PAHs dafür bekannt, dass sie an den cytosolischen Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) binden und dadurch eine Dioxin-ähnliche Wirksamkeit entfalten (Brack et al. 2005, Hollert et al. 2002a, White & Claxton 2004).

Polychlorierte Biphenyle: PCBs werden seit 1929 industriell hergestellt und fanden aufgrund ihrer stofflichen Eigenschaften (schwer entflammbar, plastifizierend, elektrisch nicht leitend) weltweit Anwendung, vor allem in Wärmeüberträgern, Transformatoren, elektrischen Kondensatoren, in Hydraulikanlagen im Bergbau sowie als Weichmacher in Dichtungsmassen und Kunststoffen (z.B. Kabelummantelungen). Mit PCB verunreinigtes Reisöl führte 1968 in Yusho (Japan) zu einer Massenvergiftung von ca. 2000 Menschen, die Chlorakne, Haarausfall, Abmagerung sowie Leber- und Nierenschäden bei den Betroffenen zur Folge hatte (Masuda & Yoshimura 1984). Auch wurde bei 90 % der Neugeborenen, deren Mütter mit PCBs kontaminiert wurden, eine Hyperpigmentierung beobachtet, was zu der Bezeichnung „Black Babies“ führte. Daraufhin wurde in Japan, wie auch in den meisten anderen Ländern, 1978 die Herstellung und Anwendung von PCBs zunächst in offenen Systemen und 1989 generell verboten. PCBs sind aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften hoch persistent, lipophil und bewirken eine Reihe toxischer Effekte sowohl in Säugetieren aber auch in Fischen, Vögeln und Invertebraten. Durch ihre geringe Biodegradation sind sie auch heute noch in der Umwelt allgegenwärtig, reichern sich vor allem in der Nahrungskette an (Bro-Rasmussen 1996) und sind durch ihre Bindung an Sedimente insbesondere für benthische Organismen bioverfügbar (Moermond et al. 2004, Morrison et al. 2002, Munns et al. 1997).

Unter toxikologischen Gesichtspunkten besonders wirksame und persistente chemische Verbindungen sind PCBs mit Dioxin-ähnlicher Wirksamkeit. Aufgrund fehlender Chloratome liegen die beiden Phenylringe in den *ortho*-Positionen in einer Ebene. Von den drei verschiedenen Non-*ortho* PCBs (PCB 77, PCB 126 und PCB 169) findet man für gewöhnlich das PCB 126 in der Umwelt in den höchsten Konzentrationen (Brown et al. 2002). Diese drei planaren PCB-Moleküle verhalten sich molekularbiologisch ähnlich wie das ebenfalls planare 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) und binden an den Ah-Rezeptor eukaryotischer Zellen (Aarts et al. 1995, Brown et al. 2002, Okey et al. 1994, Safe 1990). Von den 209 möglichen PCBs haben nur zwölf eine Dioxin-ähnliche Wirkung (Huwe 2002, van den Berg et al. 1998). Planare PCBs gehören zu den potentesten Induktoren des Enzyms Cytochrom P450 1A (CYP1A; Clemons et al. 1998, Murk et al. 1996), dessen Aktivierung eine Vielzahl verschiedener toxischer Reaktionen hervorruft, wie z.B. Thymusatrophie, Teratogenität sowie die Störung des Vitamin A Metabolismus und der Funktion der Thyroidea (Brown et al. 2002, Westerlund et al. 2000, Zabel et al. 1995b).

Dioxine und Furane: In der Chemie versteht man unter der Bezeichnung Dioxin einen heterozyklischen 6er-Ring mit zwei Sauerstoffatomen. Am bekanntesten sind jedoch die Verbindungen mit

zwei ankondensierten Benzolringen, die sogenannten Dibenzo-*p*-Dioxine oder Dibenzo[1,4] dioxine. Unter den Dibenzo-*p*-Dioxinen sind die chlorierten Derivate am häufigsten verbreitet, weshalb man meist unter Dioxinen die Gruppe der polychlorierten Dibenzo-*p*-Dioxine (PCDD) und die polychlorierten Dibenzofurane (PCDF) versteht (Abb. 1.4). Dioxine werden weder industriell hergestellt noch technisch genutzt. Sie entstehen als Nebenprodukt bei einer Vielzahl thermischer Prozesse (Dioxin-Fenster: ca. 300 - 600 °C) in Gegenwart von organischen oder anorganischen Halogen-Verbindungen, insbesondere Chlor und Brom (Rowlands & Gustafsson 1997). Durch ihre chemischen Eigenschaften adsorbieren Dioxine und Furane auch an Sedimente aquatischer Systeme, wodurch sie potentiell bioverfügbar sind (Cook et al. 2003, Isossari et al. 2006, Rowlands & Gustafsson 1997).

Eine der am stärksten mutagen wirkenden und krebserregenden Substanzen in der Umwelt ist das Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin (Whitlock 1993). Aufgrund seines lipophilen Charakters akkumuliert es sehr gut in Fettgewebe, Blut, Muttermilch und Zellmembranen (Berbner et al. 1999, Charnley & Kimbrough 2006, Olson et al. 1994, Wang et al. 2004). Außerdem reichert es sich durch seine hohe Persistenz in der Nahrungskette an, weshalb es letztlich auch eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellt. TCDD wird nur geringfügig metabolisiert und persistiert daher im Körper (Berbner et al. 1999, Huwe 2002, Whitlock 1993). Die Halbwertszeit im Menschen beträgt ca. 10 Jahre (Rowlands & Gustafsson 1997).

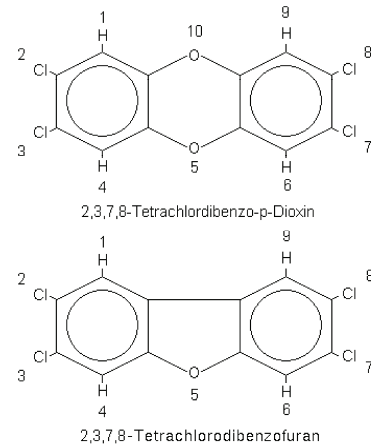


Abb. 1.4: Strukturformeln zu 2,3,7,8-TCDD und 2,3,7,8 TCDF.

Die Toxizität von Dioxinen und Furanen wird maßgeblich durch den Ah-Rezeptor vermittelt, wobei es zwischen den verschiedenen Kongeneren eine unterschiedlich hohe Affinität zu diesem Rezeptor gibt (Aarts et al. 1995, Clemons et al. 1998, Machala et al. 2001, Safe 1994, Willett et al. 1997). Ah-Rezeptor Agonisten induzieren eine Reihe spezies-spezifischer toxischer Reaktionen in Vertebraten, wie akute Lebertoxizität, Gewichtsverlust, Thymusatrophie, Schwächung der Immunabwehr, Reproduktionsstörungen, Teratogenität und Karzinogenese (Giesy & Ludwig 1994, Safe 1994, Walker et al. 1996, Windal et al. 2005). Insbesondere in Jungfischen verursachen bestimmte PCDDs und PCDFs Missbildungen, Blutungen und pericardiale Ödeme (Cook et al. 2003, Walker et al. 1996, Zabel 1995a, b).

1.4.2 *In vitro*-Biotestbatterie

Bakterienkontakttest: Der Bakterienkontakttest ist besonders gut zur Untersuchung von Sedimenten, Schwebstoffen und Bodenproben geeignet, da der Testorganismus *Arthrobacter globiformis* als einer der häufigsten Bodenorganismen auch in der Natur direkt mit dem zu untersuchenden Medium in Kontakt steht (Liß & Ahlf 1997, Neumann-Hensel & Melbye 2006, Ulrich et al. 2002). Aufgrund ihrer Funktion als Destruenten und ihrer hohen Abundanz in Böden und Sedimenten sind Mikroorganismen bedeutende Bioindikatoren für diese Kompartimente (Rönnpögel et al. 1998, van Beelen & Doelman 1997). Sie stellen ein System dar, das gleichzeitig einen Organismus und eine Zelle repräsentiert, und bei dem aufgrund der kurzen Generationszeit sowohl akut toxische als auch chronische Effekte untersucht werden können (Liß & Ahlf 1997, Ulrich et al. 2002). Ein weiterer Vorteil dieses Tests beruht darauf, dass er für einen Biotest verhältnismäßig schnell, d.h. innerhalb von 1 - 1 ½ Tagen durchzuführen ist, da Mikroorganismen Schadstoffe viel schneller aufnehmen als

höher entwickelte Organismen (Liß & Ahlf 1997, van Beelen & Doelman 1997). Der Bakterienkontakttest wird daher als einfacher Screeningtest für eine Testbatterie zur Sedimentbewertung empfohlen (Ahlf et al. 2002, Heise & Ahlf 2005) und ist inzwischen auch als DIN 38412 L48 festgeschrieben.

Fischeitest: In den vergangenen Jahren gewann der Fischeitest (DIN 38415 T6) mit *Danio rerio* (Abb. 1.4) als Alternativmethode zum Fischtest immer größere Bedeutung (Braunbeck et al. 2005, Nagel 2002). Der Fischeitest zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass er mit geringem Aufwand und relativ geringen Probenmengen durchzuführen ist (Ensenbach 1998, Lange et al. 1995, Oberemm 2000). Durch die Belastung der Fischeier mit nativen Proben kann zudem das tatsächlich bioverfügbare Schädigungspotential erfasst werden, was eine hohe Übertragbarkeit der Befunde auf die Situation im Freiland erlaubt (Hollert et al. 2003). Neben nativen Proben können aber auch acetonische Extrakte im Fischeitest einfach und schnell untersucht werden. Ziel ist es, die langfristige Exposition von Organismen insbesondere gegenüber lipophilen Substanzen durch eine kurze Exposition mit den potentiell verfügbaren Schadstoffen nachzuahmen („worst case“-Szenario). Dies ist zwar ein in der Ökotoxikologie weit verbreiteter, aber in der Literatur nicht unumstrittener Ansatz (Braunbeck et al. 1995, Hollert et al. 1999). Beim Fischeitest können unterschiedliche akut toxische und subletale Endpunkte untersucht werden (Lange et al. 1995), wodurch eine differenzierte Aussage über das Schädigungspotential der unterschiedlichen Proben getroffen werden kann. Durch die Transparenz der Fischeier können letale, subletale und auch teratogene Effekte sehr einfach mikroskopisch untersucht werden (Lange et al. 1995, Nagel 2002).

Akuter Cytoxizitätstest: Dieser Test mit permanenten Zelllinien wird mittlerweile in zahlreichen Untersuchungen eingesetzt, um die akute Toxizität von Monosubstanzen oder Substanzgemischen, aber auch von Sedimenten und Abwässern zu prüfen (Brack et al. 2002, 2005, Fent 2004, Gustavsson et al. 2004, Hollert et al. 2000, Keiter et al. 2006, Segner 1998a). Die hierfür verwendete Zelllinie RTL-W1 (Rainbow trout liver) zeichnet sich besonders durch eine hohe Kapazität zur Biotransformation nach Phase I aus und verfügt über das Enzym CYP1A (Bols et al. 1999, Clemons et al. 1998, Lee et al. 1993, Schirmer et al. 2001, Segner 1998b). Weil jedoch der Zelltest eine vergleichsweise geringe Sensitivität aufweist, besonders bei mäßig toxischen Proben, ist er nicht dazu geeignet, beispielsweise Abwasserproben zu bewerten (Hollert & Braunbeck 1997). Die Empfindlichkeit genügt aber durchaus, um das akute Schädigungspotential von partikulär gebundenen Umweltproben zu prüfen.

Mutagenitäts- und Gentoxizitätstest: Die Kontamination von Gewässern mit gentoxischen und mutagenen Substanzen anthropogener Herkunft ist sowohl aus human- als auch aus ökotoxikologischen Aspekten bedenklich (Chen & Whyte 2004, Diekmann et al. 2004a, b, Wessler 1999). Gentoxizität kann über ein Absterben von Gameten und einer erhöhten Mortalität von frühen Entwicklungsstadien auch negative Folgen auf die Reproduktion haben. Weiterhin kann durch die Induktion von Mutationen ein starker Einfluss auf die Populationsdynamik und damit auf die Stabilität von Ökosystemen ausgeübt werden (Akcha et al. 2003, Anderson & Wild 1994, Diekmann et al. 2004b, Mitchelmore & Chipman 1998). Da die Mutagenese der erste Schritt im Laufe der Tumorentwicklung ist, haben Methoden, welche die Mutagenität von Substanzen nachweisen können, besondere Bedeutung bei der toxikologischen Prüfung von Monosubstanzen und komplexen Umweltproben gewonnen (Akcha et al. 2003, Mitchelmore & Chipman 1998, Pellacani et al. 2006). Gentoxische Substanzen stellen eine Bedrohung für die Überlebensfähigkeit von zahlreicher Arten dar; so ist z.B. von Fischen und Muscheln bekannt, dass sie wie Säugetiere Tumore entwickeln

können (Chen & White 2004, Farmer et al. 2003, Mitchelmore & Chipman 1998, Stahl 1991). Außerdem konnte durch zahlreiche kombinierte Labor- und Feldstudien gezeigt werden, dass genotoxische Effekte *in vitro* mit einer Zunahme an pathologischen Veränderungen, wie z.B. Leberkarzinomen, korrelieren (Akcha et al. 2003, Anderson & Wild 1994, Metcalfe et al. 1990, Stahl 1991).

Man kennt unterschiedliche Substanzklassen mit genotoxischen und mutagenen Eigenschaften, dazu zählen beispielsweise PAHs, Nitrosamine, Salze von Schwermetallen (z.B. Nickel, Chrom oder Cadmium) und halogenierte Verbindungen (z.B. PCBs und PCDD/Fs). Um die Schädigung solcher Substanzen nachzuweisen, werden unter anderem der Ames-Test, der Comet-Assay und der Mikrokerntest eingesetzt, wenn auch bei diesen Tests unterschiedliche Endpunkte bestimmt werden:

- **Ames-Test:** Einer der am häufigsten verwendete Bakterientests zur Bestimmung des mutagenen Potentials von Wasser- oder auch Sedimentproben ist der Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* (Chen & White 2004, Erdinger et al. 2004). In diesem Verfahren werden zwei histidinbedürftige (*his*⁻) Stämme (TA98 und TA100) einer Testsubstanz ausgesetzt. Die Anzahl der durch Frameshift- (TA98) oder durch Basenaustauschmutationen (TA100) entstanden histidinunabhängigen (*his*⁺) Kolonien (Revertanten) dient als Maß für die mutagene Aktivität (Ames et al. 1975, Maron & Ames 1983). *S. typhimurium* verfügt nicht über Enzymsysteme (insbesondere CYP1A), die in der Lage sind, promutagene Substanzen in aktive, DNA-schädigende Metabolite umzuwandeln. Um diesen prokaryotischen Test an eukaryotische Verhältnisse anzunähern, wurden die Testansätze mit S9-Präparaten (Erdinger et al. 2004, Jarvis et al. 1996, Maron & Ames 1983, Mersch-Sundermann et al. 1988) supplementiert. Der S9-Mix wird durch eine Injektion von PCBs (z.B. Aroclor1254 oder β -Naphthoflavon) in Säugern (meist Ratten) induziert und durch Zentrifugation der homogenisierten Leber gewonnen (Elliott et al. 1992, Maron & Ames 1983, Oinonen et al. 1994).
- **Comet-Assay:** Mit diesem Verfahren lassen sich in nahezu allen eukaryontischen Zelltypen DNA-Strangbrüche auf dem Niveau der Einzelzelle detektieren (Abb. 1.5), die durch Einzelsubstanzen, Substanzgemische oder Umweltproben verursacht werden (Ashby et al. 1995, McKelvey-Martin et al. 1993, Mitchelmore & Chipman 1998, Moretti et al. 2002, Singh et al. 1988). Nachweisbare Effekte sind Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP (apurinische/aprimidinische) Stellen und Cross-Links. Außerdem stellt die Intensität der zellulären Reparatur ein indirektes Maß für die Bildung von Addukten dar (Moretti et al. 2002, Schnurstein & Braunbeck 2001). In dieser Studie wurden für den Comet-Assay sowohl die Zelllinie RTL-W1 (Kosmehl et al. 2004) als auch embryonale Zellen von *Danio rerio* verwendet (Kosmehl et al. 2006).
- **Mikrokerntest:** Der Mikrokerntest wurde vor über 25 Jahren entwickelt, um cytogenetische Schäden an Zellen zu messen (Heddle et al. 1991). Mikrokerne entstehen bei der eukaryotischen Zellteilung, wenn Chromatinfragmente ohne Centromer nicht in die Kerne der Tochterzellen wandern sondern im Cytoplasma verbleiben, oder wenn Fehlfunktionen des Spindelapparates dazu führen, dass Chromosomen während der Anaphase nicht in den Kern eingeschlossen werden (al-Sabti & Metcalfe 1995, Kim & Hyun 2006, Kirsch-Volders et al. 2003). Induziert wird die Bildung von Mikrokerneln unter anderem durch Strahlung oder Chemikalien, die Chromo-

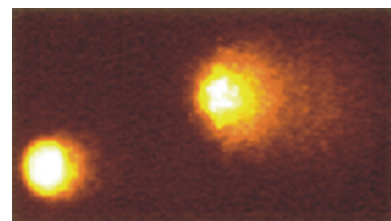


Abb. 1.5: Kometenbildung bei eukaryotischen Zellen.

somenbrüche oder Fehlfunktionen im Spindelapparat verursachen können (Hedde et al. 1991, Reifferscheid et al. 2007).

Tests zur Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit: Die Cytochrom P450-Enzymfamilie ist in fast allen Organismen vertreten. Neben der Funktion der Hydroxylierung endogener Substanzen dienen diese Enzyme im Wesentlichen dem Fremdstoffmetabolismus (Fent 2004). Wie endogene Stoffe werden auch verschiedene Fremdstoffe hydroxyliert, was meist primär zu einer Entgiftung und Mobilisierung führt. Dieser Prozess verläuft meist in zwei Phasen. Die Phase-I-Reaktion erfolgt in der Regel enzymatisch, z.B. durch die P450-abhängigen Monooxygenasen, und umfasst vor allem Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. Bei der Phase-II Reaktion handelt es sich um Konjugationsprozesse, z.B. durch Glutathion-S-Transferase. Dabei koppeln die Phase-II Enzyme den veränderten Fremdstoff über ein Konjugat mit einem endogenen, hydrophilen Substrat, wodurch das entsprechende Metabolit wasserlöslich wird und ausgeschieden werden kann (Fent 2004). Die CYP1A-Unterfamilie metabolisiert hauptsächlich PAHs, PCBs und PCDD/Fs. Diese Schadstoffe aktivieren das CYP1A-Enzymsystem über den Ah-Rezeptor, wobei die Bindungsstärke des Liganden proportional zur Geneexpression und damit zur Toxizität ist (Fent 2004, Rowlands & Gustafsson 1997). Der Ah-Rezeptor (AhR) ist ein Helix-Loop-Helix-Protein und liegt komplexiert mit Heat Shock Proteinen (HSP) und dem AhR Interacting Protein (AIP) im Cytosol vor (Abb. 1.6; Okey et al. 1994, Rowlands & Gustafsson 1997, Whitlock 1993). Der aktivierte Rezeptor-Ligand-Komplex wird zum Zellkern transportiert und bindet dort an den ARNT (AhR Nuclear Translocator) und vermutlich an weitere Faktoren. Dieser Komplex bindet mit hoher Spezifität an das Dioxin-Responsive-Element (DRE). Durch die Bindung des Komplexes an die DNA wird der Promotor freigelegt und die CYP1A-Gene transkribiert (Okey et al. 1994, Schirmer et al. 2000).

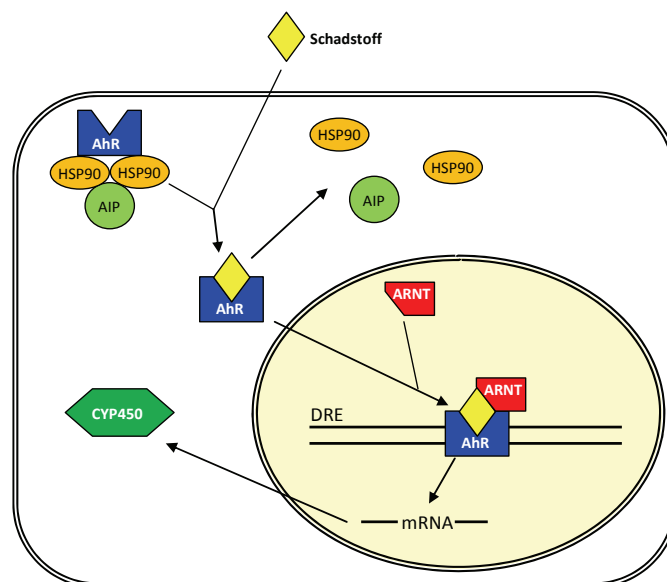


Abb. 1.6: Der Ah-Rezeptor wird durch HSP90 und AIP (AhR Interacting Protein) im Cytosol stabilisiert, bis ein Schadstoff bindet und HSP90 und AIP dissoziieren. Im nächsten Schritt wird der Rezeptor-Schadstoff-Komplex in den Zellkern transportiert. Dort kommt es zur Konjugation mit ARNT wodurch dieser Komplex an das DRE binden kann. Im Anschluss kommt es zur Freilegung des CYP1A Promotors und damit zur Translation und Transkription der CYP1A-Enzyme. Modifiziert nach Whitlock (1993).

In dieser Studie wurden zwei Säugerzelllinien (rekombinante H4IIE.Luc Hepatomzellen aus der Ratte und GPC.2D.Luc Adenokarzinomzellen aus dem Meerschwein; Garrison et al. 1996, Murk et al. 1996, Zhou et al. 2003) und eine Fischzelllinie (RTL-W1, Fibroblasten-ähnliche Zellen aus der Regenbogenforelle; Lee et al. 1993) eingesetzt, um die Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der Donausedimente zu testen (Tab. 1.4). Diese unterschiedlichen Verfahren sollen verglichen werden, um zu prüfen ob sie geeignet sind, eine mögliche Verbindung zwischen den Biotestergebnissen, chemischer Analyse und dem Fischrückgang in der oberen Donau herzustellen (Keiter et al. 2007a). Außerdem wurde mittels einer Multilayer-Fraktionierung die Dioxin-ähnliche Wirksamkeit sowohl von nicht bzw. mäßig persistenten als auch von persistenten Schadstoffen in den Sedimenten überprüft.

Tab. 1.4: Eigenschaften der in dieser Studie verwendeten Zelllinien.

Zellname	Original Zelle	Konstrukt	Dioxin-Responsive-Elements (DRE)	Referenz
GPC.2D.Luc	GPC.16 (Meerschwein)	p2DLuc	2 DREs in einem künstlich konstruierten genetischen Element	Zhou et al. 2003
H4L1.1c4 (DR-CALUX®)	H4IIE (Ratte)	PGudLuc1.1	4 DREs in einer 480 bp Promotor-Region des Maus CYP1A Gen	Garrison et al. 1996, Murk et al. 1996
RTL-W1	RTL-W1 (Regenbogenforelle)	-	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase	Lee et al. 1993

1.4.4 *In vivo*- und *In situ*-Untersuchungen

Elektronenmikroskopie: Diese Methode stellt ein empfindliches Instrument zur Diagnose subletaler Effekte von Umweltschadstoffen dar, mit der sich ultrastrukturelle Veränderungen im lebenden Organismus aus dem Freiland beobachten lassen (Nolan et al. 2003, Zahn & Braunbeck 1995). Die Leber nimmt eine zentrale Position in der Akkumulation, Transformation und Exkretion aufgenommener Schadstoffe ein (Arias et al. 1988, Arnold et al. 1996, Braunbeck et al. 1990, Meyers & Hendricks 1985) und ist somit ein bevorzugtes Ziel für toxische Effekte (Braunbeck & Völkl 1993). Die ultrastrukturelle Analyse von Hepatocyten erwies sich daher als ein geeignetes System, um cytologische Veränderungen bei subletalen Konzentrationen von Fremdstoffen festzustellen, die im Tierversuch weder zu erhöhten Mortalitätsraten noch zu makroskopisch erkennbaren Schäden führten (Braunbeck 1998). Mittels der Elektronenmikroskopie wurden Hepatocyten von Barben (*Barbus barbus*) von unterschiedlichen Donaustandorten auf histopathologische Veränderungen untersucht. Durch den Vergleich mit zwei im Labor gehaltenen Kontrolltiergruppen sollten mögliche Schadstoffbelastungen der Donaustandorte erfasst werden.

Mikrokerntest: Neben der bereits beschriebenen *In vitro*-Variante des Mikrokerntests mit der Zelllinie RTL-W1 wurde in dieser Studie diese Methode auch an Fischerythrocyten von Barben durchgeführt (Abb. 1.7). Erythrocyten von Fischen enthalten noch einen Zellkern, wodurch eine Bestimmung genotoxischer Effekte *in vivo* mit verhältnismäßig geringem Aufwand möglich ist.



Abb. 1.7: Links Mikrokern in einer RTL-W1-Zelle. Rechts Erythrocyten aus der Barbe mit Mikrokern. (Giemsa-Färbung; Bilder von Melanie Böttcher).

1.4.5 Limnologische Untersuchungen

Morphologische und chemisch-physikalische Parameter: Zur Beurteilung der Gewässergüte werden in Deutschland regelmäßig eine Anzahl verschiedener morphologischer, chemischer und physikalischer Parameter aufgenommen und in den Gewässergüteberichten der Länder zusammengefasst (LAWA 1998). Dazu gehört die Beschreibung des Flussverlaufs und der Ufergestaltung, Fließgeschwindigkeit, Geruch, Färbung, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Nitrat-, Ammonium-, Nitrit- und Phosphatkonzentration, Sauerstoffgehalt sowie BSB₅. Auf der Grundlage dieser Messdaten und des Saprobien-Index kann dann die Güteklassifikation nach der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) erstellt werden, wodurch eine vergleichbare Bewertung des Belastungszustands verschiedener Gewässer möglich ist. In den vergangenen Studien konnte eine deutliche Verbesserung der physikalisch-chemischen Parameter in der oberen Donau festgestellt werden (LfU 2004, Wurm 2001). Die gemessenen Werte erlauben jedoch nur eine Aussage über den momentanen Belastungszustand, nicht aber über in der Vergangenheit liegende bzw. plötzlich auftretende Veränderungen (Böhmer et al. 1996). Daher wurden die Messungen an der oberen Donau dreimal im Jahr wiederholt, um mögliche jahreszeitliche Schwankungen der physikalisch-chemischen Parameter zu erfassen.

Makrozoobenthos: In der ökologischen Bewertung von Fließgewässern ist neben der Aufnahme morphologischer und chemisch-physikalischer Parameter die Erfassung des Artenspektrums, vor allem des standorttreuen Makrozoobenthos, von besonderer Bedeutung. Die Bestandsaufnahme der benthischen Fließgewässergemeinschaft bietet den Vorteil, dass die Gegenwart oder das Fehlen bestimmter Arten eine integrative Aussage über den Gewässerzustand erlaubt, die relativ weit in die Vergangenheit reichen kann (Böhmer et al. 1996, Gunkel 1994). Daher wurden in zwei Teilstudien (Grund 2005, Seitz 2005), die Makrozoobenthos-Biozönosen der oberen Donau und zweier ihrer Zuflüsse, Lauchert und Schwarzach, ebenfalls dreimal untersucht, um natürliche jahreszeitliche Schwankungen der Populationen zu berücksichtigen.

1.5 Bewertung biologischer Wirkdaten

Integrative Untersuchungsansätze generieren eine Vielzahl an Daten mit unterschiedlichen Endpunkten, die aufgrund der komplexen Wechselbeziehungen zwischen den Variablen nicht einfach zu analysieren und interpretieren sind (Adriaenssens et al. 2004, Hollert et al. 2002b, Tran et al. 2002). Die Interpretation der Daten soll jedoch auf der Basis aller zur Verfügung stehenden Informationen erfolgen. Allerdings ist es vor allem für Fachfremde, wie z.B. Entscheidungsträger aus Behörden, entscheidend die Befunde solcher komplexen Zusammenhänge so zu aggregieren, dass eine einfache Bewertung von z.B. kontaminierten Sedimenten möglich ist. Dies erfordert allerdings eine Reduktion der Komplexität der analysierten Parameter, ohne dabei substantielle Informationen zu verlieren (Adriaenssens et al. 2004, Hollert et al. 2002b). Daher besteht ein großer Bedarf bei der Aggregation von Daten aus umfassenden Untersuchungsansätzen zur Bewertung und Klassifizierung von kontaminierten Sedimenten (Ahlf & Heise 2005, Hollert et al. 2002b). Insbesondere da bei der Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie die Fragen der historische Verschmutzung aus Sedimenten als neue Verschmutzungsursache für Oberflächengewässer und die damit verbundenen Unsicherheiten eine immer bedeutendere Rolle spielen werden (Hollert et al. 2007).

Im Gebiet der Datenanalyse gibt es sehr unterschiedliche Methoden und Ansätze, die Datenstruktur richtig zu interpretieren. Häufig werden zur Bewertung bzw. Klassifizierung nur Proben eines einzigen Flussgebietes herangezogen (Duft et al. 2003), wodurch es zu Schwierigkeiten bei der

Übertragung auf andere Fließgewässer kommen kann, so dass ein ortsabhängiges Klassifikationssystem entsteht (Tran et al. 2002). Ein wichtiges Ziel dieser Studie ist es, ein Konzept auf der Basis verschiedener statistischer Methoden zu entwickeln, das ermöglicht die Daten aus den eigenen Untersuchungen und anderen Projekten für eine ortsunabhängige Bewertung zu aggregieren. Dabei sollen Rangsummen-basierte Verfahren, Clusteranalysen und Fuzzy-Logik verwendet und vergleichend interpretiert werden. Insbesondere die Fuzzy-Logik soll die Basis liefern, um mit Daten aus den *In vitro*-Biotestverfahren ein Klassifizierungsmodell zur Bewertung von Sedimenten zu entwickeln (Keiter et al. 2007b). Die Fuzzy-Technologie bietet die Möglichkeit, Expertenwissen zu integrieren (Adriaenssens et al. 2004), verschiedene Datentypen miteinander zu verbinden, z.B. chemische Belastung in mg/kg, Hemmung in % und Abundanz in Individuen/m² (Silvert 1997), Unsicherheiten biologischer Parameter zu berücksichtigen und die Zusammenhänge in linguistischer Form (nicht-toxisch, moderat-toxisch und toxisch) in ein Modell eingeben zu können (Bojorquez-Tapia et al. 2002, Salski & Kandzia 1996, Wickham et al. 1999). Daraus ergibt sich ein System, welches die Komplexität und Unsicherheit von experimentellen Daten berücksichtigt und trotzdem durch die Nutzung sprachlicher Elemente auch für Nicht-Mathematiker transparent bleibt. Entsprechend wird die Fuzzy-Logik in zunehmender Weise für Umweltanalysen eingesetzt, unter anderem als Bewertungsinstrument für kontaminierte Sedimente (Ahlf et al. 2002, Ahlf & Heise 2005, Heise et al. 2000, Hollert et al. 2002b).

1.6 Untersuchungsziele und Fragestellung

Ein Ziel dieser Studie war es, das bereits in der Pilotstudie festgestellte hohe ökotoxikologische Schädigungspotential der oberen Donau mit einem umfangreichen Weight-of-Evidence-Ansatz detaillierter zu betrachten (Tab. 1.5), um mögliche ökotoxikologische, aber auch chemische Ursachen zu identifizieren, die mit dem Rückgang der Fischereierträge entlang der Donau zwischen Sigmaringen und Öpfingen in Verbindung gebracht werden können. Hierzu wurden Sedimentproben aus der Donau entnommen und entweder als native Proben oder als organische Extrakte in den verschiedenen Biotests eingesetzt. Native Sedimentproben wurden verwendet, um die tatsächlich aktuelle Bioverfügbarkeit von Schadstoffen zu testen. Die ökologische Relevanz eines solchen Expositionspfades wird als besonders hoch gewertet (Ahlf et al. 2002, Hollert et al. 2003). Durch organische Extrakte versucht man, die chronische Schädigung von Organismen durch überwiegend lipophile Substanzen während einer kurzen Exposition gegenüber den potentiell verfügbaren Schadstoffen zu simulieren (Hollert & Braunbeck 2001, Seiler et al. 2006). Des Weiteren wurden umfangreiche chemische Analysen der Sedimente durchgeführt. Dabei wurden verschiedene organische Schadstoffe (PAHs, PCBs und PCDD/Fs), aber auch einige Schwermetalle qualitativ und quantitativ erfasst. Die Gewässerqualität wurde durch morphologische, physikalische und chemische Parameter bestimmt. Ferner wurde im jahreszeitlichen Verlauf mehrmals der Makrozoobenthosbestand an ausgewählten Standorten zur unmittelbaren und integrierenden Bewertung der Situation im Freiland aufgenommen. Diese Untersuchungen werden in dieser Arbeit nicht detailliert dargestellt, daher wird auf die Arbeiten von Grund (2005) und Seitz (2005) verwiesen. Als weiterer Freilandparameter wurde die Leber von Barben (*Barbus barbus*) histologisch untersucht. Im ersten Abschnitt dieser Studie wurde versucht, mit der hier eingesetzten, umfassenden Testbatterie folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Liegt eine Belastung der Sedimente im Sinne von genotoxisch, cytotoxisch, mutagen, bakterientoxisch, embryotoxisch und Dioxin-ähnlich wirksamer Substanzen an der Donau vor?

- Weisen Fische der Donau ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber auf und können diese möglicherweise auf eine Gewässerbelastung hinweisen?
- Können Zusammenhänge zwischen chemischer Belastung (durch Schwermetalle und prioritäre organische Substanzen) und dem Rückgang der Fischpopulation hergestellt werden?
- Zeichnen sich Tendenzen im Schädigungspotential im Flussverlauf ab und können entlang des Untersuchungsgebietes Belastungsschwerpunkte identifiziert werden?
- Besteht ein Unterschied zwischen baden-württembergischen und bayrischen Standorten?
- Ist das Weight-of-Evidence-Konzept geeignet, um den Fischrückgang zumindest teilweise zu erklären?

Tab. 1.5: Die in dieser Studie eingesetzte Testbatterie, die jeweils verwendeten Organismen bzw. Zellkulturen sowie der Expositionspfad. Des Weiteren die Publikationen die aus den verschiedenen Teilstudien entstanden sind.

Testverfahren	Zelllinie/Organismus	Endpunkt	Expositionspfad	Publikation
Ames-Test	<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutagenität	Sedimentextrakt	Keiter 2007
Bakterienkontakttest	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Akute Bakterientoxizität	Sedimentextrakt natives Sediment	Keiter 2007
Fischartest	Zebraquappe (<i>Danio rerio</i>)	Embryotoxizität und Teratogenität	Sedimentextrakt natives Sediment	Seitz et al. 2007
Neutralrottest	RTL-W1	Akute Cytotoxizität	Sedimentextrakt Multilayerfraktion	Grund et al. 2007
EROD-Assay	RTL-W1	Dioxin-ähnliche Wirksamkeit	Sedimentextrakt Multilayerfraktion	Grund et al. 2007 und Keiter et al. 2007a
DR-CALUX-Assay	H4IIE.Luc	Dioxin-ähnliche Wirksamkeit	Sedimentextrakt Multilayerfraktion	Keiter et al. 2007a
GPC.2D-Assay	GPC.2D	Dioxin-ähnliche Wirksamkeit	Sedimentextrakt	Keiter et al. 2007a
Comet-Assay	RTL-W1 und <i>Danio rerio</i>	Gentoxizität	Sedimentextrakt natives Sediment	Böttcher et al. 2007 und Seitz et al. 2007
Mikrokerneltest	RTL-W1 und Erythrocyten aus <i>Barbus barbus</i>	Gentoxizität	Sedimentextrakt <i>In vivo</i>	Böttcher et al. 2007
Histopathologie	Leber von <i>Barbus barbus</i>	Ultrastrukturelle Veränderungen	<i>In situ</i>	Grund et al. 2007

Das zweite Ziel dieser Studie war es, ein Sedimentklassifizierungssystem zu entwickeln, das auch auf andere Gewässer anwendbar ist und die gegenwärtige Belastungssituation in eine verständliche und gut vermittelbare Form transferiert. Die angestrebte ortsunabhängige Klassifizierung muss jedoch auf einer möglichst breiten Datenbasis beruhen und kann daher nur erreicht werden, wenn Messwerte aus anderen Studien integriert werden. Des Weiteren war es notwendig, die Ergebnisse der einzelnen Biotestsysteme in Wirkungsbereiche zu unterteilen, die Auskunft darüber geben, ab welchem Messwert eine Probe als toxisch, moderat-toxisch bzw. nicht-toxisch zu bewerten ist. Um jedoch der Variabilität der Biotestsysteme Rechnung zu tragen, wurde ein Fuzzy-Logik-basiertes Klassifizierungssystem verwendet, da dies die Möglichkeit bietet, die Varianz biologischer Wirkdaten in einer Bewertung zu berücksichtigen. Außerdem wurde durch die Veränderung der Wirkungsbereiche versucht, die ökologische Relevanz der verschiedenen Mechanismus-spezifischen Biotests in

der Klassifizierung mit einzubeziehen. Mittels dieser statistischen Methoden sollten im Detail folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Sind die Ergebnisse aus Biotestverfahren ausreichend, um Sedimente zu klassifizieren und damit die Belastungssituation eines Fließgewässers widerzuspiegeln?
- Welches statistische Verfahren ist am besten geeignet, um die Toxizitätsstufen der Biotestergebnisse festzulegen?
- Stellt ein Fuzzy-Logik-basiertes Klassifizierungssystem ein geeignetes Mittel dar, um die Belastung von Sedimente zu bewerten?
- Ist es möglich, die ökologische Relevanz der gemessenen toxikologischen Endpunkte zu berücksichtigen?

2. Material und Methoden

2.1 Sedimente

2.1.1 Probennahme

Entlang der Donau wurden an zehn verschiedenen Standorten Oberflächensedimente direkt mit einer Edelstahlschaufel oder einer Braunglas-Flasche entnommen. Davon entstammen zwei Proben den Donauzuflüssen Lauchert und Schwarzach (Abb. 2.1). Eine Mischprobe wurde vom Öpfinger Stausee, der von der Donau gespeist wird, mittels eines Van Veen-Greifer entnommen. Die Sedimente wurden direkt in Glasflaschen abgefüllt, lichtgeschützt und gekühlt transportiert.

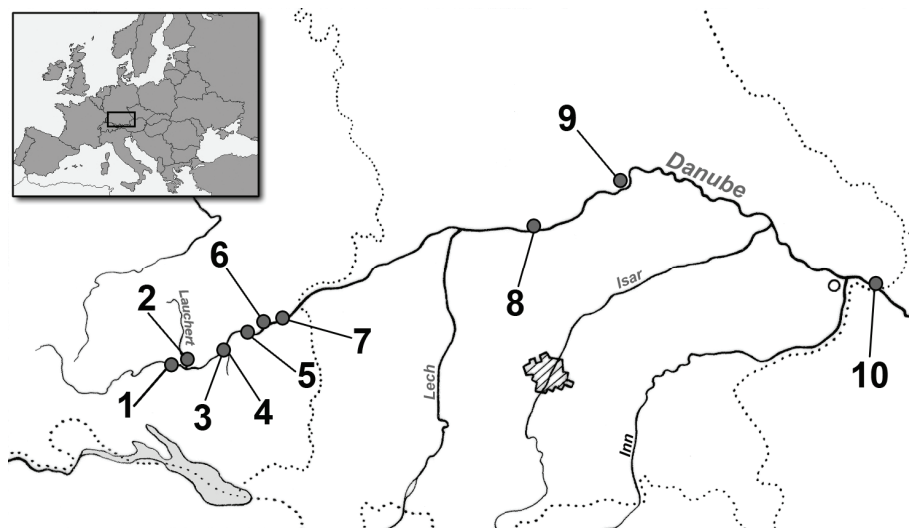


Abb. 2.1: Probenstandorte entlang der Donau zwischen Sigmaringen und Jochenstein (1 = Sigmaringen, 2 = Lauchert, 3 = Riedlingen, 4 = Schwarzach, 5 = Rottenacker, 6 = Ehingen, 7 = Öpfingen, 8 = Ingolstadt, 9 = Bad Abbach, 10 = Jochenstein; Keiter et al. 2007a).

2.1.2 Probenaufbereitung

Gefriertrocknung: Die Gefriertrocknung dient der Konservierung der Proben, um sie über einen längeren Zeitraum für verschiedene biologische und chemische Analyseverfahren sowie zur Extraktion nutzen zu können (Hjort 2004, Hollert et al. 2000). Vor der eigentlichen Gefriertrocknung wurde jede Probe in ein 500 ml Rundkolben überführt und für ca. 20 min in einem Isopropanolbad bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotiert. Das Sediment bildet dadurch einen dünnen Film auf der Glasoberfläche und damit die größtmögliche Fläche. In der Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4, Christ, Osterode) wurden die Sedimente mittels Sublimation je nach Wassergehalt für ca. 48 h getrocknet. Die Sedimente wurden abschließend durch Sieben (Maschenweite 2 mm) von kleineren Zweigen und Steinen befreit und in Glasflaschen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Organische Extraktion: Bei der organischen Extraktion werden an Partikel gebundene organische Verbindungen durch eine multiple Extraktion mittels eines organischen Lösungsmittels gewonnen und in eine gelöste Phase überführt (Ahlf 1995, Erdinger et al. 2004, Seiler et al. 2006). Von jeder gefriergetrockneten Probe wurden 20 g in einer Extraktionshülse (200 ml; Schleicher & Schuell, Dassel) abgewogen, mit Glaswolle bedeckt und in eine Soxhlet-Apparatur (Abb. 2.2) überführt. Als Lösungsmittel wurde Aceton verwendet, das sich insbesondere durch eine hohe Extraktionsleistung bei gleichzeitig geringer Umweltschädlichkeit auszeichnet (Hollert & Braunbeck

1997, Seiler et al. 2006). Während der Extraktion wird das in einem Kolben mit Siedeperlen teilweise verdampfte Aceton an einem Rückflusskühler wieder kondensiert, von dem es so lange auf die Probe tropft bis der Schenkel des Rückflussröhrchens überschritten wird. Dadurch werden die vom Aceton gelösten Substanzen in den Rundkolben überführt. Gegenüber anderen organischen Verbindungen weist Aceton einen vergleichsweise geringen Siedepunkt auf, weshalb sich die extrahierten Schadstoffe bei jedem weiteren Extraktionszyklus im Kolben anreichern (Hollert & Braunbeck 1997). Pro Stunde wurden ca. 10 solcher Extraktionszyklen durchlaufen. Die Extraktion wurde nach 14 h beendet.

Einengung und Rücklösung: Im nächsten Schritt wurde das organische Extrakt an einem Rotationsverdampfer (300 - 500 mbar, 38 °C; Heidolph, Kehlheim) auf ein Restvolumen von 5 - 7 ml reduziert. Die Probe wurde im Anschluss in ein Glasröhrchen überführt und das Volumen unter einem ständigen Stickstoffstrom (1,5 - 2 bar) bis fast zur Trockene eingeeengt. Das so gewonnene Extrakt wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Deisenhofen) bzw. 1 ml Toluol (Sigma) rückgelöst (Konzentration: 20 g Sedimentäquivalent pro ml Lösungsmittel) und bei -20 °C tief gefroren. Die in DMSO rückgelösten Extrakte fanden Verwendung in verschiedenen Biotestverfahren zur Bestimmung des ökotoxikologischen Belastungspotentials. Die in Toluol rückgelösten Extrakte wurden für chemische Analysen verwendet.

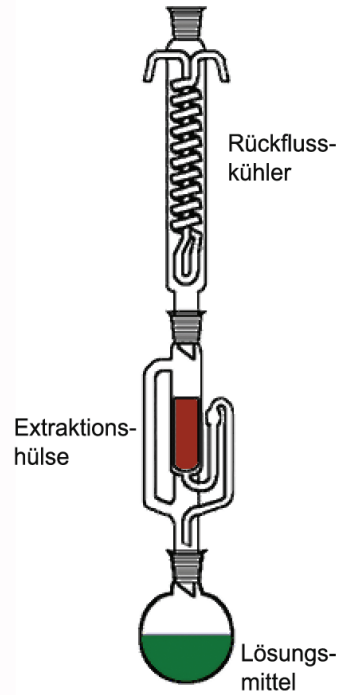


Abb. 2.2: Soxhlet-Apparatur (Seilnacht, Tuttlingen).

2.1.3 Multilayer-Fraktionierung

Mittels einer Multilayer-Fraktionierung können persistente Schadstoffe (z.B. polychlorierte Biphenyle, Dioxine und Furane; Abb. 2.3) separiert und sowohl chemisch analysiert als auch in entsprechenden Biotests auf ihre Dioxin-ähnliche Wirksamkeit getestet werden (Abb. 2.4; Gustavsson et al. 2004). Diese Fraktionierung wurde während eines sechswöchigen Aufenthaltes am MTM-Research Center, Department of Natural Sciences an der Universität Örebro (Schweden) unter Anleitung von Helena Olsman und Magnus Engwall durchgeführt.

Chemikalien und Lösungen:

- Kaliumhydroxyd-Kieselgel: 84 g KOH werden mit 400 ml Methanol und 150 g Kieselgel 60 (70 - 230 mesh; Merck, Darmstadt) in einen 2 L Rundkolben gegeben und für 90 min bei Vakuum in ein 55 °C warmes Wasserbad abgesenkt.
- Neutral-Kieselgel: Kieselgel 60 (70 - 230 mesh; Merck) wird mit je 20 ml Methanol und Dichlormethan (DCM) in einer Säule gewaschen und zum Trocknen und Aktivieren für mindestens 24 min auf 130 °C erhitzt.

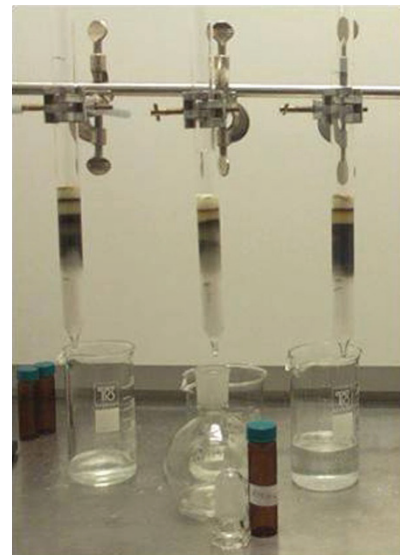


Abb. 2.3: Schwefelsaure Kieselgel-Fraktionierung mit Abbau der nicht-persistenten Schadstoffe (Foto: Dr. H. Hollert).

- 40 % Schwefelsäure-Kieselgel: 150 g aktiviertes Kieselgel und 100 g Schwefelsäure (Merck, p.A.) wurden bis zur Trockenheit geschüttelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- 20 % Schwefelsäure-Kieselgel: 200 g aktiviertes Kieselgel und 50 g Schwefelsäure (Merck, p.A.) wurden bis zur Trockenheit geschüttelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- Aktivkohle-Celit: 3,6 g Aktivkohle (Carbopack C 80 - 100 mesh; Sulpeco) wurden mit 16,4 g Celit (545; Fluka, Buchs, Schweiz) in einem 250 ml Rundkolben kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur im Exikator aufbewahrt.

Schwefelsaure Kieselgel-Fraktionierung:

1,5 ml-Glassäulen wurden mit 95 % Ethanol, *n*-Hexan und DCM gereinigt und mit 1,5 cm Glaswolle befüllt. Darauf wurden in Abfolge die Säule mit 3 cm KOH-Kieselgel, 0,5 cm Neutral-Kieselgel, 3 cm 40 % Schwefelsäure-Kieselgel, 1,5 cm 20 % Schwefelsäure-Kieselgel, 1 cm Neutral-Kieselgel und 1 cm Natriumsulfat befüllt und im Anschluss zweimal mit 10 ml *n*-Hexan gewaschen. Die Extrakte wurden auf das Säulenmaterial aufgebracht, mit 2 x 10 ml *n*-Hexan eluiert und in einem Rundkolben aufgefangen. Die Eluate wurden dann im Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt. Vom Eluat wurde 1/3 des Volumens gravimetrisch für die Untersuchung in Biotests separiert.

Aktivkohle-Celit-Fraktionierung:

1,5 ml-Säulen wurden mit 1,5 cm Glaswolle, 1 cm Na₂SO₄, 1,5 g Aktivkohle-Celit-Gemisch (18 % Aktivkohle) und 1 cm Na₂SO₄ gefüllt. Die Säulen wurden zweimal mit 10 ml *n*-Hexan gewaschen, wobei die Säule nicht trocken fallen darf. Dann wurde die Probe aufgetragen und die PCB-Fraktion mit 10 ml *n*-Hexan sowie im Anschluss die PCDD/F-Fraktion mit 80 ml Toluol eluiert. Für die chemische Analyse wurden 25 µl Tetradekan und 25 µl des jeweiligen Standards eingesetzt. Die Fraktionen wurden auf 1 ml eingengt, abgeblasen und in *n*-Hexan rückgelöst. Die Endkonzentration betrug 50 g/ml.

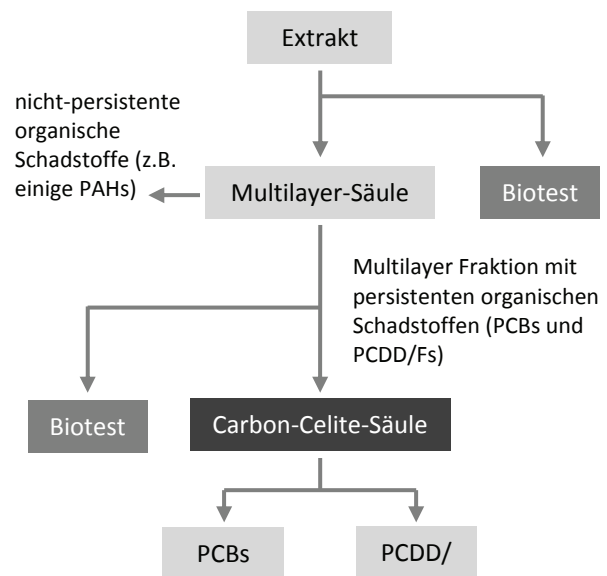


Abb. 2.4: Ablaufschema der Multilayer- und Carbon-Celite-Fraktionierung.

2.2 Chemische Analysen

2.2.1 Kohlenstoffgehalt

Die Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes wurde von Tobias Schulze vom Institut für Geologische Wissenschaften an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Der Gehalt an Gesamtkohlenstoff (TC, Total Carbon) wurde nach DIN ISO 10694 mit einem Carmograph C-16-D (Wösthoff, Bochum) durch Verbrennung der Probe im Sauerstoffstrom bei 1000 °C und konduktometrischer Messung von CO₂ durchgeführt. Die Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffes erfolgte bei diesen Geräten abweichend von der Norm durch Umsetzung des Anteils von anorganischem Kohlenstoff (TIC) in CO₂ mit 42 %-iger Orthophosphorsäure bei 70 - 80 °C. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC)

ergibt sich aus der Differenz zwischen Gesamtkohlenstoff und anorganischem Kohlenstoff. Zur Kalibrierung wurde reines CaCO₃ (Merck) verwendet.

2.2.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Die chemische Analyse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAHs) wurde von Mitarbeitern der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) durchgeführt und orientiert sich an dem Protokoll von Lachmund et al. (2003) in Anlehnung an die DIN 38414 S21. Insgesamt wurde die Konzentration für 16 PAHs (Naphthalen, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluorene Phenathren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren, Benzo[*a*]anthracen, Chrysen, Benzo[*b,j*]fluoranthren, Benzo[*k*]fluoranthren, Benzo[*a*]pyren, Dibenzo[*a,h*]anthracen, Benzo[*ghi*]perylen, Indeno[1,2,3-*cd*]pyren; US EPA 610) mit Hilfe einer HPLC (high pressure liquid chromatography; gradient elution) in den unterschiedlichen Sedimentproben bestimmt. Aufgrund des limitierten Probenmaterials konnte für den Standort Rottenacker keine PAH-Analyse durchgeführt werden.

2.2.3 Polychlorierte Biphenyle, Dioxine und Furane

Die qualitative und quantitative Bestimmung von polychlorierten Biphenylen sowie verschiedener Dioxine und Furane (Tab. 2.1) wurde 2004 im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes von Mitarbeitern des MTM-Research Center, Department of Natural Sciences an der Universität Örebro durchgeführt. Die HRGC/HRMS-Analysen wurden mit einem Micromass Ultima mit einer Auflösung > 10000 - 12000 und unter Verwendung einer EI-Ionisation bei 35 eV durchgeführt. Alle Messungen wurden in einem Selective Ion Recording (SIR) Modus durchgeführt, wobei die zwei häufigsten Ionen im Chlorid-Cluster kontrolliert wurden. 1 µl des ungeteilten endgültigen Extrakts wurden in einem 60 m Rtx DIOXIN 2 (0,25 mm i.d., 25 µm) eingesetzt. Bei jedem Testdurchlauf wurde ein Labor-Referenzstandard als Kontrolle (Blindwert) analysiert. Das Labor des MTM nimmt zur Prüfung der Validität routinemäßig an internationalen Interlaborvergleichsstudien teil.

Tab. 2.1: Liste der chemisch analysierten Polychlorierten Biphenyle, Dioxine und Furane.

PCBs	Dioxine	Furane
PCB 77	2378-TCDD	2378-TCDF
PCB 126	12378-PeCDD	12378-PeCDF
PCB 169	123478-HxCDD	23478-PeCDF
	123678-HxCDD	123478-HxCDF
	123789-HxCDD	123678-HxCDF
	1234678-HpCDD	234678-HxCDF
	OCDD	123789-HxCDF
		1234789-HpCDF
		OCDF

2.2.4 Schwermetalle

Die Schwermetallanalyse wurde von Tobias Schulze vom Institut für Geologische Wissenschaften an der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Königswasseraufschluss nach DIN ISO 11466: Die bei 105 °C getrockneten Proben wurden mit einem Königswasseraufschluss (Königswasser: 21 ml konz. Salzsäure und 7 ml konz. Salpetersäure) nach DIN ISO 11466 in einem Aufschlussgerät von Berotest (Düsseldorf) aufgeschlossen (DIN 11466 1983). Die Einwaage betrug in der Regel 1,0 g Trockenmasse (TM). Bei einigen Proben wurden aufgrund kleiner Gesamtprobenmengen Einwaagen von 0,5 g gewählt. Die Aufschlusslösungen wurden in 100 ml Messkolben überführt, mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und über Papierfilter (Faltenfilter 595½, Schleicher & Schuell) in Polyethylenflaschen filtriert.

Instrumentelle Analytik: Die Analyse von Kupfer, Chrom, Nickel, Blei und Zink wurden nach DIN ISO 11885 mit einer Leeman ICP 2.5 gekoppelt mit einem Leeman OES PS SPEC 1000 (Leeman Labs,

Hudson, USA) durchgeführt. Die Analyse von Cadmium wurde nach DIN ISO 11047 mit einem Atomadsorptionsspektrometer Perkin Elmer AAS 5000 durchgeführt.

Qualitätssicherung: Zur Qualitätssicherung wurde in regelmäßigen Abständen eine Blindprobe und eine Referenzprobe (Referenzboden BCR 146 R, Commission of the European Communities bzw. SRM PACS2, Institute for National Measurement Standards, Ontario, Canada) bei den Analysen mitgeführt. Die Einwaage der Referenzproben betrug jeweils $1,0 \pm 0,1$ g. Die Ergebnisse der Referenzproben sind in Tabelle 2.2 und 2.3 dargestellt.

Tab. 2.2: Konzentrationen von Elementen in Königswasserextrakten des Referenzmaterials BCR 146R (zertifizierte Werte für Königswasseraufschluss; n=10).

Element	Methode	Gemessener Wert [mg/kg]	Zertifizierter Wert [mg/kg]	Wiederfindung [%]	Unsicherheit [%]
Cd	GFAAS	75,1 ± 3,3	72,0 ± 1,8	104,3	4,4
Cr	ICP-OES	398 ± 32	426 ± 12	93,4	8,1
Cu	ICP-OES	119 ± 9	[128 ± 7] ^a	93,0	7,5
Ni	ICP-OES	282 ± 21	296 ± 4	99,3	7,3
Pb	ICP-OES	174 ± 17	174 ± 5	97,8	9,6
Zn	ICP-OES	1011 ± 63	1063 ± 16	103,3	6,2

^a Der Wert von Kupfer ist nur informativ (nicht zertifiziert)

Tab. 2.3: Konzentrationen von Elementen in Königswasserextrakten des Referenzmaterials PACS2 (zertifizierte Werte für Totalaufschluss; n=10).

Element	Methode	Gemessener Wert [mg/kg]	Zertifizierter Wert [mg/kg]	Wiederfindung [%]	Unsicherheit [%]
Cd	GFAAS	2,2 ± 0,2	2,11 ± 0,15	104,3	9,7
Cr	ICP-OES	49,8 ± 5,1	90,7 ± 4,6	54,9	10,2
Cu	ICP-OES	276 ± 19	310 ± 12	89	7
Ni	ICP-OES	34,3 ± 4,2	39,5 ± 2,3	86,8	12,2
Pb	ICP-OES	164 ± 14	183 ± 8	89,6	8,8
Zn	ICP-OES	339 ± 27	364 ± 23	93,1	7,8

2.3 *In vitro*-Untersuchungen

2.3.1 Ames-Test

Zur Überprüfung des mutagenen Potentials der Sedimentextrakte wurde der Ames-Test verwendet. Durchgeführt wurde er in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von L. Erdinger am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg. Als Testorganismus dient die nicht-pathogene *his*⁻-Mutante des Bakteriums *Salmonella typhimurium* (inzwischen *S. choleraesuis*). Diese Mutante verfügt nicht über die Möglichkeit, die Aminosäure Histidin selbst zu synthetisieren.

Durchführung: Für die Untersuchung der Extrakte wurde der sog. Platteninkorporationstest nach Ames (Maron & Ames 1983) verwendet, bei dem die Kolonien histidinunabhängiger Mutanten auf Minimalnährboden ausgezählt werden.

Die Bakterien wurden in Nutrient Broth-Nährmedium unter Schütteln bei 37 °C für 10 h aus gefrorenen Stammkulturen gezüchtet. 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 sog. Hintergrundrasen zu gewährleisten. 2 ml Top-Agar wurden auf zwei Einmalkulturröhrchen (Falcon) verteilt. Danach wurden 100 µl der zu untersuchenden Extrakte zu 0,5 ml S9-Präparat (aus Aroclor1254-induzierten Ratten; RRC-CCR,

Roßdorf; bei dem nicht supplementierten Ansatz wurde die gleiche Menge S9-Verdünnungspuffer eingesetzt) und 0,1 ml der Bakterienkultur gegeben. Diese Mischung wurde dann in Petrischalen mit histidinfreiem Minimal-Agar überführt und durch zügiges Drehen vor dem Erkalten gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Die Anzahl der spontanen Revertanten des jeweiligen Teststammes wurde mit einer Negativkontrolle (100 µl DMSO bzw. 1 ml Aqua bidest.) bei einer den Testansätzen analogen Behandlung bestimmt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h bei 37 °C wurde die Revertanzahl bestimmt und, um eine mögliche cytotoxische Wirkung der Schadstoffgemische zu erfassen, der Hintergrundrasen kontrolliert. Als Positivkontrolle wurde für jeden Ansatz mit S9-Aktivierung jeweils 50 µl Aminoantracen (Sigma) und ohne S9-Aktivierung jeweils 50 µl Nitropyren (Sigma) verwendet. Beide Substanzen wurden in einer Konzentration von 2,5 µg / 50 µl pro Platte eingesetzt.

Bewertung der Ergebnisse: Für eine einheitliche statistische Auswertung wurden in jedem Ames-Test die Kontrollen in 10 Parallelansätzen und die einzelnen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe mit jeweils drei Replika untersucht. Der Induktionsfaktor lässt sich als Quotient aus den induzierten und spontanen Mutanten errechnen (Kosmehl et al. 2004). Beim klassischen Ames-Test zur Bewertung von Chemikalien wird ab einem Induktionsfaktor > 2 von einer signifikanten mutagenen Wirkung des eingesetzten Agens ausgegangen. Für Wasser und Abwasser gilt hingegen der Ames-Test nach der DIN 38415-4 bereits bei einer Erhöhung der Revertanten um die Zahl 20 bei den Stämmen TA98 und TA100 als positiv. Dies entspricht einem Induktionsfaktor zwischen 1,4 und 1,9 (Kosmehl et al. 2004). In dieser Arbeit wurde mittels einer einfaktoriellen nicht-parametrischen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Post hoc-Test nach Dunnett ($p < 0,05$) überprüft, ob sich die exponierten Ansätze signifikant von der Kontrolle unterscheiden (Kosmehl et al. 2004).

2.3.2 Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*

Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass *Arthrobacter*-Bakterien mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht werden und deren Toxizität durch die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität (DHA) photometrisch nachgewiesen wird (Liu 1989). Nur lebende Bakterien besitzen diese Wasserstoff abspaltenden Enzyme, die bei vielen Stoffwechselprozessen eine Rolle spielen und die Integrität der Zellen erfordern (Liß & Ahlf 1997). Durch die Aktivität dieser Enzyme wird der zur Probe hinzugegebene blaue Farbstoff Resazurin (595 nm) in das rosafarbene Resorufin (620 nm) umgewandelt. Wird durch toxische Substanzen der Umweltprobe die Aktivität der Bakterien gehemmt, wird auch weniger von diesem Farbstoff umgesetzt und umso toxischer ist die Probe (Liß & Ahlf 1997, DIN 38412 L48 2004).

Chemikalien und Lösungen:

- Phosphatpuffer: 8,2 g/L KH_2PO_4 (Gerbu, Gaiberg); 13,24 g/L K_2HPO_4 (Roth, Karlsruhe); 2,0 g/L (+)Glucose (Sigma); 2,0 g/L Natriumacetat, wasserfrei (Riedel-deHaen, Seelze) in Aqua bidest. auf pH $7,2 \pm 0,2$ einstellen und für 20 min bei 120 °C autoklavieren.
- Resazurin-Lösung: 45 mg Resazurin (7-Hydroxy-3H-Phenoxazin-3on-10-Oxid-Natrium; Fluka, Buchs, CH) in 1 L sterilem Phosphatpuffer.
- Positivkontrolle: Stammlösung mit 800 mg/L 4-Nitrophenol (Riedel-deHaen) in Aqua bidest. Lagerung bei 4 °C in Dunkelheit über nicht mehr als 14 Tage. Konzentration im Test: 250 mg/L.
- Nährmedium A: 10 g/L Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Merck), 5 g/L Select Yeast Extrakt (Sigma), 5 g/L (+)Glucose (Sigma) und 5 g/L NaCl (Merck) in Aqua bidest. auf pH $7,2 (\pm 0,2)$ und für 20 min bei 120 °C autoklavieren.

- Nährmedium B: 3,33 g/L Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Merck), 1,67 g/L Select Yeast Extrakt (Sigma), 1,67 g/L (+)Glucose (Sigma) und 1,67 g/L NaCl (Merck) in Aqua bidest. auf pH 7,2 ($\pm 0,2$) und für 20 min bei 120 °C autoklavieren.

Stammkulturhaltung: Die Bakterien für die Stammkultur wurden vom Agar des Transportgefäßes bzw. später bei der Weiterzucht im Labor aus Zentrifugenröhrchen (Lagerung bei -78 °C; Eppendorf, Hamburg) entnommen und mit 50 ml sterilem Nährmedium A in Erlenmeyerkolben gemischt. Die Vorkultur wurde bei Dunkelheit für 8 h im Wärmeschrank bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler (GLF, Burgwedel) mit 150 rpm inkubiert. Von der so gewonnenen Suspension wurde wiederum 1 ml in 50 ml DSM-Medium pipettiert und mit 100 rpm für 16 h inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde photometrisch die Absorption der Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (SLT Spectra™ III, Tecan, Creilsheim) und durch Verdünnung mit Nährmedium A auf eine optische Dichte (OD) von 0,4 eingestellt. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde mit 4 % DMSO (Sigma) versetzt, zu 1 ml in sterile 1,5 ml Zentrifugenröhrchen portioniert und bei -78 °C gelagert.

Übernachtkultur: Ein Tag vor dem eigentlichen Versuch wurde eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurde 1 ml der Stammkultur langsam aufgetaut und in sterile Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml auf Zimmertemperatur vorgewärmtem Nährmedium B überführt. Die Bakterien wurden über Nacht etwa 14 h im Wärmeschüttelbad (GFL 1083, GFL, Burgwedel) bei 30 °C mit 60 rpm in Dunkelheit inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte der Bakteriensuspension mit erwärmtem Nährmedium B auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und unter den oben beschriebenen Bedingungen (1 - 2 h) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 (Test mit nativen Sedimenten) bzw. 0,15 (Test mit Sedimentextrakten) inkubiert.

Durchführung mit Sedimentextrakten: Für den Test wurden je ein Probenansatz mit Bakterien und ein Probenansatz ohne Bakterien (Ansätze für die Blindwerte) verwendet. Bei den entsprechenden Kontrollansätzen wurde gleichermaßen verfahren. In den Kontrollansätzen wurde jeweils 1 ml Aqua bidest. vorgelegt und in den Testansätzen je 1 ml der jeweiligen Stufe der Verdünnungsreihe der Probe in Aqua bidest. pipettiert (Ulrich et al. 2002). Anschließend wurde je 1 ml der Bakteriensuspension in die Ansätze überführt und in die Blindansätze dieselbe Menge Nährmedium B zugegeben. Für alle Ansätze wurden vier Replikate verwendet. Die Platten wurden dann bei 30 °C für 2 h in Dunkelheit auf einem Horizontalschüttler mit 70 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde zu allen Ansätzen 400 µl Resazurinlösung pipettiert. Die Platten wurden im Anschluss unter den oben beschriebenen Bedingungen solange inkubiert, bis die OD₅₉₅ des Kontrollansatzes mit Bakterien durch eine Oxidation des blauen Resazurin in das pinkfarbene Resorufin nur noch 70 % der OD₅₉₅ des Ansatzes ohne Bakterien betrug. Dieses Verhältnis wurde nach einer Reaktionszeit von etwa 90 - 120 min erreicht. Aus jeder Kavität wurden zweimal 350 µl in eine 96-Wellplatte (TTP) pipettiert und photometrisch bei 590 nm gemessen (Genios, Tecan). Die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität der Bakterien wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{OD Blindwert Probe} - \text{OD Probe}}{\text{OD Blindwert Kontrolle} - \text{OD Probe Kontrolle}} \times 100$$

Durchführung mit gefriergetrockneten Sedimentproben: Die Durchführung des Bakterienkontakttests orientierte sich an dem Protokoll von Heise & Ahlf (2005) und der DIN 38412 L48 mit Modifikationen nach Neumann-Hensel & Melby (2006). Der Dehydrogenase-Assay wurde in 24-Well-

Mikrotiterplatten (TTP, Trasadingen, Schweiz) durchgeführt (Tab. 2.4). Es wurden je Well 0,6 g Probe in verschiedenen Verdünnungen aus Sediment und Quarzmehl (Siebklasse W4; Tab. 2.5) eingewogen, die zuvor mittels eines Mörsers hergestellt worden waren. Je Verdünnung wurden vier Replikate untersucht. Im Anschluss wurden in jedes Well 0,6 ml Aqua bidest. gefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebfolie verschlossen und zur Pasteurisierung zweimal für je 20 min auf 85 °C erhitzt. Für die Sterilitätskontrolle wurde anstelle des Inokulums Nährmedium B verwendet. Die Inkubation gegenüber den Proben erfolgte über 2 h im Dunkeln im Wärmeschrank bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler. Nach dieser Inkubation wurde je Well 0,8 ml Resazurin hinzugegeben und sofort die Dehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Hierzu wurde das Resazurin bei einer Wellenlänge von 535 nm angeregt und die enzymatische Umsetzung zu Resorufin bei 590 nm im Reader (Genios) im Abstand von 15 min eine Stunde lang gemessen. Zur Auswertung der durch partikelgebundene Schadstoffe hervorgerufenen Hemmung der Enzymaktivität wird die Steigung des Resorufingehalts im Zeitraum von 15 bis 45 min berechnet und die Umweltproben auf die Kontrolle (Quarzmehl) bezogen. Als Endpunkt wurde der EC₅₀ ermittelt.

Tab. 2.4: Übersicht zur Testdurchführung im Bakterienkontakttest mit nativen Sedimenten.

	Blindansatz	Kontrollansatz	Testansatz
Quarzmehl	0,6 g	0,6 g	-
Probe	-	-	0,6 g
Wasser	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Pasteurisierung			
Inokulum	-	0,4 ml	0,4 ml
Nährmedium B	0,4 ml	-	-
2 h Inkubation			
Resazurin	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml

Tab. 2.5: Mischungsschema für alle Sediment-Quarzmehl-Verdünnungen (pro Well).

Sedimentanteil	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Sediment in g	0,6	0,3	0,15	0,075	0,038	0,019	0,009
Quarzmehl in g	0	0,3	0,45	0,525	0,562	0,581	0,591

2.3.3 Fischeitest mit *Danio rerio*

Zum Nachweis embryotoxischer und teratogener Effekte wurden sowohl acetonische Extrakte als auch native Sedimentproben im Fischeitest und dem verlängerten Fischeitest untersucht. Als Testorganismus dienen bei diesem Verfahren die Embryonen des Zebrafisches (*Danio rerio*). Mit diesem Biotest lassen sich sowohl letale als auch subletale Effekte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung beobachten (Braunbeck et al. 2005, Hollert et al. 2003). Der Fischeitest wurde in Anlehnung an die aktuelle DIN 38415 T6 und das bei Hollert et al. (2003) dargestellte Protokoll von N. Seitz im Rahmen einer Diplomarbeit am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Die DIN sieht für diesen Test verschiedene Verdünnungsstufen (G) von Abwässern vor. Endpunkte sind der GF-Wert (Verdünnungsstufe bei der mindestens 90 % der Embryonen keine Effekte aufweisen) bzw. der EC₅₀-Wert. Die toxikologischen Endpunkte wurden nach 48 h bestimmt (Tab. 2.6). Um differenziertere Aussagen über akut toxische und subletale Auswirkungen der Umweltproben treffen zu können, wurden in dieser Studie die Embryonen über einen längeren Zeitraum (168 h) beobachtet und weitere subletale Endpunkte berücksichtigt (Tab. 2.6). Die

Auswertung erfolgte im 24 h Rhythmus an einem Inversmikroskop (CKX41, Olympus, Hamburg). In einem weiteren Bewertungsansatz wurden neben den DIN-Endpunkten nach 48 h weitere Kriterien als letal gewertet (Tab. 2.6), sofern diese nach persönlicher Einschätzung das Tier in seinem natürlichen Lebensraum so weit beeinträchtigt hätten, dass kein längerfristiges Überleben möglich wäre.

Der Zebraärbling *Danio rerio*: Dieser ursprünglich in Südostasien beheimatete Schwarmfisch gehört zur Familie der Karpfenfische (Cyprinidae), und ist sowohl in stehenden als auch in fließenden Gewässern zu finden. Er erreicht eine Körperlänge zwischen 4 und 5 cm und weist einen schlanken, leicht kompressen Habitus auf. Am oberständigen Maul finden sich zwei Paar Bartfäden. Ihren Namen verdanken die Zebraärblinge den vier goldglänzenden Streifen, die seitlich vom Kiemendeckel bis zum Schwanz verlaufen. Die Weibchen sind blasser gefärbt und weisen insbesondere zur Laichreife einen prall gefüllten Bauch auf. Die Männchen bleiben in dieser Phase schlank und sind im Bereich der Streifen orange bis rötlich gefärbt (Abb. 2.5).



Abb. 2.5: Männchen und Weibchen des Zebraärblings *Danio rerio* (Foto: Erik Leist).

Tab. 2.6: Letale (+) und subletale (o) Endpunkte im Fischeitest mit *Danio rerio* in verschiedenen Bewertungsansätzen nach DIN 38415-T6 sowie unter Einbeziehung weiterer Kriterien nach 24, 48 und 168h. Tabelle nach Seitz (2005).

Endpunkt	24 h	48 h (DIN)	168 h (DIN)	168 h
Koagulierter Keim	+	+	+	+
Epibolistadium	+	+	+	+
Keine Somitenanlage	+	+	+	+
Keine Ablösung des Schwanzes vom Dotter	+	+	+	+
Unterentwickelte Augenanlage	o	o	o	+
Kein Herzschlag		+	+	+
Kein Blutkreislauf		o	o	+
Unregelmäßiger Herzschlag und/oder Blutkreislauf		o	o	o
Frühschlupf	o	o	o	o
Ödeme		o	o	+
Missbildungen		o	o	+
Wirbelsäulendeformationen			o	+
Verzögerte Dotterresorption oder deformierter Dotter			o	o
Verkürzter Schwanz oder Körper			o	o
Schwimmende Fortbewegung (möglich)			o	+
Kein Schlupf			o	+

In den Tests wurde nach 48,72, 96, 120 und 168 h nach DIN-Endpunkten ausgewertet. Außerdem wurde für die Auswertung nach 168 h weitere Kriterien in Anlehnung an Hollert et al. (2003) miteinbezogen (hellgrau unterlegt), wenn die Tiere bis zum Ende der Untersuchungen nach 168 h zwar noch keine letalen Auswirkungen zeigten, jedoch unter natürlichen Bedingungen nicht längerfristig überlebensfähig wäre. Grau unterlegt sind zusätzlich herangezogene Endpunkte in der erweiterten Bewertung nach 168 h (außer DIN).

Embryonalentwicklung: Die Eier mit einem Durchmesser von ca. 0,7 mm werden vorzugsweise in der Morgendämmerung in das freie Wasser abgegeben und sinken auf den Boden, wobei jedes Weibchen pro Laichvorgang zwischen 50 und 300 Eier ablegen kann. Die erste Teilung der Zygote während der Embryonalentwicklung erfolgt nach ca. 45 min, danach teilen sich die Zellen ungefähr alle 15 min. Nach ca. 2 ¼ h ist das Blastulastadium erreicht und die Epibolie setzt ein. In deren Verlauf wird der Dotter vom Blastoderm umwachsen. Dieser Entwicklungsschritt benötigt ca. weitere 10 h. Das folgende Segmentierungsstadium wird mit der Ausbildung des Schwanzes und der Somiten erreicht. Gehirn und Nervensystem differenzieren sich, und die Anlage der Augen und Ohrplackode sind zu erkennen. Nach etwa 48 h sind Herzschlag und das Blutkreislaufsystem deutlich zu beobachten. Auffällig ist auch die Körperpigmentierung mit den Melanophoren, die zunächst entlang des Neuralrohrs verstreut sind. Nach dem Schlüpfen (72 - 96 h) ist das frühe Larvenstadium erreicht (Westerfield 1987).

Hälterung und Zucht: Die Hälterung der adulten Zebraquariablässe erfolgte bei ca. 27 °C in 150 L-Aquarien, deren Wasser durch einen Innenfilter (Eheim, Deizisau) über Filterwatte und Aktivkohle gereinigt und mit Druckluft belüftet wurde. Die Beleuchtungsdauer wurde mittels Zeitschaltuhren auf 14 h täglich eingestellt. Gefüttert wurde täglich mit TetraMin Flockenfutter (Tetra Werke, Melle) bzw. mit lebenden Naupliuslarven der Gattung *Artemia*. Um die Eireifung zu stimulieren,

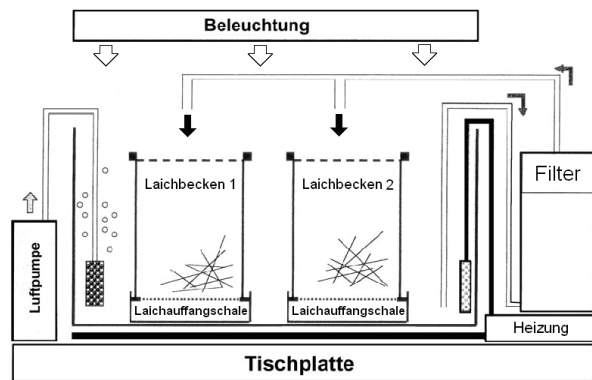


Abb. 2.6: Laichanlage (nach König 2002).

wurde am Tag vor dem Abläichen zweimal zusätzlich mit Artemien gefüttert. Kurz vor der abendlichen Dämmerung wurden jeweils zwei weibliche und vier männliche Tiere in ein Laichbecken (Abb. 2.6) überführt. Die Laichanlage besteht aus einem großen Glasaquarium, in das fünf kleinere Kunststoffaquarien (26 x 16 x 16 cm) eingelassen sind. Die Wände dieser kleinen Aquarien sind seitlich mit schwarzem Silikon bestrichen, damit den Fischen der Einblick in benachbarte Aquarien verwehrt wird. Ein Edstahlgitter (Maschenweite 1,25 mm) ersetzt den Kunststoffboden, um zu verhindern, dass adulte Fische ihren eigenen Laich auffressen. Unter den Kunststoffbecken befinden sich Auffangschalen, deren Böden ebenfalls mit schwarzem Silikon bestrichen sind. Ein Außenfilter (Eheim, Deizisau) sorgt für eine ständige Wasserzirkulation. Zur Laichstimulation wurde in jedes Laichbecken eine Krautattrappe aus Kunststoff gelegt. Am nächsten Morgen wurden die Eier nach Beendigung von Balz und Eiablage aus den Auffangschalen entnommen und in Petrischalen überführt. Zur Testdurchführung wurden befruchtete, gleichmäßig geteilte Eier im 4- bis 32-Zell-Stadium gewählt, um eine frühestmögliche Belastung zu gewährleisten. Die Eier eines Laichvorgangs wurden nur bei einer Befruchtungsrate von > 50 % verwendet.

Kunstwasser: Um eine reproduzierbare Wasserqualität zu gewährleisten, wurde definiertes Kunstwasser nach ISO 7346/3 verwendet. Der Einfluss unterschiedlicher Wasserqualität auf die Embryonalentwicklung wird dadurch ausgeschlossen und ein Vergleich mit anderen Versuchen ermöglicht. Zur Herstellung des Kunstwassers wurden jeweils 10 ml der in Tab. 2.7 aufgeführten Stammlösungen mit 960 ml Aqua bidest. gemischt und über Nacht bis zur Sauerstoffsättigung belüftet. Vor der Anwendung wurde das Kunstwasser auf ca. 26 °C temperiert. Der pH-Wert sollte dabei einen Wert von 7,0 (± 0,2) erreichen.

Tab. 2.7: Konzentration der Stammlösungen zur Herstellung von Kunstwasser nach ISO 7346/3.

Lösung	Molarität
Calciumchlorid-2-Hydrat	40 mM
Magnesium-7-Hydrat	25 mM
Natriumhydrogencarbonat	15 mM
Kaliumchlorid	3,7 mM

Durchführung mit gefriergetrockneten Sedimenten: Die Eier wurden kurz nach der Eiablage in die vorbereiteten Proben überführt. In einigen Vorversuchen stellte sich heraus, dass die in der DIN 38415-T6 vorgeschlagenen Verdünnungsschritte für die nativen Donauproben nicht ausreichten. Deshalb mussten die Verdünnungen der Sedimente mit Quarzmehl für die einzelnen Proben speziell angepasst werden (Tab. 2.8).

Das Gemisch aus gefriergetrockneter Probe und Quarzmehl wurde mit einem Mörser homogenisiert. Für jede Verdünnung wurden viermal je 3 g in Wells einer 6-Wellplatte (TTP) überführt und mit 7 ml Kunstwasser auf 10 g Gesamtgewicht aufgefüllt. Als Negativkontrolle dienten vier Wells mit je 3 g Quarzmehl und 7 ml Kunstwasser. Als Positivkontrolle wurde 3,4-Dichlorphenol in einer Konzentration von 3,7 mg/L verwendet. Für alle Konzentrationen bzw. Kontrollen wurden 20 Eier inkubiert (5 Eier pro Well). Zur mikroskopischen Bewertung der Fischeier wurden diese mit einer Plastikpipette und etwas Kunstwasser in eine kleine Petrischale überführt. Am Ende jeder Versuchsreihe wurde das Kunstwasser aus den Wells jeder einzelnen Konzentration entnommen, in ein 50 ml Becherglas überführt und der Sauerstoffgehalt mit Multi Line P4 (WTW, Weilheim) gemessen.

Tab. 2.8: Mischungsschema für alle Sediment-Quarzmehl-Verdünnungen (pro Well) und Sedimentkonzentrationen (c) in mg Sediment/ml Kunstwasser.

Sedimentanteil	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
C in mg/ml H ₂ O	600	300	150	75	37,5	18,75	9,38	4,69
Sediment in g	3	1,5	0,75	0,38	0,19	0,09	0,05	0,02
Quarzmehl in g	0	1,5	2,25	2,63	2,81	2,91	2,91	2,98

Durchführung mit acetonischen Extrakten: Das Ziel des Fischeitest mit acetonischen Sedimentextrakten ist, die langfristige Exposition von Organismen insbesondere gegenüber lipophilen Substanzen durch eine kurze Exposition mit den potentiell verfügbaren Schadstoffen nachzuahmen („worst case“-Szenario). Zur Durchführung des Tests mit Sedimentextrakten wurden am Tag der Belastung zunächst die wässrigen Lösungen der Extrakte angesetzt. Die Extrakte wurden aufgetaut und mit Kunstwasser verdünnt (Tab. 2.5). Jeweils 20 ml der verschiedenen Konzentrationen zwischen 6,25 mg SEQ/ml und maximal 200 mg SEQ/ml (mg Sedimentäquivalent pro ml Kunstwasser) wurden zur Vorinkubation in Erlenmeyerkolben vorbereitet. Je zwei Milliliter einer Konzentration wurden in zehn Wells von 24-Wellplatten pipettiert. Je vier Wells einer Platte wurde mit 2 ml Kunstwasser befüllt und dienten als Kontrollen. Ebenso wurden 10 Wells mit 3,7 mg/L 3,4-Dichloranilin (Sigma) als Positivkontrolle befüllt. In jedes Well wurde ein befruchtetes Ei, das sich im 4-Zell- oder 8-Zell-Stadium befand, gegeben. Die Wellplatten wurden verschlossen und in einem Brutschrank bei 27 °C inkubiert. Nach der Auswertung der 48 h-Inkubation wurden die Mikrotiterplatten mit einer Folie verklebt, um eine Verdunstung der Lösung während der nächsten fünf Tage zu verhindern.

2.3.4 Zellkultur

RTL-W1-Zellen: 1985 wurden von Bols et al. die Fibroblasten-ähnliche Zelllinie RTL-W1 aus Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) isoliert und 1993 von Lee et al. charakterisiert. Diese Zelllinie zeichnet sich besonders durch eine hohe Biotransformationsleistung aus. Bols et al. (1999) belasteten diese Zellen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs), woraufhin die Induktion des Enzyms Cytochrom P4501A nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde eine hohe CYP1A-Induktion nach Exposition mit β -Naphthoflavon und TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin) beschrieben, weshalb sich diese Zelllinie gut für Toxizitätstests belasteter Umweltproben eignet (Behrens et al. 2001, Billard et al. 2002, Brack et al. 2002, Clemons et al. 1997, 1998, Lee et al. 1993, Schirmer et al. 2000).

Die Pflege und Kultivierung der RTL-W1-Zellen wurde von M. Böttcher und S. Grund am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg übernommen. Diese Zellen wurden in Leibovitz-Medium (L15; Sigma) ergänzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma), 1 % Neomycinsulfat (Serva, Heidelberg) und 8 % fötalem Kälberserum (FKS; Sigma) in 80 cm² Zellkulturflaschen (NunclonTM, Nunc, Mainz) bei 20 °C kultiviert. Um die Zellen in einem ausreichenden Maß zu vermehren, mussten sie in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Für die Passage wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche dekantiert und die Zellen mit 10 ml PBS (9,55 g/L Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma) gewaschen. Anschließend wurde das PBS wieder verworfen und die Zellen, um sie vom Untergrund zu lösen, mit 2 ml Trypsin (0,05 % Schweine-Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung in Hank's balance salt solution, Sigma) versetzt. Die Protease Trypsin zerstört dabei proteolytisch die zellverbindenden Transmembranproteine Cadherin und Integrin. Calcium-Ionen, die für den Zusammenhalt der Cadherine und die Funktion der Integrine essentiell sind, werden durch den Chelator EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma) komplexiert. Die Zellen lösten sich nach etwa 2 - 3 min und wurden dann in 8 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Dabei wird das Trypsin durch die Proteaseinhibitoren des FKS gehemmt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen auf zwei neue Kulturflaschen (80 cm²) verteilt und mit je 15 ml Medium aufgefüllt.

H4IIE.Luc-Zellen: Die Kultivierung dieser Zelllinie und der DR-CALUX-Assay wurde während eines DAAD-Forschungsaufenthaltes in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des MTM-Research Centers, Department of Natural Sciences der Universität Örebro durchgeführt. Für den DR-CALUX-Assay wurde die transformierte Rattenleberzelllinie H4IIE.Luc verwendet. Die aus einer Rattenleber gewonnenen Zelllinie H4IIE-wt fand bereits mehrfach Anwendung zur Bestimmung Dioxin-ähnlicher Wirksamkeit (Clemons et al. 1997, 1998, Murk et al. 1996, Sanderson et al. 1996). Auf dem von Garrison et al. (1996) entwickelten Plasmid pGudLuc1.1 befindet sich neben vier Dioxin-Responsive-Elements (DRE) aus der Maus noch ein Luciferase-Reporter gen. Dieses Plasmid wurde stabil in die Rattenzelllinie transfiziert. Das Luciferase-Reporter gen wird durch die DREs über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) aktiviert und ermöglicht so die photometrische Messung Dioxin-ähnlicher Wirksamkeit von Monosubstanzen oder komplexen Umweltproben. In Untersuchungen von Murk et al. (1996) und Sanderson et al. (1996) konnte für die transfizierten Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber AhR-Agonisten festgestellt werden. In Anlehnung an das von Gustavsson et al. (2004) entworfene Protokoll wurden die Zellen in 10 ml Minimal Essential Medium (MEM; Invitrogen, Lidingö, Schweden), komplettiert mit 100 ml/L fötalem Kälberserum, in 75 cm² Zellkulturflaschen (Labdesign Costar, Taby, Schweden) sowie bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer 100 %-igen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4 - 6 Tagen im Dunkeln waren die Zellen zu einem geschlossenen Zellrasen ausgewachsen und

konnten passagiert werden. Zur Zellpassage wurden unter sterilen Bedingungen zunächst das alte Medium verworfen und die Zellen mit 5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; SVA, Uppsala, Schweden) gespült. Zur Dissoziation der Zellen erfolgte die Trypsinierung mit 2 ml EDTA-Trypsinlösung (SVA). Nach 30 - 60 sec wurde das Trypsin abgenommen, die Zellen durch Klopfen innerhalb von 4 min gelöst und in 10 ml komplettiertem MEM resuspendiert. Abschließend wurden in jede neu zu belegende Flasche 2,5 ml Zellsuspension in die bereits vorgelegten 10 ml Medium gegeben.

GPC.2D-Zellen: Adenocarcinom-Zellen aus dem Meerschweinchen wurden stabil mit dem Plasmid p2DLuc transfiziert (Zhou et al. 2003). Dieses Luciferase-Reporter-Plasmid beherbergt zwei artifizielle DREs und einen entsprechenden Promotor (Gasiwiecz et al.1996), wodurch diese Zelllinie imstande ist, AhR vermittelte Signaltransduktionswege zu erfassen (Zhou et al. 2003). Die GPC.2DLuc.1C12-Zellen (GPC.2D) wurden in MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sublimiert, und mit 10 % FKS und 2 mM Glutamin in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Pflege und Kultivierung der GPC.2D-Zellen entspricht der von H4IIE.Luc-Zellen und wurde von Dr. M. Klempt von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel und Dr. U. Kammann von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg durchgeführt.

2.3.5 Cytotoxizitätstest/Neutralrottest

Die akute Schädigung der Zellen mit dem Endpunkt Neutralrot wurde von S. Grund im Rahmen einer Diplomarbeit am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg untersucht. Dieser Endpunkt wurde in *In vitro*-Cytotoxizitätstests erstmals von Borenfreund und Puerner (1984) an einer Mäusezelllinie beschrieben. Der Vitalitätstest beruht auf der Annahme, dass nur intakte Zellen den leicht basischen Farbstoff Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in ihren Lysosomen zurückhalten können (Barile 1994, Segner 1998a). Werden durch cytotoxische Substanzen die Zellmembran oder die lysosomale Membran geschädigt, schlägt sich dies in einer verminderten Farbstoffretention nieder. Diese kann durch photometrische Messung ermittelt werden. Der akute Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie RTL-W1 wurde in Anlehnung an Babich et al. (1992) modifiziert nach Klee (2004) durchgeführt.

Durchführung: Im Cytotoxizitätstest wurden in DMSO gelöste Extrakte mit einer Endkonzentration von 20 g SEQ/ml DMSO getestet. DMSO verfügt über eine eigene Toxizität gegenüber den RTL-W1-Zellen, ein Gehalt von 1 % in einem Versuchsansatz mit L15 gilt jedoch als unbedenklich (Keiter et al. 2006). Ein maximaler Gehalt von 1 % DMSO entspricht einer Höchstkonzentration von 200 mg SEQ/ml je Sedimentextrakt. Je Probe wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:2-Schritten angesetzt, wodurch Konzentrationen zwischen 200 und 3,1 mg SEQ/ml erreicht wurden. Als Positivkontrolle diente 3,5-Dichlorphenol (DCP; Sigma) in einer Konzentration von 40 mg/ml. Je Ansatz wurden zwei Reihen von Negativkontrollen mitgeführt. Die zweite Negativkontrolle wurde als Validitätskriterium des Testsystems herangezogen und durfte nicht mehr als 20 % von der ersten Kontrolle abweichen. Nach Ansetzen der Verdünnungsreihen wurde die Zellsuspension in die einzelnen Kavitäten übertragen. Die Zellen wurden aus einer dicht bewachsenen Kulturflasche mittels Trypsinierung abgelöst und auf eine Konzentration von 3 - 4 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellt. Die 96-Wellplatten (TPP) wurden für 48 h in einem Inkubator bei 20 °C kultiviert. Nach Dekantieren des Expositionsmediums wurden die Zellen mit einer Neutralrotlösung (1 ml 0,4 % Neutralrotstammllösung in 79 ml L15) versetzt und für weitere 3 - 4 h bei 20 °C inkubiert. Das in intakten Zellen zurückgehaltene Neutralrot wurde durch eine Extraktionslösung (5 ml Eisessig und 250 ml Ethanol in 500 ml Aqua bidest.) unter Schütteln für 30 min rückgelöst. Im Anschluss erfolgte die Messung der

Absorption in einem Mikrotiterplattenreader (Genios) bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm. Bei der Auswertung wurde der Median der Probe prozentual gegen den Median der Kontrolle berechnet. Außerdem wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Für die Bestimmung der EC₅₀-Werte (entspricht 50 % geschädigte Zellen) wurden die Mediane der Konzentrationen in einer Dosis-Wirkungskurve graphisch (SigmaPlot 10; Systat, Point Richmond, USA) dargestellt.

2.3.6 Testverfahren zur Ermittlung der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit

2.3.6.1 EROD-Assay

Die 7-Ethoxresorufin-O-Deethylase (EROD) ist ein Biotransformationsenzym der Phase-I und gehört zur CYP1A-Enzymfamilie (Clemons et al. 1997). Es katalysiert mit hoher Spezifität die Transformation von 7-Ethoxyresorufin in das fluoreszierende Resorufin, die dabei fluorometrisch gemessene Aktivität ist direkt proportional zur Aktivität des gesamten CYP1A-Enzymsystems (Behrens et al. 1998). Einer der stärksten bekannten Induktoren des EROD-Enzyms ist 2,3,7,8-TCDD. Die Zelllinie RTL-W1 ist dafür bekannt, dass sie nach Belastung mit PAHs und insbesondere planaren PCBs sowie PCDD/Fs eine konzentrationsabhängige Steigerung der EROD-Aktivität aufweist (Behrens et al. 2001, Bols et al. 1999, Lee et al. 1993).

Durchführung: Der EROD-Assay wurde in Anlehnung an Behrens et al. (1998) mit Modifikationen nach Seiler et al. (2006) von S. Grund im Rahmen einer Diplomarbeit am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Je 2 x 100 µl einer Suspension aus RTL-W1-Zellen wurde nach dem Schema in Abb. 2.7 in die Kavitäten der Wellplatten (NU-969, NuAire; Plymouth, USA) pipettiert. Die belegten Platten wurden bei 20 °C für 72 h inkubiert, um eine ausreichende Haftung der Zellen in den Wells zu gewährleisten. Zur Vermeidung cytotoxischer Effekte wurden die Extrakte jeweils durch eine Vorverdünnung mit L15-Medium auf die Konzentration eingestellt, bei der mind. 80 % der Zellen im Cytotoxizitätstest überlebt hatten. Die Herstellung einer TCDD-Testlösung (Promochem, Wesel) mit der höchsten Konzentration von 200 pM wurde über zwei Verdünnungsschritte mit L15-Medium (Sigma) erreicht und dann auf der Mikrotiterplatte in einer Konzentrationsreihe in 1:2-Schritten weiter verdünnt. Als Negativkontrolle wurde L15-Medium verwendet. Vor der Belastung der Zellen wurde das alte Medium verworfen. Die Verdünnungsreihen der Proben wurde ebenfalls in 1:2-Schritten durchgeführt. Im Anschluss wurde jedes mit Zellen belegte Well mit L15-Medium auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt (Abb. 2.7). Die Dauer der Schadstoffexposition der belasteten Zellen betrug 72 h und erfolgte im Inkubationsschrank bei 20 °C. Danach wurde der gesamte Platteninhalt verworfen und die Platten für mindestens 1 h bei -80 °C tief gefroren, um die Zellen aufzubrechen.

Messung der EROD-Aktivität: Zunächst wurden die Proteinstandards (Rinderserum-Albumin, Sigma) und die belegten 96-Wellplatten bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde der



Abb. 2.7: Pipetierschema zur Durchführung des EROD-Assay mit RTL-W1-Zellen.

Proteinstandard in den Konzentrationen 10, 5, 3,75, 2,5 und 1,25 mg/ml mit je 3 Replika in die Wells pipettiert. Des Weiteren wurde zu jeweils 100 µl EROD-Puffer (0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,8; Merck) der Resorufinstandard (100 nM in EROD-Puffer, Sigma) in sechs Konzentrationen (50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125 nM) gegeben. Im Anschluss wurden 100 µl 7-Ethoxyresorufin (1,2 µM in EROD-Puffer, Sigma) in alle mit Zellen belegten Wells pipettiert und die Platten 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Umsetzung des Substrats zu Resorufin wurde dann durch die Zugabe von 50 µl NADPH (0,09 mM in EROD-Puffer, Sigma) in allen Wells gestartet. Die Reaktion wurde nach 10 min (lichtgeschützt) mit 100 µl eiskalter Fluorescaminlösung (0,15028 mg/ml 4-Phenyl-spiro [furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion, Sigma) gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die EROD-Aktivität fluorometrisch (Extinktion bei 544 nm und Emission bei 590 nm; Genios) bestimmt. Der Gesamtproteingehalt jedes einzelnen Wells wurde über das Fluorescamin bei einer Extinktion bei 355 nm und Emission bei 460 nm gemessen.

Auswertung: Die Fluoreszenzdaten wurden von der Software Magellan 6 (Tecan) automatisch in Excel™ (Microsoft) exportiert und unter Verwendung einer Vorlage ausgewertet. Zur Ermittlung der EROD-Aktivität wurde zunächst der Median der Blanks von allen erhaltenen Fluoreszenzwerten abgezogen. Aus den Messwerten der Standards wurden die Protein- und Resorufin-Standardkurven erstellt. Anhand der Standardkurven konnte mit den Fluoreszenzdaten der einzelnen Wells, deren absolute Resorufin- bzw. Proteinmengen bestimmt werden. Diese Absolutwerte wurden wiederum verwendet, um die EROD-Aktivität für jedes Well mit folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \text{Resorufinmenge [pM]} / (\text{Proteinmenge [mg]} \times \text{Reaktionszeit [min]})$$

Die Daten wurden graphisch mit GraphPad Prism 4 ausgewertet. Die ermittelten Werte der Verdünnungsreihe wurden in Form einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. In die Grafik wurden außerdem noch die Werte der Negativ- und Positivkontrolle miteinbezogen. Zur Auswertung wurde der EC_{25-TCDD} [mg/ml] graphisch aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt. Dieser Wert beschreibt die Konzentration der Probe, die 25 % der maximalen EROD-Aktivität von TCDD erreicht.

Bio-TEQ: Bio-TEQ-Werte (TEQ = TCDD equivalent concentration) drücken die Fähigkeit der Proben aus, EROD in Relation zur Positivkontrolle TCDD zu induzieren. Je höher der Bio-TEQ-Wert der Probe, desto höher deren Induktionsfähigkeit. Die Bio-TEQ-Werte wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Bio-TEQ [pg/g]} = \text{TCDD EC}_{25} \text{ [pg/ml]} / \text{Extrakt EC}_{25\text{-TCDD}} \text{ [mg/ml]}$$

2.3.6.2 DR-CALUX-Assay

Der DR-CALUX-Assay wurde in Anlehnung an Gustavsson et al. (2004) mit Modifikation nach Olsman et al. (2007) im Rahmen zweier DAAD-Forschungsaufenthalte in den Jahren 2004 und 2005 an der Universität Örebro durchgeführt. Im diesem Testverfahren werden die H4IIE.Luc-Zellen mit dem zu untersuchenden Probenextrakt belastet. Sind Dioxin-ähnliche Substanzen enthalten, kommt es über die Aktivierung der DREs zu einer Synthese der Luciferase in den Zellen. Durch Zugabe des Substrats Luciferin kann dieses unter Emission von Licht, in einer von ATP, Sauerstoff und Magnesium abhängigen Reaktion, zu Oxyluciferin umgesetzt werden. Die Lichtemission ist dabei proportional zur Menge und Potenz des CYP1A Induktors (Sanderson et al. 1996). Die Ergebnisse wurden auf die gleiche Weise verarbeitet und dargestellt wie die Ergebnisse des EROD-Assays.

Durchführung: Einen Tag vor der eigentlichen Belastung der Zelllinie H4IIE.Luc wurden die Zellen aus einer zu 90 - 100 % bewachsenen Zellkulturflasche (75 cm², TCP) in eine 96-Wellplatte überführt.

Um den Zellen Gelegenheit zu geben an den Platten festzuwachsen, wurden sie für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln inkubiert. Für die Belastung wurden die Verdünnungsreihen von Proben und Positivkontrolle in 24-Wellplatten angesetzt und von dort jeweils 100 µl der betreffenden Konzentration in die Wells der zu belastenden Platte überführt. TCDD wurde in 1:3-Verdünnungsschritten zu Konzentration zwischen 0 bis 300 pM als Positivkontrolle verwendet. Die in DMSO (Fluka) gelösten Proben wurden hingegen in 1:2-Verdünnungsschritten angesetzt. Die Verdünnung der Kontrolle sowie der Proben erfolgte in MEM (Invitrogen), wobei darauf geachtet wurde, dass ein DMSO-Gehalt über 1 % nicht überschritten wurde. Die Belastung erfolgte über 24 h unter den oben genannten Bedingungen.

Messung und Auswertung: Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal vorsichtig mit je 100 µl PBS gespült und im Anschluss in jeden Well 25 µl PBS pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren, um die Zellen aufzuschließen. Zur Auswertung wurden 25 µl Luclite-Lösung (Luclite® Kit, Perkin Elmer, USA) in die belegten Wells pipettiert und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 30 µl der Zellsuspension in eine weiße 96-Wellplatte (GTF, Immuno-FluoroNunc PolySorp 96C) überführt und diese im Reader (Wallace 1420, Victor2, Perkin Elmer) photometrisch vermessen. Die Messwerte wurden als Excel-Datei ausgegeben und in eine entsprechende Auswertevorlage kopiert. Die Ergebnisse wurden als sigmoidale Dosis-Wirkungskurve (mit variablem Slope) in GraphPad Prism 4.0 dargestellt. Aus dem Vergleich zwischen TCDD-Höchstwert und der Dosis-Wirkungskurve der Probe wurde unter Berücksichtigung des EC_{25-TCDD} der Bio-TEQ-Wert der Probe ermittelt.

2.3.6.3 GPC.2D-Assay

Durchführung: Der GPC.2D-Assay wurde in Anlehnung an das in Olsman et al. (2007) vorgestellte Protokoll von Dr. M. Klemp von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Hamburg durchgeführt. Mittels Trypsinierung (Trypsin/EDTA Lösung) wurden die Zellen in 96-Wellplatten (TPP) überführt (25000 Zellen pro Well). Die Zellen wurden über Nacht inkubiert, um ihnen Gelegenheit zum Anwachsen zu geben. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Konzentrationsreihe (0,0014 - 80 nM, 0,0042 - 25 pg/ml) mit TCDD (Ehrenstorfer, Augsburg) oder Sedimentextrakten (maximaler DMSO-Gehalt von 0,6 %) für 24 h exponiert. Alle Proben wurden in fünf verschiedenen Konzentrationen und in drei unabhängigen Replika getestet. Nach der Exposition wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 50 µl Lysepuffer (25 mM Glycoglycerin, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerin) aufgelöst.

Messung und Auswertung: Zur Lumineszenz-Messung wurde in jeden Well 30 µl einer Luciferin-Lösung (Tris (20 mM, pH 7.8), MgCl₂ (5 mM), EDTA (0.1 mM), Dithiotreitol (33 nM), Co-Enzyme A (270 µM), Luciferin (470 µM) und ATP (530 µM)) pipettiert und die Platten in einem FLUOstar Optima Reader (BMG Labtech, Offenburg) photometrisch vermessen. Die Daten wurden mittels der Subtraktion der Mittelwerte 5 sec vor und 13 sec nach der Injektion der Luciferin-Lösung ermittelt und im Anschluss als sigmoidale Dosis-Wirkungskurve (mit variablem Slope) in GraphPad Prism 4.0 graphisch abgebildet und zur Bestimmung des EC₂₅ herangezogen. Die Ergebnisse wurden in Relation zu TCDD als Bio-TEQs dargestellt. Der mittlere EC₂₅-Wert von TCDD betrug 0,047 nM (15 pg/ml) und wurde aus 35 Experimenten berechnet.

2.3.7 Tests zur Bestimmung der Gentoxizität und Mutagenität im eukaryotischen System

2.3.7.1 Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen und *Danio rerio*

Mit dem auch als Einzelzellelektrophorese bezeichneten Comet-Assay lassen sich die DNA-Schäden auf der Ebene einzelner eukaryotischer Zellen beobachten. Die Kometenbildung beruht auf der selektiven Wanderung von DNA-Fragmenten während einer Elektrophorese (Singh et al. 1988). Neben der Zelllinie RTL-W1 wurden auch Zellen von *Danio rerio* verwendet. Beide Testvarianten wurden im Rahmen der Diplomarbeiten von M. Böttcher und N. Seitz am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg durchgeführt. In beiden Verfahren wurde streng darauf geachtet, dass eine in der Probe festgestellte Cyto- bzw. Embryotoxizität ein gentoxisches Potential nicht verdeckt bzw. vortäuscht. Wenn notwendig wurden die Proben soweit verdünnt, dass mehr als 80 % der Zellen bzw. Embryonen nach einer Belastung mit den Sedimentextrakten bzw. nativen Sedimenten nicht akut geschädigt wurden (Schnurrstein & Braunbeck 2001). Die Durchführung des Comet-Assay orientiert sich an dem von Schnurrstein (2000) verwendeten Schemas mit Modifikationen nach Kosmehl et al. (2004, 2006).

Exposition der Zelllinie RTL-W1: Zur Exposition der Zellen gegenüber den Sedimentextrakten wurden die Zellen aus einer Kulturflasche in 6-Wellplatten (TTP) passagiert und zunächst für 24 h bei 20 °C inkubiert. Die Exposition erfolgte durch den Austausch mit L15-Medium, das zuvor mit einer Probe in vier unterschiedlichen Konzentrationen versetzt wurde. Für die Negativkontrolle wurden zwei Kavitäten nur mit neuem Medium befüllt. Als Positivkontrolle dienten RTL-W1-Zellen aus zwei Wells, die für 4 min mit UV-Licht (240 - 280 nm) exponiert wurden. Nach einer Expositionszeit von 20 h wurden die Zellen mittels Trypsinierung über 2 - 3 min vom Untergrund gelöst. Durch Zugabe von 800 µl L15-Medium wurde die Wirkung der Protease gestoppt und die Zellsuspension bei 150 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 70 - 150 µl Medium resuspendiert.

Exposition und Isolation von Zellen aus *Danio rerio*: Die Belastung der Zebrafischembryonen auf nativem Sediment wurde analog zur Exposition im Embryotoxizitätstest (vgl. Abs. 2.3.3) durchgeführt. Bei jedem Standort wurde darauf geachtet, dass die höchste eingesetzte Verdünnung der Konzentration entsprach, bei der mind. 80 % der Embryonen im Fischeitest nach 72 h nicht koaguliert waren. Je Konzentration wurden zwei Wells mit je 3 g Sediment/Quarzmehlgemisch, 5 ml Kunstwasser und fünf Eiern befüllt. Außerdem wurden in jedem Test jeweils zehn Eier auf Quarzmehl als Negativkontrolle verwendet. Zur Erzeugung einer Positivkontrolle wurden unbelastete Zebrafischembryonen (Inkubation der Eier in Kunstwasser) für eine Stunde in 0,1 % H₂O₂ inkubiert und anschließend wie die übrigen behandelt.

Nach einer Belastungsdauer von 72 h wurden 7 - 8 Eier bzw. geschlüpfte Larven vom Sediment genommen, kurz in Kunstwasser gespült und in einer gesättigten Benzocain-Lösung betäubt (Ethylaminobenzoat, Sigma). Anschließend wurden die Tiere in PBS gespült und in einen Glas-Homogenisator (Multimed Wicker GmbH, Kirchheim-Teck) mit 2 ml PBS (ergänzt mit 10 % FKS, Sigma) gegeben. Das embryonale Gewebe wurde nach der Methode von Kosmehl et al. (2006) durch 4-maliges Zerreiben bei einer Rotation um 90 ° gleichmäßig homogenisiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde durch eine Gaze (75 µm Maschenweite; Verseidag, Krefeld) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Safe LockTM, Eppendorf) filtriert, so dass für jede Konzentration zwei Replika vorlagen. Die Reaktionsgefäße wurden bei 150 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Multifuge 1S-R, Kendro,

Osterode). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet im verbleibenden Tropfen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Comet-Assay verwendet.

Durchführung: Die Gele für die Elektrophorese wurden auf angeraute Objektträger pipettiert, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Die Haftung wurde zusätzlich dadurch verbessert, indem 700 µl eines 1 % NMA-Gels (Normal temperature melting Agarose, Seakem Gold, Fa. FMC Bio-products, Rockland, USA) gleichmäßig aufgetragen und für 5 - 10 min bei 37 °C angetrocknet, im Anschluss wieder entfernt und die Objektträger vollständig getrocknet wurden. Die zweite Gelschicht bestand aus einem 0,5 % NMA-Gel, wovon je 200 µl auf die Objektträger pipettiert und gleichmäßig mit einem Deckglas verteilt wurden. Zur Härtung der Gele wurden die Objektträger für 3 min auf Eis und anschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 70 µl der Zellsuspension (RTL-W1 bzw. *Danio rerio*) mit 90 µl 0,7 % LMA-Gel (Low temperature melting Agarose, Seakem Gold) versetzt, resuspendiert, auf den Objektträgern verteilt und gleichfalls für 3 min auf Eis gehärtet und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Als Deck- bzw. Schutzschicht wurde ebenso 90 µl LMA-Gel auf die Zellschicht aufgetragen, wiederum auf Eis gehärtet und bei 37 °C für 5 min getrocknet. Danach wurden die Objektträger in die 4 °C kalte Lyselösung (146,5 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris in 700 ml Aqua bidest. lösen, mit NaOH-Plättchen auf pH 10 einstellen, 10 g Sacrosinat zugeben und auf 890 ml auffüllen; vor Versuchsbeginn mit 1 % Triton X-100 in 10 % DMSO komplettieren) für mind. 1,5 h überführt. Nach der Elektrophorese für 20 min bei 25 V und 300 mA (Power supply Model 200/2.0, Bio-Rad, Richmond, USA) in 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer (pH < 13; 24 g NaOH und 0,74 g EDTA in 2 L Aqua bidest.) wurden die Objektträger zur Neutralisation für 2 min bei pH 7,4 in 400 nM Tris-Puffer getaucht.

Messung und Auswertung: Zur Auswertung wurde jedes Gel mit 75 µl einer Ethidiumbromid-lösung angefärbt. Die Vermessung der Kometen fand an einem Fluoreszenzmikroskop bei 340-facher Vergrößerung statt, das mit einem Bildanalysesystem, bestehend aus einer Graustufen-CCD-Kamera (Pulnix TM-765E Kinetic), einem PC und der Auswertungssoftware Comet 3.0TM (Kinetic Images, Liverpool, GB), verbunden ist. Pro Probe wurden zwei Gele ausgewertet, auf denen jeweils 50 zufällig ausgewählte Zellkerne vermessen wurden. Mit Hilfe eines Makros für ExcelTM (Microsoft) von Kinetic Images kann auf die primären Daten der Messung zugegriffen werden. Als Auswertungsparameter wurde das Tail-Moment (Produkt aus Schweiflänge und Fluoreszenzintensität im Schweif) verwendet. Diese Methode berücksichtigt die beiden wichtigsten Variablen, nämlich die Länge des Kometenschweifs und den Anteil der DNA im Schweif (Ashby 1995, Schnurstein & Braunbeck 2001). Die Daten (100 Tail-Moments je Konzentration) wurden graphisch mit dem Programm SigmaPlot 10 (Systat) als Box-Plot dargestellt. Mittels einer einfaktoriellem nicht-parametrischen Varianzanalyse (ANOVA on Ranks-Test) mit nachfolgendem Dunnett-Test (SigmaStat 3.5, Systat) wurde überprüft, ob sich die nicht-normalverteilten Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ signifikant von den Kontrollen unterscheiden. Für alle Proben wurde ein Induktionsfaktor angegeben, der sich als Quotient des Median der Probe und dem Median der Kontrolle errechnet.

2.3.7.2 Mikronukleustest mit der Zelllinie RTL-W1

Die Durchführung des Mikrokerntests mit der Zelllinie RTL-W1 erfolgte in Anlehnung an das Testprotokoll von Schnurstein (2000), der verschiedene Monosubstanzen im Mikrokerntest mit RTG-2-Zellen testete. Zunächst wurden in jede Kavität einer 6-Wellplatte (TPP) ein Deckgläschen (22 mm x 22 mm, Assistent, Sondheim) und 2 ml Zellsuspension gegeben. Die Wellplatten wurden bei 20 °C für mind. 12 h inkubiert, um den RTL-W1-Zellen die Gelegenheit zu bieten an den Deckgläschen

anzuhaften. Zur Exposition der Zellen mit den Extrakten wurde im ersten Schritt das L15-Medium verworfen und durch mit Sedimentextrakten versetztem Medium in verschiedenen Konzentrationen ersetzt. Nach einer Expositionszeit von 20 h bei 20 °C wurde das belastete Medium gegen unbelastetes Medium getauscht und die Zellen für weitere 72 h inkubiert. Diese Nachinkubation ist notwendig, um zu gewährleisten, dass sich jede Zelle einmal unter Schadstoffeinfluss teilt. Zur Fixierung wurden die Zellen zunächst in eine 1:1-Mischung aus PBS/Methanol-Essigsäure-Gemisch (4:1) und anschließend in ein Methanol-Essigsäure-Gemisch (4:1) überführt. Nach der Lufttrocknung erfolgte die Färbung der Zellen in Giemsa-Lösung (Gurr, BDH Laboratory Supplies, Poole, UK). Hierzu wurden die Deckgläschen für 1 min in die unverdünnte Stammlösung getaucht und im Anschluss zweimal in PBS gespült, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Das Eindecken erfolgte in DePeX (Serva).

2.4 *In vivo*- und *In situ*-Testverfahren

2.4.1 Elektronenmikroskopie

Im Rahmen dieser Studie wurden ultrastrukturelle Veränderungen in Hepatocyten von Barben (*Barbus barbus*) aus unterschiedlichen Standorten der Donau im Rahmen der Diplomarbeit von S. Grund am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg elektronenmikroskopisch untersucht. Durch den Vergleich mit zwei im Labor gehaltenen Versuchstiergruppen sollten mögliche Schadstoffbelastungen der Donaustandorte erfasst werden.

Testorganismus: Aufgrund ihrer sedimentnahen Lebensweise (Terofal 1996) wurde für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Barbe (*Barbus barbus*) ausgewählt (Abb. 2.8). Stellvertretend für den allgemeinen Rückgang der Fischbestände in der Donau wurden Barben von verschiedenen Standorten hinsichtlich ultrastruktureller Veränderungen der Leber untersucht.



Abb. 2.8: *Barbus barbus* (Terofal 1996).

Die Barbe erreicht unter natürlichen Lebensbedingungen eine Länge von 30 - 60 cm und weist einen lang gestreckten, schlanken, symmetrischen Körper mit einer tief eingeschnittenen Schwanzflosse auf. Auffällig sind die vier dicken Bartfäden am oberen Rand der Lippen des unterständigen Mauls. Die Färbung der Barben kann je nach Lebensraum stark variieren. Sie kommt als geselliger Grundfisch in fast allen größeren und klaren Fließgewässern West- und Mitteleuropas vor. Die Tiere erreichen mit drei bis fünf Jahren die Geschlechtsreife und laichen dann jährlich zwischen Mai und Juli. Die Weibchen legen dabei 3000 - 9000 Eier auf dem Gewässergrund zwischen Steinen und Kies ab. Die adulten Tiere ernähren sich hauptsächlich von im Sediment lebenden Insekten, Würmern, Schnecken und gelegentlich auch von Fischbrut. Die Barbe ist Leitfisch des Mittellaufs unserer Flüsse (Terofal 1996).

Elektrobefischung: An den Standorten Riedlingen, Ehingen und Rottenacker wurden mit der Unterstützung von Dr. K. Wurm und örtlichen Fischern mittels Elektrobefischung Barben gefangen, betäubt, danach vermessen und perfundiert. Zudem wurden weitere Fische in Riedlingen entnommen, nach Heidelberg transportiert und dort über einen Zeitraum von zwei Monaten an die Laborbedingungen adaptiert. Die Elektrobefischung eignet sich in gut für Fischbestandsaufnahmen, da

eine große Zahl an Fischen innerhalb kurzer Zeit gefangen werden kann. In den meisten Fällen werden die Tiere nur für wenige Minuten betäubt und Verletzungen treten eher selten auf. Als Stromquelle diente ein Gleichstromaggregat, das eine Leistung bis zu 10 kW aufweisen kann. Das Aggregat erzeugt im Wasser ein Kraftfeld zwischen der Anode und Kathode. Die Anode (Fangpol) ist am Kescher angebracht, während die Kathode (Scheuchpol) im Wasser schwimmt. Wird der Kescher ins Wasser gehalten, schließt sich der Stromkreis, und die Fische werden durch einen Leitstrom an den Kescher herangeführt und betäubt.

Haltung der Versuchstiere: Die gefangenen Tiere aus Riedlingen wurden nach ihrem Transport nach Heidelberg in 400 L Becken unter ständigem Frischwasser- und Sauerstoffzustrom bei einer Wassertemperatur von 15 °C über einen Zeitraum von 2 Monaten gehalten. Sie wurden einmal täglich mit handelsüblichem Forellenfutter sowie einmal wöchentlich mit Mückenlarven gefüttert. Als zweite Kontrolltiergruppe dienten Barben aus dem Rhein. Diese wurden von einem Berufsfischer (Firma Götz; Karlsruhe) bezogen, der die Tiere ebenfalls mittels Elektrofischerei gefangen hatte. Sie wurden in 80 L Tonnen nach Heidelberg transportiert und 2 Monate unter den gleichen Laborbedingungen wie die Fische aus der Donau gehalten.

Chemikalien und Lösungen:

- Benzocainlösung: Ethyl-4-Aminobenzoat (Sigma) in H₂O gelöst; gesättigte Lösung.
- 25 %-ige Paraformaldehyd-Stammlösung: 12,5 g Paraformaldehyd (Sigma), 50 ml H₂O und 5 - 6 Tropfen NaOH (Merck) unter Rühren zum Sieden bringen bis die Lösung klar ist; Abkühlung und Filtration.
- Na₂HPO₄-H₂O-Puffer (0,2 M): 35,60 g Na₂HPO₄·H₂O (AppliChem, Darmstadt) auf 1 L Aqua bidest.
- NaH₂PO₄-H₂O-Puffer (0,2 M): 27,60 g NaH₂PO₄·H₂O (Merck) auf 1 L Aqua bidest.
- Perfusionsfixans I: 1,5 % Glutardialdehyd (Merck), 1,5 % Paraformaldehyd und 2,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; Merck) in 0,1 M Phosphatpuffer; pH-Wert 7,6 mit Na₂HPO₄ einstellen; mit Aqua bidest. auffüllen.
- Perfusionsfixans II: 2,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M Cocodylatpuffer mit 4 % Polyvinylpyrrolidon und 0,05 % CaCl₂ Riedel de Haën); pH-Wert 7,6.
- Cacodylatpuffer (CAC): Stammlösung (0,4 M) aus 85,60 g CAC (Serva) auf 1 L Aqua bidest.; pH Wert 7,6; Gebrauchslösung (0,1 M).
- Maleatpuffer: Stammlösung 1 (0,2 M) aus 23,20 g Maleinsäure (Fluka) auf 1 L Aqua bidest.; Stammlösung 2 aus 0,2 M NaOH; Puffer: 50 ml Stammlösung 1 und 7,2 ml Stammlösung 2 mit Aqua bidest. auf 200 ml Endvolumen auffüllen; pH-Wert 5,2.
- „Reduziertes Osmium“ nach Karnovsky: 2 % OsO₄-Lösung in Aqua bidest. 1:1 mit 3 % Kaliumhexacyanoferrat II (K₄[Fe(CN)₆] Uranylacetat 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer.
- Spurr: 10 g Vinylcyclohexendioxid (Sigma), 5 g Diglycidylether des Propylenglycol (Sigma), 26 g Nonenylbernsteinsäureanhydrid (Serva) und 0,4 g Dimethylaminoethanol (Serva).
- Richardson-Färbelösung: 1 % Azur II in Aqua bidest. 1:1 Mischung mit 1 % Methylenblau in 1 % Borax (Natrium-Tetraborat).
- Bleicitrat: 1,33 g Pb(NO₃)₂, 1,76 g Na₃(C₆H₅O₇)·2H₂O, 30 ml Aqua bidest. und 8 ml 1M NaOH mit Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen; pH-Wert 12.

Perfusion und Entnahme der Leberproben: Bei der Fixierung der Fische durch Perfusion werden die Blutgefäße als Leitungssystem für das Fixierungsmittel genutzt. Das Blut wird bei diesem Vorgang gegen das Perfusionsfixans ausgetauscht, wodurch das Tier innerhalb kurzer Zeit vollständig fixiert wird. Stressreaktionen der Zellen (z.B. Aufblähen verschiedener Zellorganellen) können dadurch

weitgehend vermieden werden. Die Ultrastruktur von Hepatocysten ist für verschiedene Arten von Fischen jeweils typisch und zeigt charakteristische Merkmale, die sich von anderen Arten unterscheiden (Byczkowska-Smyk 1968, Chapman 1981, Hinton & Pool 1976, Quaglia 1976a, Rutschke & Brozio 1974). Auch innerhalb einer Art zeigen sich alters-, geschlechts- und jahreszeitlich bedingte Unterschiede (Quaglia 1976b). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Barben mit ähnlicher Größe und Gewicht ausgewählt. Eine Bestimmung des Geschlechts war aus jahreszeitlichen Gründen nicht möglich.

Die Barben wurden in einer gesättigten Benzocainlösung betäubt, vermessen, gewogen und anschließend in Rückenlage auf einer Schaumstoffplatte fixiert. Durch mehrere Schnitte zwischen den Brustflossen konnte das Herz freigelegt werden (Abb. 2.9). Um das verdrängte Blut abfließen zu lassen, wurde ein Schnitt in den Sinus venosus gesetzt. Nun wurde eine Mikroinjektionskanüle (Braun, Melsungen) in den Ventrikel eingeführt und das Perfusionsfixans I mittels einer Ismatec IP-12 Schlauchpumpe über verlängerte Tygonschläuche mit einer Durchflussrate von ca. 1,5 ml/min in das Blutsystem der Tiere gepumpt. Durch Beobachtung der Kiemenfärbung und Abtasten des Rumpfes konnte abgeschätzt werden, wann das Tier vollständig fixiert war. Druck und Dauer der Perfusion sind abhängig von der Größe der Fische. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leibeshöhle eröffnet, Teile der Leber entnommen und in Perfusionsfixans I bei 4 °C inkubiert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Tieren zu gewährleisten, wurden die Leberproben stets im vorderen Bereich entnommen.



Abb. 2.9: Ventral geöffnete Barbe (*Barbus barbus*). Das Tier wurde mit Stecknadeln auf dem Schaumstoffblock fixiert und das Herz freigelegt.

Einbettung der Leberproben: Die fixierten Leberstücke wurden in 0,1 M Cacodylat-Puffer in kleine quadratische Blöcke von 1 - 2 mm Kantenlänge zugeschnitten. Danach wurden diese Stücke in Perfusionsfixans II überführt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Formaldehyd und Glutaraldehyd im Perfusionsfixans I und II sorgen für eine Quervernetzung der Proteinstrukturen der Gewebeproben und gewährleisten so die Fixierung aller Gewebestandteile auf Proteinbasis. Es folgte zweimal ein 10 minütiger Spülvorgang mit 0,1 M Cacodylatpuffer. Anschließend erfolgte die Osmierung nach Karnovsky (1964) für 2 h bei 4 °C. Osmium dient der Fixierung von Lipiden und Glykogen. Darüber hinaus wirkt es durch sein hohes Atomgewicht als Kontrastmittel für die spätere Elektronenmikroskopie. Nun folgte erneut ein zweimal 10 minütiges Spülen mit 0,1 M Cacodylatpuffer. Daraufhin wurden die Proben 3 x 10 min in 0,05 M Maleatpuffer gespült. Die *En bloc*-Kontrastierung erfolgte in 1 %-igem Uranylacetat bei 4 °C im Dunkel für mind. 1 h. Durch die Kontrastierung mit Uranylacetat lagern sich Uranylionen an Phosphatgruppen in Phospholipiden und Nucleinsäuren an. Mit ihrem hohen atomaren Gewicht sorgen sie somit für einen guten Kontrast im Elektronenmikroskop. Im Anschluss wurde wieder 3 x 10 min mit 0,05 M Maleatpuffer gespült. Zur schrittweisen Entwässerung der Proben wurde eine Alkoholreihe verwendet, wobei die Leberstücke jeweils 3 x 10 min mit 50-, 75-, 85-, 95- und 100 %-igem Ethanol gespült wurden. Im Anschluss erfolgte die Einbettung in Kunstharz (Spurr). Zunächst wurde ein 1:1-Gemisch aus Ethanol und Spurr zu den Proben gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurde auf ein Verhältnis von 1:3 mit dem Kunstharz aufgefüllt und erneut bei 4 °C inkubiert. Nach mind. 5 h wurde das Gemisch durch reines Spurr ersetzt und für

mind. 6 h bei 4 °C aufbewahrt. Im letzten Arbeitsschritt wurden Beem-Kapseln mit reinem Spurr befüllt und die Leberstücke auf dem Boden der Kapseln platziert. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 24 h bei 65 °C.

Anfertigung der Ultradünnschnitte: Die eingebetteten Leberstücke wurden unter einem Binokular zu einem trapezförmigen Pyramidenstumpf getrimmt. Die zur Basis breiter werdende Pyramidenform reduziert beim späteren Schneiden entstehende Erschütterungen. Zur Vorbereitung auf die Anfertigung der Ultradünnschnitte wurden zunächst Semidünnschnitte von 0,5 - 1,5 µm Dicke mit einem Glasmesser gefertigt und somit die Oberfläche der Probenschnittfläche geglättet. Die Schnitte wurden mit Richardson-Färbelösung (Richardson 1960) gefärbt und dienten der ersten Orientierung im Gewebe. Die Glasmesser wurden mit einem Knifemaker (LKB Bromma 7800, Vällingby, Schweden) hergestellt. Zur Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte wurde ein Ultracutmikrotom (Reichert-Jung, Nußloch) mit thermischem Vorschub benutzt. Die 50 - 100 nm dicken Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser gefertigt und direkt auf Grids der Maschenweite 300 (Plano, Wetzlar) aufgezogen. Zur Hervorhebung von Membranstrukturen wurden die Ultradünnschnitte für ca. 2 min mit Bleicitrat (Reynolds 1963) kontrastiert.

Elektronenmikroskopische Auswertung: Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Zeiss EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM). Von jedem Fisch wurden mehrere Schnitte hinsichtlich möglicher ultrastruktureller Veränderungen mikroskopiert und jeweils 15 - 20 Photographien gefertigt (Agfa Scientia EM Film; 8,3 cm x 10,2 cm). Charakteristische Merkmale und Auffälligkeiten in den Zellen und/oder der einzelnen Zellorganellen wurden in einer Liste aufgenommen. Durch Vergleich aller Fische eines Standortes sollten Besonderheiten hinsichtlich der zellulären Organisation für jeden Standort ermittelt werden. Danach wurden die Befunde der einzelnen Standorte miteinander verglichen und ausgewertet.

2.4.2 Mikronukleustest mit Erythrocyten aus der Barbe

Aufgrund ihrer großen Anzahl auch in kleinen Blutvolumina sowie ihrer guten Anfärbbarkeit wurden für die Untersuchung der *In vivo*-Gentoxizität im Mikrokerntest Erythrocyten aus Barben verwendet, die im Gegensatz zu Säugererythrocyten noch über einen Zellkern verfügen (al-Sabti & Metcalfe 1995, Kirsch-Volders et al. 2003). Mit Hilfe einer heparinisierten Glaskapillare (Hawksley and Sons Limited, Lancing, UK) wurde den Barben unmittelbar vor der Perfusion (vgl. Abs. 2.4.1) das austretende Blut entnommen und auf einem mit 99 % Ethanol entfetteten und luftgetrockneten Objektträger aufgetragen und verteilt. Dieser Schritt sollte zügig erfolgen, da Fischblut sehr schnell koaguliert. Die Blutausrichungen wurden nun für 5 min an der Luft getrocknet und anschließend für 5 min in Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte nach der Lufttrocknung für 30 sec mit Giemsa. Nach gründlichem Spülen der Objektträger mit PBS wurden die gefärbten Blutausrichungen getrocknet und anschließend mit DePeX eingedeckt. Da mit der Giemsa-Färbung der Kern wesentlich stärker hervorgehoben wird als das umgebende Cytoplasma, sind Mikronuklei im Cytoplasma neben dem normalen Kern relativ einfach auszumachen (Schnurstein 2000).

2.5 Limnologische Untersuchungen

Morphologische, physikalische und chemische Wasserparameter: Bei der Beprobung wurden sechs Standorte (Sigmaringen, Riedlingen, Rottenacker und Ehingen an der Donau sowie die beiden Zuflüsse Lauchert und Schwarzach) näher charakterisiert und vor Ort die ersten morphologischen und physikalisch-chemischen Wasserparameter aufgenommen.

Freilanduntersuchungen: In Anlehnung an Kiel und Frutiger (2002) sowie Steinberg et al. (2002) wurden Bachbett, Ufergestaltung, Flussverlauf, Ufervegetation, anthropogene Nutzung, Nähe zu Bauten, Kläranlagen und sonstige auffällige Merkmale protokolliert. Die Flussbreite, die maximale und die durchschnittliche Wassertiefe an der Probenstelle wurden vermessen oder abgeschätzt. Mit der sogenannten Driftkörpermethode wurde die Zeit ermittelt, die ein auf der Wasseroberfläche treibender Gegenstand benötigt, um eine Strecke von 10 m zurückzulegen. Aus drei Messungen wurde der Mittelwert für die Fließgeschwindigkeit errechnet. Dabei ist zu beachten, dass die mittlere Strömungsgeschwindigkeit des Wassers nur etwa 85 % des Oberflächenwerts beträgt (Schwörbel 1986). Um die Färbung der Wasserproben auf Grund von Huminstoffen, Chlorophyllen und anthropogenen Verunreinigungen etc. hin zu untersuchen, wurde 1 L Wasser in Klarglasflaschen auf den Farbton hin optisch beurteilt (Klee 1993). Auch eine evtl. Trübungen und Schaumbildung wurden protokolliert. Die Prüfung des Geruchs von Wasserproben ist zwar subjektiv, gehört aber zur Standarduntersuchung von Gewässern. In dieser Studie wurde eine 1000 ml Glasflasche halbvoll mit Wasser gefüllt, mit einem Stopfen verschlossen, geschüttelt und die Geruchsempfindung nach Entfernung des Stopfens notiert (Klee 1993, Schwoerbel 1986). Die Abnahme der Lichtintensität im Wasser wird im Allgemeinen mit einer Secchischeibe abgeschätzt (Klee 1993, Schwörbel 1986). Da die Donau im untersuchten Bereich relativ flach ist und das Wasser zum Untersuchungszeitpunkt klar war, stimmte die Sichttiefe mit der maximalen Tiefe überein.

Wasserproben: Wasserproben wurden zur weiteren chemischen Analyse im Labor in Duran-Klarglasflaschen abgefüllt. Zur Bestimmung des BSB_5 wurde eine 2 L Flasche verwendet, zum Auffüllen der ersten Flasche nach jeder Messung sowie für die chemische Analyse zwei weitere 1 L Flaschen. Die Probenflaschen wurden mehrmals mit Flusswasser ausgespült, anschließend vollständig untergetaucht und gegen die Strömung so befüllt, dass keine Luftblasen, Sedimente, Pflanzenteile etc. in die Flaschen gelangten, und unter Wasser fest verschlossen. Zur weiteren Untersuchung wurden die Proben gekühlt ins Labor transportiert.

Bestimmung der chemischen Wasserparameter: Die Aufbewahrung und Behandlung der Wasserproben war abhängig von den entsprechenden Untersuchungen. Zur Bestimmung des BSB_5 wurden vollständig gefüllte und verschlossene Glasflaschen bei 20 °C im Wärmeschrank gelagert. Innerhalb von 24 h nach der Probennahme wurden die chemischen Wasserparameter: Nitrit-, Nitrat-, Ammonium- und Phosphatgehalt (Tab. 2.9; Schnelltests, Merck) bestimmt. Die Proben wurden hierfür bei 4 °C aufbewahrt. Die Messwerte wurden nach den in Tabelle 2.10 angegebenen Umrechnungsfaktoren stöchiometrisch auf den jeweiligen N- bzw. P-Gehalt umgerechnet. Wasserproben zur

Tab. 2.9: Untersuchungsmethoden zur Bestimmung chemischer Wasserparameter in mg/ml.

Parameter	Methode und Messgerätetyp
Ammoniumgehalt	Kolorimetrische Bestimmung, Merck
Nitritgehalt	Kolorimetrische Bestimmung, Merck
Nitratgehalt	Kolorimetrische Bestimmung, Merck
Phosphatgehalt	Kolorimetrische Bestimmung, Merck
BSB_5	MultiLine F/Set-3, WTW, Weilheim
AOX	nach DIN EN 1485

Bestimmung des AOX-Gehalts wurden mit Salpetersäure auf pH 2 eingestellt und bei -24 °C tief gefroren.

Tab. 2.10: Stöchiometrische Berechnung des N- bzw. P-Gehalts aus den limnochemischen Messwerten.

Messwert	Angabe als	Umrechnung
Ammoniumgehalt	Ammonium-Stickstoff (mg NH ₄ ⁺ -N/L)	1 mg NH ₄ ⁺ entspricht 0,778 mg NH ₄ ⁺ -N/L
Nitritgehalt	Nitrit-Stickstoff (mg NO ₂ ⁻ -N/L)	1 mg NO ₂ ⁻ entspricht 0,304 mg NO ₂ ⁻ -N/L
Nitratgehalt	Nitrat-Stickstoff (mg NO ₃ ⁻ -N/L)	1 mg NO ₃ ⁻ entspricht 0,226 mg NO ₂ ⁻ -N/L
Phosphatgehalt	Phosphat-Stickstoff (mg P ₂ O ₅ -P/L)	1 mg P ₂ O ₅ entspricht 0,438 mg P ₂ O ₅ -P/L

Biochemischer Sauerstoff-Bedarf (BSB₅): Die fest verschlossenen Proben wurden im Dunkeln bei 20 °C im Wärmeschrank aufbewahrt. Eine Kontrolle mit Aqua bidest. wurde mitgeführt. Fünf Tage lang wurde zweimal täglich der Sauerstoffgehalt bestimmt. Die Differenz zwischen dem anfänglichen Sauerstoffgehalt und der Messung nach fünf Tagen ergab den BSB₅ in mg O₂/L.

Absorbierbare organisch gebundene Halogene (AOX): Die AOX-Werte der Donau-Proben wurden freundlicherweise von P. Kremer am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg nach dem folgenden Verfahren ermittelt: Nach Ansäuern der Wasserprobe mit Salpetersäure absorbieren die enthaltenen organischen Substanzen im Schüttelverfahren an Aktivkohle. Die anorganischen Halogenide werden durch Spülen der Aktivkohle mit einer angesäuerten Natriumnitrat-Lösung verdrängt. Nach Abfiltrieren und Verbrennen der beladenen Kohle bei 1000 °C im Sauerstoffstrom werden die Halogenwasserstoffe absorbiert und mikrocoulometrisch bestimmt (Microcoulometer, Euroglas, NL). Das Ergebnis wird als Massenkonzentration am Chlorid angegeben und errechnet sich aus folgender Formel (DIN EN 1485):

$$Q_{Cl}(AOX) = \frac{N - N_0}{V} \cdot \frac{M \cdot a}{F} \cdot D$$

- N₀ Blindwert in Coulomb
- N Messwert der absorbierten organisch gebundenen Halogene als Q in Coulomb
- M molare Masse Chlorid, M = 35,45 x 10³
- V Volumen der Probe für die Absorption in Liter
- a Korrekturfaktor
- F Faraday-Konstante, F = 96487 C/mol
- D Verdünnungsfaktor, falls zutreffend

2.6 Statistische Methoden und Bewertungsverfahren

2.6.1 Mittelwertvergleiche

Um zu überprüfen ob sich die empirisch ermittelten Daten aus den unterschiedlichen biologischen Verfahren signifikant von den jeweiligen Kontrollen unterscheiden, wurden verschiedene statistische Analysemethoden verwendet. Da bei Daten aus biologischen Tests nicht *a priori* von einer Normalverteilung und Varianzhomogenität ausgegangen werden kann (Hollert et al. 2002b), wurden die Daten gemäß Abb. 2.10 mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat) analysiert.

Normalverteilung: Die Normalverteilung unterstellt eine symmetrische Verteilung von Daten in Form einer Gauß-Glocke, bei der sich die Werte eines Datensatzes in der Mitte der Verteilung konzentrieren und mit größerem Abstand zur Mitte immer seltener auftreten. Zur graphischen Darstellung der Normalverteilung verwendet man folgende Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

x = Variable
 μ = Durchschnitt oder Mittelwert
 σ = Standardabweichung

Eine andere Form der Darstellung bietet die kumulative Normalverteilung. Dabei handelt es sich um das Integral der oben aufgeführten Formel und stellt die Fläche unterhalb der Gauß-Glocke als sigmoidale Funktion dar. Sie erlaubt auch eine graphische Ermittlung des Vertrauensbereichs (= Konfidenzintervall) eines Datensatzes. Um auf eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung metrischer Daten zu testen, verwendet man den Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei ordinal bzw. nominal skalierten Daten hingegen verwendet man den χ^2 -Test. Für beide Verfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Erfüllten die geprüften Datensätze die Anforderungen (Normalverteilung und Varianzhomogenität), wurden die Gruppen mit parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Wenn jedoch die Datensätze der entsprechenden Versuchsreihe entweder der Normalverteilung oder der Varianzhomogenität nicht hinreichend genügten, wurden die Daten mit verteilungsfreien, nicht-parametrischen Verfahren analysiert.

Varianzhomogenität: Außerdem wurde überprüft, ob die Varianz der Datensätze homogen mit $p < 0,05$ ist. Varianzhomogenität liegt vor, wenn die Varianz/Standardabweichung eines Datensatzes für alle Ausprägungen einer Variablen nicht signifikant abweicht, d.h. die Streuung innerhalb eines Datensatzes gering ist (Bärlocher 1999).

Nullhypothese: In der Statistik versteht man im Allgemeinen unter der Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen zwei oder mehreren Zufallsvariablen zu finden ist, bis dies durch einen statistischen Test (z.B. t-Test oder ANOVA) widerlegt werden kann (Bärlocher 1999). Mittels eines Signifikanzniveaus wird festgestellt, ab wann die Nullhypothese verworfen werden kann und man die

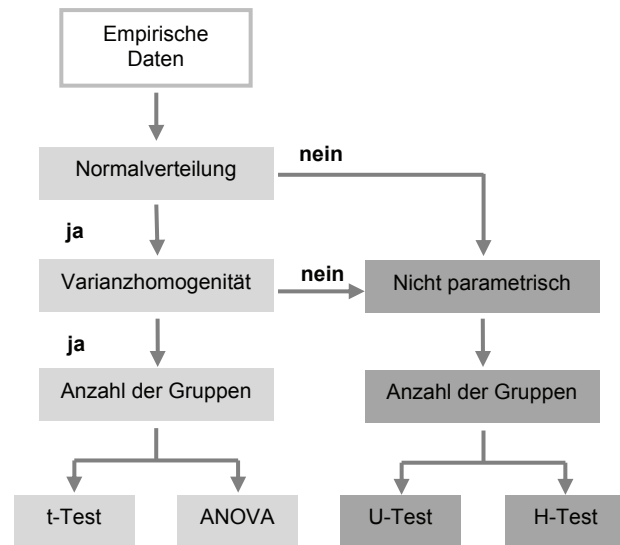


Abb. 2.10: Entscheidungsschema für die Auswahl des geeigneten Mittelwertvergleichs bei der Analyse der erhobenen Daten (verändert nach Hollert 2001).

Alternativhypothese annimmt, da sich die Zufallsvariablen signifikant unterscheiden. Dieses Signifikanzniveau wird auch als Irrtumswahrscheinlichkeit oder α -Fehler bezeichnet. In dieser Studie wurde ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ die Nullhypothese verworfen, d.h. der Unterschied zwischen den Zufallsvariablen war signifikant. Laut statistischer Konvention wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit mit $p \leq 0,05$ mit *, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit *** gekennzeichnet (Bärlocher 1999, Sachs 2004).

Parametrische Verfahren: Beim Parametertest interessieren konkrete Werte wie Standardabweichung oder Mittelwert. Ein parametrisches Prüfverfahren macht also Aussagen über Grundgesamtheitsparameter und geht davon aus, dass die beobachteten Stichprobendaten einer Grundgesamtheit entstammen, in der die Variablen bzw. Merkmale ein bestimmtes Skalenniveau und eine bestimmte Wahrscheinlichkeitsverteilung aufweisen (häufig Intervallskalenniveau und Normalverteilung). Die in dieser Studie eingesetzten Verfahren waren:

- a) **t-Test:** Mittels des t-Tests kann überprüft werden, ob sich zwei Variablen signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzung sind metrisch skalierte und normal verteilte Datensätze mit homogener Varianz. Wird ein signifikanter Unterschied festgestellt muss die Alternativhypothese angenommen werden. Durch folgende Formel wird der t-Wert berechnet und durch Abgleich des Ergebnisses mit der t-Verteilungstabelle nach Student und in Abhängigkeit von der Anzahl der Freiheitsgrade und der Irrtumswahrscheinlichkeit festgestellt, ob sich die Datensätze signifikant unterscheiden.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

\bar{X} = Mittelwert
 σ = Standardabweichung
 n = Anzahl der Messwert

- b) **Einfaktorielle ANOVA:** Die Varianzanalyse für drei oder mehr Proben (**AN**alysis **Of** **VA**riance) wurde von R.A. Fischer eingeführt. Dieses Verfahren untersucht, ob (und gegebenenfalls wie) sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Datensätzen unterscheiden. Mit den Prüfgrößen (Gesamtmittelwert, Restfehler, Faktoreffekt und Summe der quadrierten Abweichungen) des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht. Wenn sie sich signifikant unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten wirken. So lässt sich beispielsweise klären, ob das "Verhalten" einer Kontrollgruppe mit dem einer Experimentalgruppe identisch ist (Bühl & Zöfel 1995). Bei einem Unterschied wurde in einem nachfolgenden Post hoc-Test überprüft, welche Gruppen sich unterscheiden. Dabei können die Messgruppen entweder gegen eine Kontrolle (Dunnett-Test) oder paarweise miteinander (Student-Newman-Keuls-Test) verglichen werden.

Nicht-parametrische Verfahren: Diese Verfahren werden eingesetzt, wenn durch statistische Tests eine Normalverteilung und Varianzhomogenität nicht nachgewiesen werden können. Auch hier kann man entweder nur zwei oder mehrere Proben auf einen signifikanten Unterschied überprüfen.

- a) **U-Test:** Für zwei unabhängige Proben, die von nichtnormalen Verteilungen stammen, verwendet man häufig den U-Test nach Mann und Whitney (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Er beruht auf dem Vergleich von Rangsummen. Zur Berechnung des Prüfwertes U bringt man die n_1 und n_2 großen Stichproben in eine gemeinsam aufsteigende Rangfolge, wobei zu jeder Rangzahl vermerkt wird, aus welcher der beiden Stichproben sie stammen.

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

n = Anzahl der Messwerte

R = Summe der Ränge aus Probe 1 bzw. 2

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Der H-Test vergleicht statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten. Die letztlich benötigte Prüfgröße U ist die kleinere der beiden, die gegen einen kritischen Tabellenwert U_{krit} verglichen wird. Ist dabei $U_1 < U_2$, so trifft die Nullhypothese zu, und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben.

- b) **Kruskal-Wallis-Test:** Dieses auch als H-Test bezeichnete Verfahren entspricht einer einfaktoriellem ANOVA und erlaubt mehr als drei unabhängige Gruppen zu analysieren. Die Voraussetzung der Normalverteilung und Varianzhomogenität fällt weg; die untersuchten Proben sollten jedoch „ähnlich“ verteilt und mindestens ordinal skaliert sein. Der H-Test vergleicht statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten. Hierzu wird folgende mathematische Gleichung verwendet:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

k = Anzahl der zu vergleichenden Datensätze

N = Gesamtzahl aller Daten

n = Anzahl der Messwerte eines Datensatzes

R_i = Rangsumme im Datensatz i

Der errechnete H-Wert wird dann mit dem kritischen Wert H_{krit} verglichen, der von α , der Anzahl der Gruppen und Wiederholungen, abhängt. Bei einem signifikanten Unterschied der Gruppen wurde mit Post hoc-Verfahren überprüft, welche Gruppen sich signifikant unterschieden. Dabei wurden die Gruppen entweder gegen eine Kontrolle (Dunn's Test bei ungleicher Anzahl an Messwerten in den verschiedenen Gruppen, bzw. Dunnett's Test bei gleicher Anzahl) oder paarweise (Tukey-Test) miteinander verglichen.

2.6.2 Regression und Korrelation

Einfache lineare Regression: Bei linearen Regressionsanalysen wird der Zusammenhang zwischen zwei unabhängigen Variablen (X und Y) untersucht. In dieser Studie wurden diese Analysen mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat) durchgeführt und dabei die Funktion und das Bestimmtheitsmaß (r^2) – als Maß für die Übereinstimmung zwischen den beiden Variablen – sowie das 5 und 95 % Konfidenzintervall angegeben. Die lineare Funktion wird durch folgende Gleichung bestimmt:

$$Y = a + b \cdot X$$

Dabei entspricht a dem Y-Achsenabschnitt und b kennzeichnet die Steigung der Geraden. Zur Berechnung der beiden Kennwerte werden die folgenden Formeln verwendet:

$$b = \frac{\sum (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2}$$

X_i, Y_i sind die Werte des i-ten Paares

\bar{X}, \bar{Y} entsprechen dem jeweiligen Mittelwert

$$a = \bar{Y} - b \cdot \bar{X}$$

Korrelation: Bei Korrelationsberechnungen wird bestimmt, in welchem Maße Änderungen zwischen zwei Variablen (X und Y) miteinander verknüpft sind. Das Maß der Änderung wird als Koeffizient r angegeben. Durch Quadrierung erhält man das Bestimmtheitsmaß r^2 . Man unterscheidet zwischen zwei Verfahren zur Korrelationsanalyse:

- a) Der Korrelationskoeffizient r_p nach **Pearson** wird verwendet, wenn davon ausgegangen werden kann, dass beide Variablen intervallskaliert und normal verteilt sind. Wobei r_p nach der folgenden Formel berechnet wird:

$$r_p = \frac{\sum (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \cdot (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

- b) Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach **Spearman** r_s ist die Normalverteilung der beiden Variablen nicht Voraussetzung (Ordinalskalierung). Die Daten müssen in eine logische Rangfolge geordnet werden können und die Beziehung zu den beiden Variablen muss monoton zu- oder abnehmen, weshalb dieses Verfahren auch als Rangkorrelationsanalyse bezeichnet wird. Zur Berechnung wird folgende Formel verwendet:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N (X_i - Y_i)^2}{N^3 - N} \quad \begin{array}{l} N = \text{Anzahl der untersuchten Objekte} \\ r_s = \text{Korrelationskoeffizient} \end{array}$$

Vor allem bei dem Verfahren nach Pearson besteht die Gefahr, dass einzelne Wertepaare einen überdurchschnittlich hohen Einfluss auf den Korrelationskoeffizienten haben (Bärlocher 1999). Es empfiehlt sich deshalb, als erstes eine graphische Darstellung in Form einer Regressionsanalyse mit Konfidenzintervall zu erstellen. Die Ergebnisse der Analysen werden dann 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).

2.6.3 Chi-Quadrat-Test

Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) können Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit untersucht werden. In der Teststatistik wird die Summe der quadrierten Abweichungen zwischen Beobachtungs- und Erwartungswert, geteilt durch den Erwartungswert, verwendet (Bärlocher 1999). Für dieses statistische Verfahren dürfen nur Häufigkeiten und nie Proportionen oder Prozentsätze verwendet werden. Des Weiteren ist dieser Test nur für kategoriale und kontinuierliche Merkmale anwendbar.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Beobachtungswert} - \text{Erwartungswert})^2}{\text{Erwartungswert}}$$

2.6.4 Methoden zur Bewertung/Klassifizierung der Biotestergebnisse

2.6.4.1 Variabilität der Biotestverfahren

Die Variabilität der Biotestverfahren wurde testspezifisch analysiert, jedoch stets über die Schwankungsbreite der entsprechenden Negativ- und/oder Positivkontrolle ermittelt. Für den Cytotoxizitätstest wurden die Daten der Positiv- und Negativkontrollen als kumulative Normalverteilung dargestellt und durch die Verwendung des 95 % Konfidenzintervalls der Datenbereich ermittelt, in dem die Kontrolle mit $p < 0,05$ variiert. Die Variabilität im Comet-Assay wurde lediglich über das Tail-Moment der Negativkontrolle ermittelt. Dabei wurde der Varianzkoeffizient berechnet. Er ist eine allgemeine Kenngröße in der Stochastik und der Statistik und wird aus der Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert ermittelt (Bärlocher 1999). Dieses Verfahren wurde auch für den Datensatz aus dem Fischeitest verwendet, wobei hier die Ergebnisse der Positivkontrolle

herangezogen wurden. Im EROD-Assay wurde die Variabilität des Testsystems unter Verwendung der Positivkontrolle ermittelt. Hierfür wurde der Dosis-Wirkungsverlauf der Positivkontrolle (2,3,7,8-TCDD) dargestellt und damit der EC_{50} -Wert bestimmt. Durch die Verwendung des 95 % Konfidenzintervall entlang des Graphen konnte dann ein minimal und ein maximal möglicher EC_{50} ermittelt werden. Die aus diesen statistischen Verfahren ermittelte Schwankungsbreite der Biotestverfahren konnte dann in der Fuzzy-Logik verwendet werden, um den graduellen Zugehörigkeitsbereich für die entsprechenden Testverfahren zu ermitteln (vgl. Abs. 2.6.4.3).

2.6.4.2 Toxizitätsstufen der Biotestverfahren

Zur vergleichenden Bewertung der verschiedenen Biotestverfahren wurde bei allen Tests drei Toxizitätsstufen bestimmt (nt = nicht-toxisch; mt = moderat-toxisch; t = toxisch), die sich über den gesamten Effekt- bzw. testspezifischen Konzentrationsbereich erstreckten und auch als linguistische Variablen bezeichnet werden. So kann z.B. im Neutralrottest lediglich eine maximale Konzentration von 200 mg SEQ/ml Medium eingesetzt werden, da sonst das Lösungsmittel DMSO, indem die Extrakte rückgelöst wurden, einen toxischen Effekt aufweist. Dies bedeutet für den vorliegenden Datensatz, dass sich die Toxizitätsstufen in einem Bereich zwischen 1 und 200 mg/ml bewegen. Dies betrifft auch den Fischeitest sowohl mit Sedimentextrakten als auch nativen Sedimentproben (0 - 200 mg/ml; 0 - 600 mg/ml).

In Testverfahren bei denen spezifische Endpunkte ermittelt werden und eine akute Toxizität ausgeschlossen werden kann, erstreckt sich der Bereich der drei Toxizitätsstufen über alle zur Verfügung stehenden Daten. Im EROD-Assay wird als Endpunkt der Bio-TEQ ermittelt. Dieser Wert stellt die Konzentration dar, die einen entsprechenden Effekt im Biotestverfahren hervorrufen würde, wie die äquivalente Menge an TCDD. Die Auswahl an Testverfahren zur weiteren Bewertung wurde in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Datenmenge der entsprechenden Biotests (mind. 30) getroffen. Dadurch wurden folgende Biotestverfahren berücksichtigt: Comet-Assay, EROD-Assay, Fischeitest und Neutralrottest. Zur Festlegung der Toxizitätsstufen wurden folgende Verfahren vergleichend verwendet:

Boxplot: Der Boxplot stellt eine Möglichkeit dar, Daten eines Parameters graphisch aufzutragen, und gibt einen Überblick über die Verteilung der Werte innerhalb eines Datensatzes (Ahlf & Heise 2005). Wobei die Box 50 % der Daten darstellt und zwar zwischen dem 25 %- und 75 %-Konfidenzintervall. Dieses Intervall stellt den moderat-toxischen Bereich dar. Das obere bzw. untere 25 %-Konfidenzintervall entspricht dem nicht-toxischen respektive toxischen Bereich des Datensatzes.

Empirisches Verfahren: Diese Methode beruht auf dem gleichen Prinzip zur Bildung der Toxizitätsstufen wie das Boxplotverfahren. In beiden Methoden müssen die Daten zunächst nach ihrer Höhe geordnet und dann ihr relativer Rang ermittelt werden. Der Vorteil der empirischen Verteilung besteht jedoch darin, dass die Toxizitätsstufen unabhängig von der Box gewählt werden können. In diesem Ansatz wurden die Daten in 33,3 % Intervalle unterteilt.

Normalisierung: Bei diesem Verfahren werden Daten eines Parameters zunächst nach ihrer Höhe geordnet und in einen vergleichbaren Wertbereich überführt, üblicherweise zwischen 0 und 1. Wobei der niedrigste Wert "Null" und der höchste "Eins" gesetzt wird. Für alle Werte dazwischen wird entsprechend ihrer Höhe ein Wert zwischen 0 und 1 berechnet. Auch hier können die Toxizitätsstufen unabhängig bestimmt werden, weshalb auch hier 33,3 % Intervalle gewählt wurden, um die Toxizitätsstufen festzulegen (Gratzer & Ahlf 1999, Hollert et al. 2002b).

Normalverteilung: Die Normalverteilung ist ein wichtiger Typ kontinuierlicher Wahrscheinlichkeitsverteilungen (Sachs 2004). Sie unterstellt eine symmetrische Verteilung von Daten in Form einer Gauß-Glocke (vgl. Abs. 2.6.1). Durch die kumulative Normalverteilung wird die Fläche unterhalb der Gauß-Glocke als sigmoidale Funktion dargestellt. Diese Form der Darstellung erlaubt die Unterteilung eines Datensatzes zur Bildung der Toxizitätsstufen. Hier bieten sich zwei Möglichkeiten: (a) die Bildung von 33,3 % Intervallen, wie in den anderen beiden Verfahren zuvor, oder (b) die Verwendung statistischer Größen, in diesem Fall die Standardabweichung, die 68,3 % der Fläche unter der Gauß-Funktion um den Mittelwert darstellt. Dieser Datenbereich kann der Toxizitätsstufe moderat-toxisch zugeordnet werden. Die beiden Intervalle ober- und unterhalb der Standardabweichung stellen den nicht-toxischen bzw. toxischen Bereich dar (Abb. 2.11). An dieser Stelle muss bemerkt werden, dass die Daten in der Mehrzahl aller Fälle nicht normal verteilt waren, aber eine symmetrische Verteilung besaßen, die sich an eine Normalverteilung anpassen.

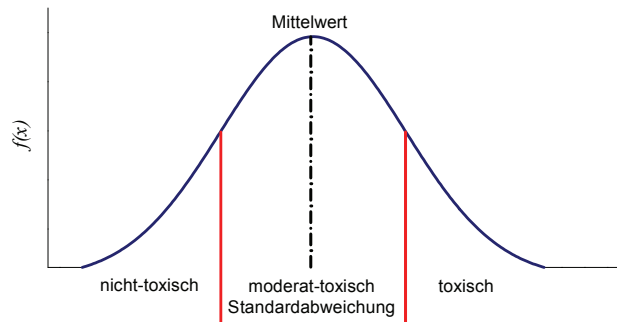


Abb. 2.11: Bestimmung der Toxizitätsstufen unter Verwendung der Normalverteilung.

2.6.4.3 Statistische Bewertungsmethoden

Fuzzy-Logik: Die Fuzzy-Logik führt weg von der gewöhnlichen Mengenlehre mit ihrer ja/nein bzw. 0/1-wertigen Mengenzugehörigkeit zu einem graduellen Zugehörigkeitsbegriff (Zimmermann 1995). Die Abbildung 2.12 zeigt als Beispiel einen fiktiven Datenbereich zwischen 5 und 45. Die Wertebereiche zwischen 5 und 15 sowie zwischen 25 und 35 besitzen eine vollständige Zugehörigkeit von 1 (entspricht einer Zugehörigkeit von 100 %). Die Wertebereiche zwischen 15 und 25 sowie 45 und 35 verfügen jeweils über eine ansteigende, graduelle Zugehörigkeit von 0 - 1.

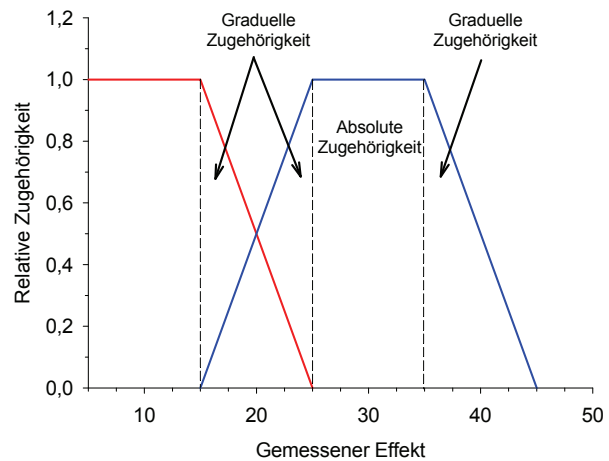


Abb. 2.12: Darstellung der unsharp Mengen (Graduelle Zugehörigkeit) der Fuzzy Logik.

Auf der Basis der verschiedenen Methoden zur Bildung der drei Toxizitätsstufen wurde mit Hilfe der Software DataEngine 4.0 (MIT GmbH, Aachen) eine allgemeine Klassifizierung für Sedimente formuliert. Die Bereiche der graduellen Zugehörigkeit wurden über die Variabilität der Kontrolle der jeweiligen Testsysteme bestimmt (vgl. Abs. 2.6.4.1) und entsprechend ihrer Ausprägung in das regelbasierte Fuzzy-Expertensystem überführt. Die Klassifikation, die zur Berechnung der unsharpen Zugehörigkeit zu den vorgeschlagenen fünf Güteklassen entwickelte wurde, muss mit Hilfe einer weiteren Fuzzy-Regelbasis in scharfe, eindeutige Güteklassen umgewandelt werden; man spricht von Defuzzifizierung (Heise et al. 2000). Die Fuzzy-Berechnungen wurden mit folgenden Inferenzoperatoren durchgeführt: Aggregationsoperator: Minimum, Implikationsoperator: algebraisches Produkt, Akkumulationsoperator: algebraische Summe (Hollert et al. 2002b, Zimmermann 1995).

Clusteranalyse: Um innerhalb der Resultate aus den unterschiedlichen ökotoxikologischen, chemischen und limnologischen Methoden Ähnlichkeiten zu erkennen, wurde eine Clusteranalyse mit dem Programm Statistica 6 (StatSoft, Tulsa, USA) durchgeführt. Als Datengrundlage wurden die in Prozent der maximalen Ausprägung transformierten Rohdaten eingesetzt. Als Distanzmaß wurde die euklidische Entfernung eingesetzt. Die Bildung der Cluster erfolgte nach der Complete Linkage Methode (Gratzer & Ahlf 1999, Heise et al. 2000, Pudenz et al. 2000).

Rangsummen-basiertes Verfahren: Ein Bewertungssystem mit Rangsummen zur Klassifizierung von Sedimenten wurde schon in verschiedenen Studien eingesetzt (Canfield et al. 1994, DelValls et al. 1998, Gratzer & Ahlf 1999, Hollert et al. 2002b). Hierbei können Hemmwerte aus entsprechenden Biotests (z.B. Hemmung der Dehydrogenaseaktivität bei Bakterien) direkt in Toxizitätsklassen überführt und die entsprechenden Klassenpunkte für alle durchgeführten Biotests summiert werden. Aus dem resultierenden Punktesystem können Ränge ermittelt werden. Bei Daten aus Biotestverfahren mit spezifischen Endpunkten, chemischen Analysen und *In situ*-Verfahren, müssen diese erst in ein einheitliches System transformiert werden. Für die vergleichende Bewertung werden hierfür die Befunde aller Parameter in eine Skala mit 0 % für den niedrigsten Wert und 100 % für den höchsten überführt und die so erhaltenen Prozentwerte einem fünfstufigen Güteklassifikationssystem zugeordnet (Hollert et al. 2002b). Da nicht für alle Probenstandorte die gleiche Testbatterie eingesetzt werden konnte, wurden die einzelnen Werte der Güteklassen nicht im Sinne von Rangsummen addiert sondern deren Mediane berechnet, um alle gemessenen Daten zu einem Wert aggregieren zu können.



3. Weight-of-Evidence-Studie in der Donau

3.1 Die Probenstandorte und ihre hydromorphologische Charakterisierung

Die morphologischen und hydrologischen Merkmale der Donau und ihrer beiden Zuflüsse an den einzelnen Standorten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. An den Standorten Rottenacker und Schwarzach konnte eine gelbliche Verfärbung des Wassers beobachtet werden. In Rottenacker wurde zudem bei allen Beprobungen eine Schaumbildung im Uferbereich festgestellt, was auf eine organische Verunreinigung hindeuten könnte. In dem Zufluss Schwarzach machte sich bei Aufwirbelung der mächtigen Schlammschicht ein starker H_2S -Geruch bemerkbar. Die anderen Standorte waren hinsichtlich dieser Merkmale unauffällig. In Sigmaringen und Riedlingen konnten ausgedehnte Vorkommen des Flutenden Hahnenfußes (*Ranunculus fluitans*) beobachtet werden, die zum Teil als großflächige Teppiche den Gewässergrund bedeckten. Diese Wasserpflanze bietet in den oft naturfern ausgebauten und kanalisierten Streckenabschnitten der Donau wichtige Unterstands- und Versteckmöglichkeiten für die Fischbestände (Wurm 2001). In der näheren Umgebung der meisten Standorte überwiegt in der Landwirtschaft die Grünlandnutzung, seltener sind ackerbaulich genutzte Flächen sowie Schrebergärten (Lauchert, Schwarzach) zu finden. An der Probennahmestelle Sigmaringen war das rechte Ufer durch dichte Bewaldung geprägt. Die Probenstandorte Schwarzach (in Riedlingen) und Rottenacker lagen am Ortsrand, die übrigen außerhalb von Ortschaften, in der Regel unterhalb von Kläranlagenausflüssen (Sigmaringen, Riedlingen, Ehingen; Abb. 3.1 und 3.2).



Abb. 3.1: Probennahmestellen an der Donau: **a)** Sigmaringen etwa 200 m unterhalb der Kläranlage, **b)** der Zufluss Lauchert oberhalb von Sigmaringen-Dorf, **c)** die Schwarzach in Riedlingen und **d)** der Standort Riedlingen in der Nähe von Daugendorf.



Abb. 3.2: Probennahmestellen an der Donau im Flussverlauf: **a)** Wehr in Rottenacker, **b)** Ehingen Nasgenstadt unterhalb der Zellstofffabrik, **c)** Öpfinger Stausee beim Ablassen 2003 (Foto von Dr. K. Wurm), **d)** Ingolstadt in Bayern (www.satgeo.zum.de), **e)** Bad Abbach (www.bayern.de/lfw) und **f)** Kraftwerk bei Jochenstein (www.bayern.de/lfw).

Tab. 3.1: Hydromorphologische Parameter und allgemeine Charakterisierung der Donau-Standorte in Baden-Württemberg sowie der Zuflüsse Lauchert und Schwarzach (im Flussverlauf). Aufnahme der Daten bei der Mai-Beprobung. Datengrundlage: Grund (2005) und Seitz (2005).

Standort	Sigmaringen	Lauchert	Schwarzach	Riedlingen	Rottenacker	Ehingen
Durchschnittliche Tiefe [m]	0,5	0,4	0,6	0,6	1,5	0,7
Maximale Tiefe [m]	1,5	0,8	1,2	1,5	2	1,5
Durchschnittliche Breite [m]	15	3	5	20	30	40
Maximale Breite [m]	20	4	6	25	60	50
Eintiefung [m]	0,1 - 0,4	0,4	0,3 - 0,4	0,2 - 0,8	0,2 - 0,4	0,2 - 0,4
Gewässergrund	kiesig (fein - grob) mit Kalkblöcken und Schotter	sandig bis kiesig	sandig-kiesig, teilweise schlackig, mit anoxischer Schicht	grober Kies und Steine	kiesig-steinig	Sand, grober Kies und Steine
Uferbefestigung	unbefestigt	unbefestigt	unbefestigt	größtenteils mit Blocksteinen befestigt	meist unbefestigt, teilweise betoniert	linkes Ufer künstlich befestigt, rechtes Ufer mit aufgeschüttetem Kiesdamm
Gewässerverlauf	mäandrierend Rohrglanzgras, Pestwurzflur, Brennnesseln, Laubmischwald am rechten Ufer, Flutender Hahnenfuß im Wasser	mäandrierend Gräser, Brennnesseln, Brombeere, Aue mit Schilf (linkes Ufer, Sedimentproben)	schwach mäandrierend Gräser, Brennnesseln, Weiden, Gebüsch	begradigt Rohrglanzgras, Ehrenpreis, Hahnenfuß, Klee, Röhrichtsaum mit Buschweiden und Schwarzpappeln; Flutender Hahnenfuß	mäandrierend Rohrglanzgras, Holunder, Brennnesseln, Brombeere, Gräser, Springkraut, gesäumt von Esche und Silberweide	schwach mäandrierend Rohrglanzgras, Brennnesseln, Raps; Flutender Hahnenfuß
Fließgeschwindigkeit bei normalen Abfluss	0,8	0,3 - 1	< 0,3	0,6 - 0,7	0,4 - 0,5	0,6 - 0,8
Sichttiefe [m]	bis zum Grund	bis zum Grund	bis zum Grund	bis zum Grund	bis zum Grund	bis zum Grund
Geruch	unauffällig	unauffällig	beim Aufwirbeln des Schlammes starker Geruch nach H ₂ S	unauffällig	unauffällig	unauffällig
Färbung	transparent bis leicht gelblich, teilweise leichte Schaumbildung	farblos	transparent bis leicht gelblich	farblos	transparent bis leicht gelblich, Schaumbildung	farblos

3.2 Chemische Analyse von prioritären Schadstoffen

Zusammenfassung: Im Rahmen dieser Weight-of-Evidence-Studie wurden sowohl physikalische und limnochemische Wasserparameter als auch verschiedene organische Schadstoffe (PAHs, PCBs und PCDD/Fs) und Schwermetalle in Sedimentproben aus der Donau qualitativ und quantitativ erfasst.

Durch die Messung von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit sowie die Aufnahme von Nitrit, Nitrat, Ammonium, Phosphat, AOX und des BSB₅ konnte die Donau weitestgehend der Gewässergüte II bzw. der Zustandsklasse 2 zugeordnet werden, was einer mäßigen Belastung oder einem guten Zustand entspricht. Nur vereinzelt wurde an den Donaustandorten Rottenacker und Ehingen sowie am Zufluss Schwarzach eine leicht erhöhte Belastung mit den Pflanzennährstoffen Nitrat, Ammonium und Phosphat gemessen.

Auch der Gehalt der analysierten Schwermetalle Chrom, Kupfer, Cadmium, Blei, Nickel und Zink ging im Vergleich mit Messungen aus den Jahren 1992 und 2002 deutlich zurück, so dass die Donau auch hier der Güteklasse I oder I-II nach LAWA zugeordnet werden konnte. Lediglich die Sedimentprobe Rottenacker wies einen erhöhten Zinkgehalt auf, wodurch dieser Standort als kritisch belastet betrachtet werden muss.

In fast allen Sedimenten der Donau konnten verschiedene PAHs (US-EPA) nachgewiesen werden. Nur in Riedlingen lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Überraschend hohe PAH-Konzentrationen wurden in der Sedimentprobe aus dem Zufluss Schwarzach gemessen (Σ 16 PAHs = 26,3 mg/kg), wodurch dieser Standort unter Berücksichtigung des ATV-Klassifizierungssystems der Güteklasse V zugeordnet werden muss. Auch im Öpfinger Stausee wurde ein hoher PAH-Gehalt in den Sedimenten nachgewiesen (5,3 mg/kg entspricht der Güteklasse III). Alle übrigen Standorte an der Donau erreichten die ATV-Güteklassen I oder II.

Hochpersistente chemische Substanzen (PCBs und PCDD/Fs) wurden nur in geringen Mengen in den verschiedenen Sedimentproben der oberen Donau nachgewiesen. Zur Quantifizierung aller analysierten Verbindungen wurden die TCDD-Äquivalente (TEQ) berechnet und aufsummiert. Dabei konnten Chem-TEQ-Werte zwischen 16 und 48 ng/kg ermittelt werden. Die höchste Belastung mit Dioxinen, Furanen und PCBs wurde für die Standorte Schwarzach und Öpfingen gemessen.

3.2.1 Physikalische und limnochemische Parameter

Die im Mai, Juli und September 2005 vor Ort bzw. im Labor gemessenen physikalischen und limnochemischen Parameter sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Diese Parameter wurden für die Donau gemäß der Güteklassifikation und den Zielvorgaben der LAWA (Tab. 3.3; LAWA 1998) bewertet.

Tab. 3.2: Physikalische und limnochemische Wasserparameter der oberen Donau sowie zwei ihrer Zuflüsse (Schwarzach und Lauchert), einschließlich den entsprechenden ökologischen Zustandsklassen nach Graw & Borchardt (1999) und den Gewässergüteklassen nach LAWA (1998). Datengrundlage: Grund (2005) und Seitz (2005).

Standort Probenmonat	Sigmaringen			Lauchert			Schwarzach			Riedlingen			Rottenacker			Ehingen		
	Mai	Juli	Sep.	Mai	Juli	Sep.	Mai	Juli	Sep.	Mai	Juli	Sep.	Mai	Juli	Sep.	Mai	Juli	Sep.
Wassertemperatur [°C]	11,4	14,0	13,0	11,3	13,9	12,8	12,9	15,1	13,0	13,4	15,6	13,0	12,9	15,1	13,0	13,4	15,6	13,0
pH-Wert	8,1	7,9	7,8	8,2	7,9	7,9	7,9	8,1	8,0	8,0	8,2	8,3	7,9	8,1	8,0	8,0	8,2	8,3
Leitfähigkeit [µS/cm]	504	490	542	560	581	595	555	562	597	568	584	615	555	562	597	568	584	615
Sauerstoffgehalt [mg/L]	12,6	15,5	13,9	10,0	13,6	15,5	10,4	12,2	15,5	11,7	12,4	9,4	10,4	12,2	15,5	11,7	12,4	9,4
Sauerstoffsättigung [%]	128	137	135	99,4	126	135	102,8	120	137	117	121	104	102,8	120	137	117	121	104
BSB ₅ [mg O ₂ /L]	1,1	(8,1)	-	1,7	1,4	-	1,1	1,3	-	1,4	1,1	-	1,1	1,3	-	1,4	1,1	-
Nitrat [mg/L]	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	10	25	<10	<10	15	<10	<10	10	<10	<10	15
NO ₃ -N [mg/L]	(II)*	(II)*	(II)*	(II)*	(II)*	(II)*	II	(II)*	III	(II)*	(II)*	II-III	(II)*	(II)*	II	(II)*	(II)*	II-III
Nitrit [mg/L]	<2,3	(2)*	<2,3	<2,3	(2)*	(2)*	2,3	2,3	5,7	<2,3	(2)*	3,4	<2,3	2,3	2,3	<2,3	(2)*	3,4
NO ₂ -N [mg/L]	0,05	0,1	0,2	0,05	0,15	0,15	0,2	0,2	0,25	0,05	0,1	0,15	0,05	0,1	0,1	0,05	0,1	0,15
Ammonium [mg/L]	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II	I-II
NH ₄ ⁺ -N [mg/L]	0,015	0,030	0,061	0,015	0,046	0,046	0,061	0,061	0,076	0,015	0,030	0,046	0,015	0,030	0,030	0,015	0,030	0,046
Gesamtphosphat [mg/L]	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
P ₂ O ₅ -P [mg/L]	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*	(II-III)*
AOX [µg/L]	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*
	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	1	1	2	<1	<1	<1	1	1	2
	(II)*	(II)*	(II)*	(II)*	II	II	(II)*	(II)*	(II)*	II	II	II-III	(II)*	(II)*	(II)*	II	II	II-III
	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	0,13	0,13	<0,13	<0,13	<0,13	0,13	0,13	0,27	<0,13	<0,13	<0,13	0,13	0,13	0,27
	(2)*	(2)*	(2)*	(2)*	2	2	(2)*	(2)*	(2)*	2	2	3	(2)*	(2)*	(2)*	2	2	3
	-	12,3	8,3	-	6,8	6,4	-	17,5	15,3	-	7,5	7,9	-	8,3	7,2	-	7,5	7,9
	-	I-II	I-II	-	I-II	I-II	-	II	II	-	I-II	I-II	-	I-II	I-II	-	I-II	I-II

*Mit den verwendeten Methoden konnten keine genaueren Messergebnisse erzielt werden, also kann auch von einer besseren Klasse ausgegangen werden als die hier angegebene.

Tab. 3.3: Güteklassifikation der Nährstoffe, Salze und Summenkenngößen nach LAWA (1998).

	Einheit	Stoffbezogene chemische Gewässergüteklasse						
		I	I-II	II	II-III	III	III-IV	IV
Sauerstoffgehalt	mg/L	> 8	> 8	> 6	> 5	> 4	> 2	≤ 2
Ammonium	mg/L	≤ 0,04	≤ 0,1	≤ 0,3	≤ 0,6	≤ 1,2	≤ 2,4	> 2,4
Nitrit	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,4	≤ 0,8	> 0,8
Nitrat	mg/L	≤ 1	≤ 1,5	≤ 2,5	≤ 5	≤ 10	≤ 20	> 20
Gesamtphosphat	mg/L	≤ 0,05	≤ 0,08	≤ 0,15	≤ 0,3	≤ 0,6	≤ 1,2	> 1,2
AOX	µg/L	0	≤ 10	≤ 25	≤ 50	≤ 100	≤ 200	> 200

Konnte für einzelne Parameter keine Klassifizierung nach LAWA vorgenommen werden, so erfolgte eine Einordnung in die ökologischen Zustandsklassen nach dem Hessischen Ministerium für Umwelt, ländlichen Raum und Verbraucherschutz (Graw & Borchardt 1999; Tab. 3.4 und 3.5), welche sich sowohl an den Kriterien der LAWA (1998) als auch an den Vorgaben der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie orientiert (EU-WRRL 2000).

Tab. 3.4: Einstufung des ökologischen Zustands nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL 2000, Graw & Borchardt 1999).

Klasse	Ökologischer Zustand	Beschreibung
1	sehr gut	Lebensgemeinschaften, Wasserqualität sowie Wasserhaushalt und Struktur (= Hydro-morphologie) des Gewässers weisen keine oder nur geringfügige Abweichungen von einem Zustand auf, der ohne störende menschliche Einflüsse zu erwarten wäre.
2	gut	Die Lebensgemeinschaften weisen auf geringe, vom Menschen verursachte Störungen hin, weichen aber nur geringfügig vom sehr guten Zustand ab (Qualitätsziel).
3	mäßig	Die Lebensgemeinschaften weisen auf signifikant stärkere Störungen hin und weichen mäßig vom sehr guten Zustand ab.
4	unbefriedigend	Die Lebensgemeinschaften weichen erheblich vom Zustand ohne menschliche Störungen ab.
5	schlecht	Große Teile der Lebensgemeinschaften, die bei sehr gutem Zustand vorhanden wären, fehlen.

Wassertemperatur: Bei allen drei Beprobungen konnte ein leichter Anstieg der Wassertemperatur im Flussverlauf beobachtet werden. Am Zufluss Lauchert war sie zu jedem Zeitpunkt geringer als in der Donau und der Schwarzach. Im Mai wurden die niedrigsten Wassertemperaturen gemessen, im Juli die höchsten. Während des gesamten Untersuchungszeitraums lag die Temperatur unter 18 °C und entsprach damit der Zustandsklasse 1 (sehr gut).

pH-Wert: Die Donau ist aufgrund des hohen Kalkgesteinanteils (überwiegend aus Weißjura-Kalken (> 90 %) der Schwäbischen Alb und aus dem Alpenraum) im Einzugsgebiet sehr gut gegen stärkere pH-Wert-Schwankungen gepuffert (Borchert 1983). Daher konnte an allen Standorten und bei allen Messungen ein relativ konstanter pH-Wert zwischen 7,7 und 8,3 gemessen werden. Dies entspricht dem Grenzbereich zwischen den Zustandsklassen 1 (sehr gut) und 2 (gut). Der niedrigste Durchschnittswert wurde in der Schwarzach gemessen (7,8).

Leitfähigkeit: Die gemessenen Werte der Leitfähigkeit aller Standorte lagen in einem Bereich von 490 bis 680 µS/cm. In der Schwarzach wurde zu allen Zeitpunkten die höchste Leitfähigkeit ermittelt (660 - 680 µS/cm). In Sigmaringen und in der Lauchert wurden hingegen die niedrigsten Werte gemessen. Im Jahresverlauf war bei nahezu allen Standorten ein Anstieg der Messwerte zu

verzeichnen. Dieser Anstieg des Salzgehaltes könnte sowohl auf die Einleitungen der Kläranlagen im Donau-Einzugsgebiet als auch auf den Zufluss von elektrolytreichen (v.a. hydrogencarbonathaltigen) Wassermassen von der Schwäbischen Alb (Borchert 1983) zurückzuführen sein.

Tab. 3.5: Bewertungsstufen nach Graw & Borchardt (1999), die sich an der EU-WRRL (2000) orientieren.

Parameter	Einheit	Ökologische Zustandsklasse				
		1	2	3	4	5
Wassertemperatur	°C	< 18	18 - 20	20 - 22	22 - 24	> 24
pH-Wert		6,5 - 8	6 - 6,4	5,5 - 6,9	5 - 5,4	< 5
			8,1 - 8,5	8,6 - 9	9,1 - 9,5	> 9,5
Leitfähigkeit	µS/cm	< 300	301 - 500	501 - 700	701 - 900	> 900
O ₂ -Sättigung	%	91 - 110	81 - 90	71 - 80	60 - 70	< 60
			111 - 120	121 - 130	131 - 140	> 140
BSB ₅	mg O ₂ /L	< 1	1 - 3	3,1 - 5	5,1 - 10	> 10
Ammonium	mg/L	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,6	≤ 1,2	> 2,4
Nitrit	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,4	> 0,8
Nitrat	mg/L	≤ 1	≤ 2,5	≤ 5	≤ 10	> 20
Phosphat	mg/L	≤ 0,05	≤ 0,15	≤ 0,3	≤ 0,6	> 1,2

BSB₅ = Biochemischer Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen

Sauerstoffgehalt und Sauerstoffsättigung: An allen Standorten wurden im gesamten Untersuchungszeitraum gute bis sehr gute Sauerstoffgehalte mit mehr als 8 mg/L (9 bis 14 mg/L) gemessen. Sie sind somit der Gewässergüteklasse I zuzuordnen. Die Sauerstoffsättigung betrug meist über 100 % (max. 137 %). Im jahreszeitlichen Verlauf wurde ein deutlicher Anstieg der Sättigung beobachtet, was auf eine sekundäre Eutrophierung der Gewässer durch Pflanzenwachstum schließen lässt. Während die meisten Standorte im Mai nach ihrer Sauerstoffsättigung noch in die Zustandsklassen 1 oder 2 eingeordnet werden konnten (maximal 3), erfolgte im Juli und September meist die Einordnung in Zustandsklasse 3 oder 4 (unbefriedigend).

BSB₅: An allen Standorten betrug der BSB₅ (biochemischer Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen) zwischen 1 und 2 mg O₂/L und entsprach somit der Zustandsklasse 2 (gut). In der Juli-Probe des Standortes Sigmaringen befand sich eine fädige Alge, die die Messung des BSB₅ deutlich störte, weshalb dieser Test hier nicht weiter berücksichtigt wurde. Die Messung des BSB₅ im September musste aus technischen Gründen abgebrochen werden.

Ammoniumgehalt: Der Ammoniumgehalt der untersuchten Wasserproben wies über den gesamten Beprobungszeitraum eine Konzentration von unter 0,5 mg/L und der NH₄⁺-N damit unter 0,39 mg/L. Lediglich für die im Juli in Rottenacker entnommene Probe wurde eine Konzentration von 0,5 mg/L NH₄⁺ gemessen. Da mit der verwendeten Methode keine Werte unterhalb einer Konzentration von 0,5 mg/L NH₄⁺ (= 0,39 mg/L NH₄⁺-N) ermittelt werden konnten, war keine Zuordnung gemäß der Gewässergüteklassifikation nach LAWA (1998) möglich. Da aber alle gemessenen Werte unter 0,6 mg/L NH₄⁺-N lagen, sind die Wasserproben im schlechtesten Fall der chemischen Gewässergüteklasse II - III (deutliche Belastung) zuzuordnen.

Nitrit: Die gemessenen Nitrit-Konzentrationen der Wasserproben der einzelnen Standorte sind in Tab. 3.5 vergleichend dargestellt. Die Nitritkonzentrationen der untersuchten Wasserproben lagen im Bereich von 0,02 - 0,08 mg/L NO₂⁻-N und erfüllten somit die Zielvorgabe der LAWA zum Erreichen der Güteklasse II. An vier der sechs Standorte wurde sogar ein Nitrit-Gehalt gemessen, der auf eine

sehr geringe Nitrit-Belastung (Güteklasse I-II) hinwies. Lediglich die Wasserproben der Schwarzach zeigten leicht erhöhte Nitrit-Konzentrationen, die jedoch mit der Güteklasse II vereinbar sind.

Nitrat: Mit der angewandten Methodik konnten keine genaueren Werte unterhalb einer Konzentration von 10 mg/L NO_3^- (= 2,3 mg/L NO_3^- -N) ermittelt werden, weshalb in einigen Fällen keine eindeutige Zuordnung gemäß der Gewässergüteklassifikation nach LAWA (Tab.3.1) möglich war. Ein Nitratgehalt der unterhalb einer Konzentration von 10 mg NO_3^- /L liegt kann im schlechtesten Fall der Güteklasse II (mäßig belastet) zugeordnet werden.

Phosphat: Da der Gesamtphosphorgehalt sowohl den gelösten (PO_4^{3-}) als auch den partikulären Phosphor eines Gewässers, d. h. die Summe aller Phosphorverbindungen im Wasser umfasst, können Schwankungen u.a. auch durch unterschiedliche Schwebstoff-Gehalte in den Wasserproben bedingt sein. Mit der angewandten Methodik konnten keine genaueren Werte unterhalb einer Konzentration von 1 mg/L P_2O_5 (= 0,3 mg/L PO_4^{3-} -P) ermittelt werden. Daher war in den meisten Fällen keine eindeutige Zuordnung gemäß der Gewässergüteklassifikation nach LAWA (Tab. 3.1) möglich. Gesamtphosphat-Gehalte, die unter einer Konzentration von 1 mg/L P_2O_5 lagen, können im schlechtesten Fall der Güteklasse II - III (deutlich belastet) zugeordnet werden.

AOX: Als Maß für die Summe von adsorbierbaren organisch gebundenen Halogenen im Gewässer wurde der AOX-Wert der an den einzelnen Probenstandorten im Juli und September entnommenen Wasserproben bestimmt. Die höchste Belastung wies die Schwarzach mit AOX-Werten von 17,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ im Juli und 15,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ im September auf. Bei allen Standorten außer Ehingen konnte eine Abnahme der AOX-Werte im Jahresverlauf beobachtet werden. Die ermittelten AOX-Werte lagen zwischen 6,4 und 17,5 $\mu\text{g}/\text{L}$. Somit sind sämtliche Wasserproben der einzelnen Untersuchungsstandorte den Güteklassen I-II und II zuzuordnen.

Die Gewässergüte der oberen Donau sowie der Zuflüsse Lauchert und Schwarzach entsprach in den meisten Parametern Güteklasse II (mäßig belastet) bzw. Zustandsklasse 2 (guter Zustand). Entscheidend ist jedoch bei der Gesamtbewertung der Gewässergüte, dass nicht der Mittelwert aus den Güteklassen sämtlicher Parameter gebildet wird, sondern ausschlaggebend sind die Parameter, die schlechter als Bewertungsstufe 2 bzw. II eingestuft werden, also auf bestimmte Belastungen hinweisen. So wurden in den Donau-Standorten Rottenacker und Ehingen sowie am Zufluss Schwarzach vereinzelt etwas höhere Belastungen mit den Pflanzennährstoffen Ammonium, Nitrat und Phosphat gemessen. Diese Messwerte waren vermutlich gleichzeitig Folge und Ursprung einer erhöhten Eutrophierung des Gewässers an diesen Standorten.

Das Erreichen der Gewässergüteklasse II nach LAWA bzw. die ökologische Zustandsklasse 2 nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie ist das Qualitätsziel für die deutschen bzw. europäischen Fließgewässer (EU-WRRL 2000, LAWA 1998). Die Zustandsklasse 2 beschreibt folgenden ökologischen Zustand eines Gewässer(abschnitt)s: Die Lebensgemeinschaften weisen auf geringe vom Menschen verursachte Störungen hin, weichen aber nur geringfügig vom sehr guten Zustand ab (Graw & Borchardt 1999). Nach LAWA (1998) entspricht die Güteklasse II einer mäßigen Belastung. Es liegen mäßige Verunreinigungen und eine gute Sauerstoffversorgung vor. Die entsprechenden Fließgewässer weisen eine sehr große Artenvielfalt und Individuendichte von Algen, Schnecken, Kleinkrebsen und Insektenlarven auf. Wasserpflanzenbestände können größere Flächen bedecken. Es handelt sich um artenreiche Fischgewässer.

In Deutschland werden regelmäßig chemische und physikalische Parameter zur Gewässeruntersuchung aufgenommen, um den Zustand der Gewässer zu kontrollieren. Dies ist wichtig, um Belastungen möglichst frühzeitig zu erkennen und Schutzmaßnahmen ergreifen zu können. Die

Ergebnisse der Messprogramme werden in den Gewässergüteberichten der Länder zusammengefasst (LAWA 1998, LfU 2004). Die Bestimmung zahlreicher standardisierter Klassifikationsparameter ist aufgrund geeigneter Messtechniken einfach und schnell durchzuführen. Da viele der Parameter seit langer Zeit und in großem Umfang erhoben werden, eignen sie sich gut für eine vergleichende Bewertung verschiedener Gewässer. Auch in der vorliegenden Studie diente die Untersuchung verschiedener limnochemisch-physikalischer Messwerte einer ersten Einschätzung der Gewässergüte. Jedoch handelt es sich bei der Messung solcher Parameter immer nur um Momentaufnahmen der Wasserqualität, nicht aber um integrierende Aussagen über die Zeit, wie sie etwa bei der biologisch-ökologischen Untersuchung des Makrozoobenthos erfasst werden (Böhmer et al. 2004, Gunkel 1994). Plötzliche Änderungen aufgrund von natürlichen oder anthropogenen Einflüssen (Hochwasser, Starkregen, Mischwassereinleitungen, Regenüberläufe, Störungen im Klärbetrieb, Umweltkatastrophen) können dazu führen, dass Extremwerte nicht erfasst oder überbewertet werden. Außerdem sind die standardisierten Bewertungskriterien und Methoden nach LAWA nicht auf alle Gewässer gleichermaßen anwendbar, da es sich nicht bei jeder Störgröße um einen anthropogenen Einfluss handelt, sondern immer auch die natürlichen Gegebenheiten beachtet werden müssen (z.B. saurer pH in Moorgewässern, hohe Leitfähigkeit in Kalkbächen, natürlicher Biomasseabbau in Flachlandgewässern durch Falllaub etc.; Braukmann 1987, Schönborn 1992, Schwörbel 1993). Auch können durch die Feststellung der Gewässergüteklassen und Zustandsklassen komplexere Phänomene, wie etwa das Fischsterben an der oberen Donau und anderen Flüssen (Burkhardt-Holm et al. 2005, Cook et al. 2003, de Lafontaine et al. 2002, Faller et al. 2003, Keiter et al. 2006), nicht erklärt werden. Deshalb sollten neben der chemischen Gewässergüte auch biologische und ökotoxikologische Untersuchungen vorgenommen werden, um eine integrierende Aussage des gesamten Belastungspotentials eines Gewässers treffen zu können (Chapman 2000, Chapman & Hollert 2006, Hollert et al. 2002b). Außerdem darf nicht nur die Wasserqualität untersucht werden, sondern es muss auch die Rolle der Sedimente als Senke, aber auch als historische Quelle für Schadstoffe im aquatischen Ökosystem berücksichtigt werden (Burton 1995, Chapman et al. 1992, Hill et al. 1993, Hollert et al. 2007). Denn die meisten toxischen organischen Verbindungen und Schwermetalle sind wenig im Wasser gelöst sondern werden partikulär gebunden und sedimentieren (Brack et al. 1999, Bro-Rasmussen 1996, Legler et al. 2002, Rieß et al. 1997).

3.2.2 Belastung mit organischen Schadstoffen

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH): Die 16 US-EPA PAHs konnten in fast allen Sedimentproben ermittelt werden (Tab. 3.6). Nur in Riedlingen lagen alle gemessenen Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Am Standort Rottenacker konnte aufgrund der geringen Probenmenge keine PAH-Analyse durchgeführt werden. Da jedoch der TOC-Wert der Sedimente aus Rottenacker, wie auch an den Standorten Öpfingen und Schwarzach, sehr hoch war (9,9 %) und diese Probe in den verschiedenen Biotests mit die stärksten Effekte gezeigt hatte, kann man eine PAH-Kontamination dieser Probe nicht ausschließen. Die Schwarzach wies mit einer Summenkonzentration der 16 EPA-PAHs von 26,3 mg/kg Sediment mit Abstand den höchsten Messwert auf. Demnach muss unter Berücksichtigung des ATV-Klassifizierungssystems (Regelwerk der Abwassertechnischen Vereinigung e.V.; ATV 1997 zitiert aus Ahlf et al. 2002) die Schwarzach der Güteklasse V und der Öpfinger Stausee mit einer PAH-Summenkonzentration von 5,3 mg/kg der Güteklasse III zugeordnet werden. Alle übrigen Standorte an der Donau erreichen die Güteklassen I oder II. Insbesondere die Schwarzach ist ein vergleichsweise kleiner Zufluss der Donau mit geringer Breite und Fließgeschwindigkeit. Dies

begünstigt die Sedimentation von Schadstoffen, wodurch vor allem persistente Verbindungen lange Zeit für Organismen verfügbar sind. Die Ursachen für die z.T. beträchtlichen PAH-Konzentrationen sind bisher nicht identifiziert worden, sollten aber aufgrund des kleinen Einzugsgebietes verhältnismäßig einfach ausfindig gemacht werden können. Als Verschmutzungsursache hierfür kämen in Frage: ein metallverarbeitender Betrieb sowie eine Tankstelle, die direkt neben der Schwarzach liegt. PAHs werden jedoch auch von sehr unterschiedlichen diffusen Quellen, wie z.B. über Luftstäube oder als Straßenabrieb, in die Gewässer eingetragen.

Tab. 3.6: Übersicht über die Konzentrationen von 16 gemessenen US-EPA-PAHs in den Sedimenten der Donau und zwei ihrer Zuflüsse (mit * gekennzeichnet) in µg/kg (Keiter et al. 2007a).

	Sigmaringen	Lauchert*	Schwarzach*	Riedlingen	Ehingen	Öpfingen	Ingolstadt	Bad Abbach	Jochenstein
Naphthalen	<NWG	<NWG	87	<NWG	<NWG	22	<NWG	<NWG	<NWG
Acenaphthylen	43	23	98	<NWG	27	88	n.b.	n.b.	n.b.
Acenaphthen	<NWG	<NWG	530	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG
Fluoren	<NWG	<NWG	640	<NWG	<NWG	37	<NWG	<NWG	<NWG
Phenathren	150	48	4600	<NWG	190	380	110	110	<NWG
Anthracen	70	31	1000	<NWG	72	190	25	20	13
Fluoranthen	380	140	4800	<NWG	400	950	250	170	50
Pyren	270	100	3400	<NWG	300	710	160	110	<NWG
Benzo[a]anthracen	180	64	2200	<NWG	180	430	98	68	<NWG
Chrysen	180	67	1900	<NWG	180	440	140	120	26
Benzo[b,j]fluoranthen	150	77	1600	<NWG	150	550	170	120	33
Benzo[k]fluoranthen	97	40	900	<NWG	92	240	64	39	11
Benzo[a]pyren	190	73	1700	<NWG	190	490	150	80	34
Dibenzo[a,h]anthracen	160	73	490	<NWG	150	390	21	35	<NWG
Benzo[ghi]perylen	43	<NWG	970	<NWG	37	99	110	100	35
Indeno[1,2,3-cd]pyren	120	53	1400	<NWG	110	280	110	47	21
Σ 16 EPA-PAHs	2033	789	26315	-	2078	5296	1408	1019	247
Güteklasse **	II	I	V	I	II	III	II	II	I

** Güteklassen der Sedimente nach dem ATV-Klassifikationssystem für PAH-Konzentrationen (ARGE-Elbe, Ahlf et al. 2002). Das Qualitätsziel für Sedimente aus dem Hamburger Hafen ist die Güteklasse II. NWG = Nachweisgrenze < 0,02 mg/kg; n.b. = nicht bestimmbar

Polychlorierte Biphenyle: In dieser Studie wurde der Gehalt von drei verschiedenen PCBs im Sediment bestimmt, wobei in allen Proben stets PCB 77 die höchste Konzentration aufwies, gefolgt von PCB 126 und PCB 169 (Tab. 3.7). Für die Summe aller drei PCBs wurden die größten Mengen in den Proben aus der Schwarzach, Rottenacker und Ehingen gemessen. Insgesamt sind jedoch die PCB-Konzentrationen vergleichsweise gering, weshalb alle Proben nach dem ATV-Klassifikationssystem der Güteklasse I zugeordnet werden können.

Dioxine und Furane (PCDD/Fs): Die Ergebnisse der chemischen Analyse zur Bestimmung der Konzentrationen von Dioxinen und Furanen sind in der Tabelle 3.7 zusammengefasst. Zur standardisierten Quantifizierung der Dioxine und Furane wurden die TCDD-Äquivalente (TEQs) der WHO (World Health Organisation; Safe 1994, van den Berg et al. 1998) berechnet. Dabei werden die Konzentrationen mit den TEFs (TCDD-Äquivalenzfaktoren, relative Wirksamkeit in Bezug auf 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin) multipliziert und aufsummiert. Bei dieser Kalkulation ergeben sich die

höchsten Belastungen für die Standorte Öpfingen und Schwarzach (46,8 und 36,1 ng/kg), eine mittlere Belastung für die Standorte Rottenacker und Ehingen (27,7 und 22,5 ng/kg) und die geringste Belastung für Sigmaringen und den Zufluss Lauchert (16,1 und 13,2 ng/kg). Auch hier sind Ursachen und Quellen für die gemessenen Konzentrationen nicht bekannt.

Tab. 3.7: Übersicht über die Konzentrationen (ng/kg) verschiedener prioritärer organischer Schadstoffe (PCBs und PCDD/Fs) in den Sedimenten verschiedener Donaustandorte und zwei ihrer Zuflüsse (mit * gekennzeichnet; Keiter et al. 2007a).

	Sigmaringen	Lauchert*	Schwarzach*	Rottenacker	Ehingen	Öpfingen
2,3,7,8-TCDF	17,9	6,6	41,3	29,9	23,1	54,9
1,2,3,7,8-PeCDF	6,5	2,4	10,2	10,9	6,4	7,2
2,3,4,7,8-PeCDF	9,7	5,2	17,4	21,8	16,7	36,9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	14,5	8,5	35,8	18,5	19,1	42,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5,4	3,3	18,1	8	5,4	14,2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	4,7	3,4	15	7	6,14	14,3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1,7	0,3	1	0,1	0,5	0,8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	57,5	35,1	128,4	71,7	50,2	139,2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	4,7	1,9	12,9	4,9	4,5	13,2
OCDF	265,6	99,9	239,9	168,7	133,8	396,4
Σ Furane	388,2	166,6	520	341,5	265,6	719,3
2,3,7,8-TCDD	2,4	2	5,9	7	6,7	6,9
1,2,3,7,8-PeCDD	2,3	1,2	4,7	1,8	1,1	3,6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3,1	2,7	8,7	2,5	1,9	9,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	8,6	6,5	20,1	10,9	7,3	24,8
1,2,3,7,8,9-HxCDD	8,2	6,9	17,9	7,2	5,8	17,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	138,6	149,3	645,4	234,8	178,9	685,8
OCDD	875,9	934,1	4104,8	1380,3	907,9	3841,4
Σ Dioxine	1039,1	1102,7	4807,5	1644,5	1109,5	4589,1
PCB 77	30,1	18,6	167,1	119,9	62,8	51,9
PCB 126	5,6	4	64,2	34,6	26,3	15,5
PCB 169	1	0,6	11,6	5,5	3,3	3
Σ PCBs	37,7	19,6	242,9	160	92,4	70,4

In den Sedimenten sind insbesondere die z.T. sehr hohen PAH-Konzentrationen vor allem in der Probe aus der Schwarzach und dem Öpfinger Stausee zu bemerken, wodurch ein Zusammenhang zwischen chemischer Belastung und dem Fischrückgang in der oberen Donau nicht eindeutig auszuschließen ist (Keiter et al. 2007a). Berücksichtigt man bei der Berechnung der TEQs die Konzentrationen der drei PCBs, so erhöhen sich die TEQ-Werte z.T. noch deutlich (Abb. 3.3), wobei die Schwarzach mit 8,1 ng/kg die größte Steigerung zu verzeichnen hatte. Im Abschnitt 3.6 wurde der Anteil der chemisch analysierten PCDDs und PCDFs sowie der PCBs und PAHs an der gesamten, sehr hohen Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit in drei unterschiedlichen *In vitro*-Biotestverfahren bilanziert. Auch wurde in der Beurteilung der Ergebnisse aus anderen Biotestverfahren die Konzentrationen der prioritären, persistenten Schadstoffe einbezogen, da PAHs, PCBs und PCDD/Fs akute Toxizität, Mutagenität, Karzinogenese, Hepatotoxizität, Immunsuppression, endokrine Dysfunktion, teratogene Effekte, Thymusatrophie sowie Störungen in der Reproduktion und der Thyroidfunktion insbesondere in Fischen verursachen.

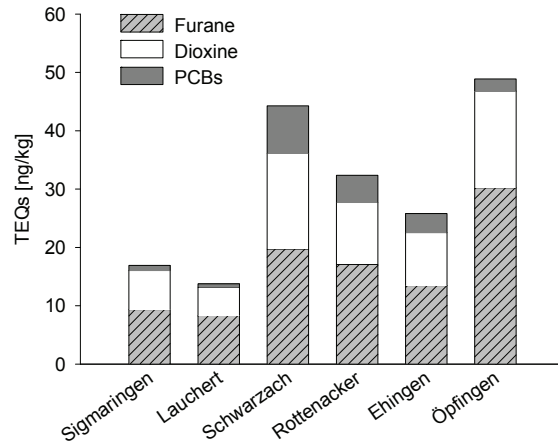


Abb. 3.3: Konzentrationen von analysierten PCBs und PCDD/Fs in Sedimenten aus der oberen Donau, dargestellt als TCDD-Äquivalente (Chem-TEQ).

3.2.3 Kohlenstoffgehalt der Sedimentproben

In Tabelle 3.7 ist der Kohlenstoffgehalt der verschiedenen Sedimentproben aus der Donau aufgelistet. Da ein Großteil der organischen Schadstoffe bevorzugt an organisches Material adsorbiert, kann der Anteil des organische Kohlenstoffs (TOC) das Schadstoffpotential unpolarer Substanzen stark beeinflussen (Kammann et al. 2000). Die höchsten TOC-Gehalte konnten für die Standorte Schwarzach, Rottenacker und Öpfingen ermittelt werden (7,2, 9,9 und 5,5 %). Für alle bayrischen Standorte sowie Ehingen und dem Zufluss Lauchert wurden mittlere TOC-Werte gemessen. In den Proben von Riedlingen und Sigmaringen betrug der organische Kohlenstoffanteil in den Sedimenten 0,8 und 1 %. Aus den analysierten Konzentrationen der verschiedenen organischen Verbindungen und dem TOC wurde der Anteil des organischen Kohlenstoffs von nicht-analysierten, chemischen Verbindungen berechnet (Tab. 3.8). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil der unbekannt organischen Kohlenstoffverbindungen in allen Proben über 99 % ausmacht. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass ein bestimmter Anteil des organischen Kohlenstoffs sich aus Kerogen, Rußpartikeln und Huminsäuren zusammensetzt, wobei dieser sehr stark schwanken kann (5 - 85 %) und von geologischen, biologischen, aber auch anthropogenen Einflüssen abhängig ist (Calace et al. 2006, Gustafsson & Gschwend 1998, Middleburg et al. 1999, Song et al. 2002).

Tab. 3.8: Anteil des organischen Kohlenstoffs (TOC) in Sedimenten aus der Donau und der prozentuale Anteil der gemessenen organischen Verbindungen am TOC.

	Sigmaringen	Lauchert	Schwarzach	Rottenacker	Ehingen	Öpfingen	Ingolstadt	Bad Abbach	Jochenstein
TOC [%]	1,00	1,80	7,20	9,90	3,70	5,50	2,90	2,90	2,20
TOC [g/kg]	10,00	18,00	72,00	99,00	37,00	55,00	29,00	29,00	22,00
PCDD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	1,04	1,10	4,81	1,64	1,11	4,59	-	-	-
%-Anteil am TOC	$1,0 \times 10^{-04}$	$6,1 \times 10^{-06}$	$6,7 \times 10^{-06}$	$1,7 \times 10^{-06}$	$3,0 \times 10^{-06}$	$8,3 \times 10^{-06}$	-	-	-
PCDF [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,39	0,17	0,52	0,34	0,27	0,72	-	-	-
%-Anteil am TOC	$3,9 \times 10^{-06}$	$9,2 \times 10^{-07}$	$7,2 \times 10^{-07}$	$3,4 \times 10^{-07}$	$7,2 \times 10^{-07}$	$1,3 \times 10^{-06}$	-	-	-
PCB [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,04	0,02	0,24	0,16	0,09	0,07	-	-	-
%-Anteil am TOC	$3,7 \times 10^{-07}$	$1,3 \times 10^{-07}$	$3,4 \times 10^{-07}$	$1,6 \times 10^{-07}$	$2,5 \times 10^{-07}$	$1,3 \times 10^{-07}$	-	-	-
EPA PAH [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2033	789	26315	-	2078	5296	1408	1019	247
%-Anteil am TOC	0,020	0,004	0,037	-	0,006	0,01	0,005	0,004	0,001

3.2.4 Schwermetallbelastung der Sedimente

Die Schwermetallanalyse ergab die höchsten Konzentrationen für die Sedimentproben aus Rottenacker und Jochenstein (Tab. 3.9). Im Vergleich zu den Schwermetallanalysen aus den Jahren 1992 (LfU 2004) und 2002 (Keiter 2003) ist der Gehalt aller gemessenen Schwermetalle in den Sedimenten jedoch deutlich zurückgegangen (Abb. 3.4), wodurch alle Standorte an der Donau den Güteklassen I oder I-II zugeordnet werden können. Lediglich in Rottenacker wurde ein erhöhter Zink-Gehalt ermittelt, wodurch dieser Standort als kritisch belastet (II-III) betrachtet werden muss. In allen Proben lagen die Cadmium-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 mg/kg, was nach LAWA (1998) noch mit der Güteklasse I-II zu vereinbaren ist. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei den Untersuchungen der LfU Baden-Württemberg aus dem Jahr 1992 Sedimente mit einer Korngröße $< 0,2 \mu\text{m}$ verwendet wurden, um den Schwermetallgehalt zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit und in der Studie aus dem Jahr 2002 wurden Sedimente mit einer Korngröße $< 2 \text{ mm}$ verwendet, so dass bei diesen Sedimentproben von einer geringeren spezifischen Oberfläche ausgegangen werden muss, an die Schwermetalle adsorbieren können. Die verschiedenen Schwermetalle können jedoch schon in subletalen Konzentrationen negative Effekte, z.B. in Fischen, hervorrufen. So konnte beispielsweise für Zink ein Einfluss auf die Reproduktionsleistung von unterschiedlichen Fischarten bei Konzentrationen zwischen 0,1 - 20 mg/L nachgewiesen werden (Köck 1996). Auch eine Verminderung der Wachstumsraten konnte in einer Studie von Christensen (1975) bei Larven von *Salvelinus fontinalis* nach einer Belastung mit 132 $\mu\text{g}/\text{L}$ über 26 Tage beobachtet werden (Köck 1996). In einem ähnlichen Projekt von Hansen et al. (2004) wurde ebenfalls eine Wachstumsverminderung in Regenbogenforellen festgestellt, die über mehrere Wochen mit Oligochäten (*Lumbriculus variegatus*) gefüttert wurden, welche zuvor in mit Schwermetallen versetzten Sedimenten gehalten worden waren.

Tab. 3.9: Übersicht über die Schwermetallkonzentrationen in Sedimentproben von der Donau aus dem Jahr 2004 in mg/kg Sediment. Die farbliche Markierung gibt die unterschiedlichen Güteklassen nach LAWA wieder (vgl. Tab. 1.2).

	Korngröße	Sigmaringen	Lauchert	Schwarzach	Riedlingen	Rottenacker	Ehingen	Öpfingen	Ingolstadt	Bad Abbach	Jochenstein
Blei	<2mm	13,6	14,6	25,0	9,6	29,3	9,5	20,7	16,5	14,0	16,4
Cadmium	<2mm	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG	<NWG
Chrom	<2mm	24,7	19,6	31,0	20,7	37,3	13,5	27,6	26,0	22,0	30,8
Kupfer	<2mm	28,5	18,1	29,6	11,8	34,3	9,6	24,9	37,3	26,7	36,4
Nickel	<2mm	16,5	14,1	22,0	14,1	27,0	5,8	15,9	14,7	15,6	34,2
Zink	<2mm	106,0	52,5	171,6	44,4	217,8	64,7	138,8	116,9	107,7	146,3

NWG = Nachweisgrenze

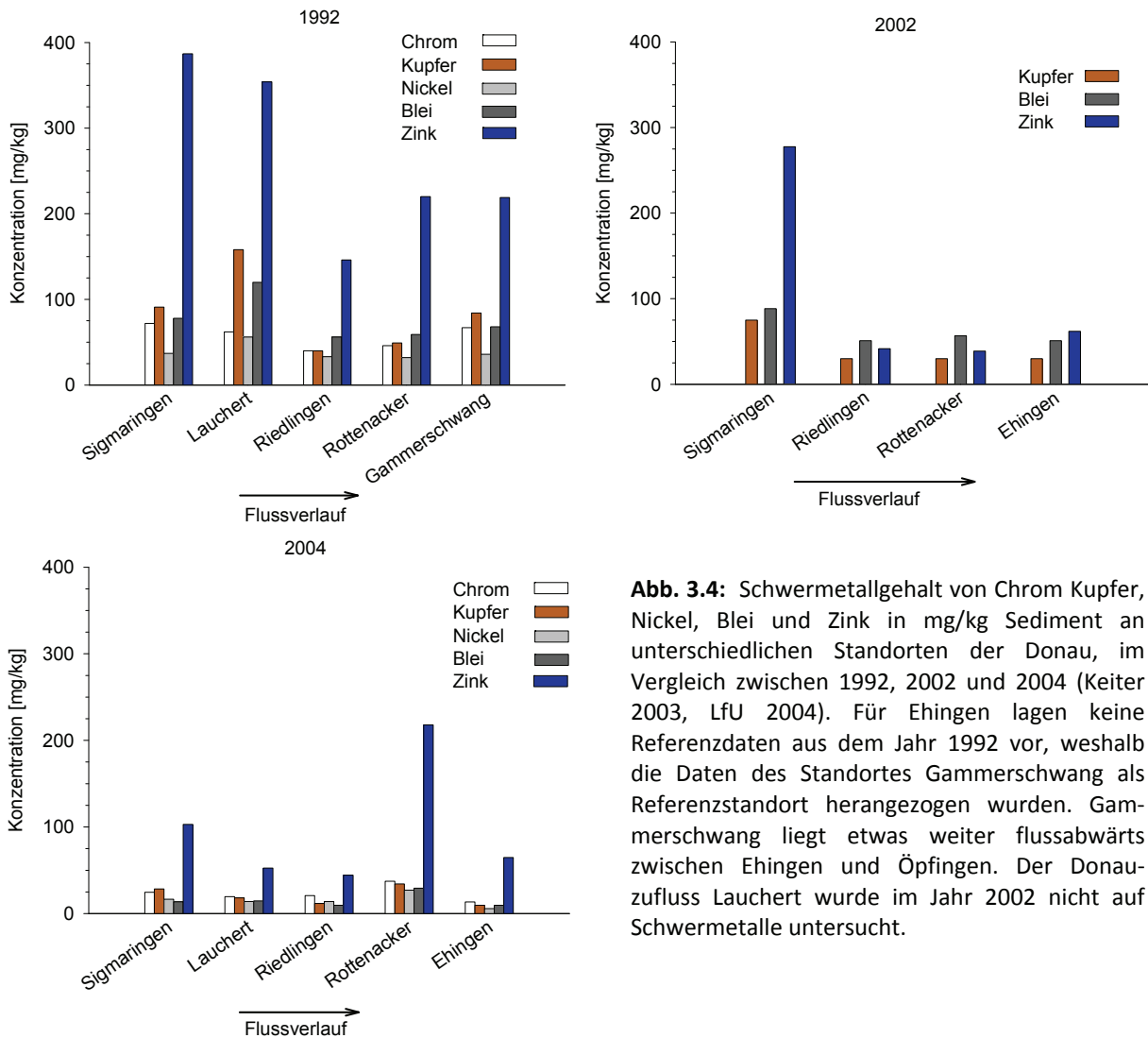


Abb. 3.4: Schwermetallgehalt von Chrom Kupfer, Nickel, Blei und Zink in mg/kg Sediment an unterschiedlichen Standorten der Donau, im Vergleich zwischen 1992, 2002 und 2004 (Keiter 2003, LfU 2004). Für Ehingen lagen keine Referenzdaten aus dem Jahr 1992 vor, weshalb die Daten des Standortes Gammerschwang als Referenzstandort herangezogen wurden. Gammerschwang liegt etwas weiter flussabwärts zwischen Ehingen und Öpfingen. Der Donauzufluss Lauchert wurde im Jahr 2002 nicht auf Schwermetalle untersucht.

3.3 Bakterientoxizität mit *Arthrobacter globiformis*

Zusammenfassung: Die Bakterientoxizität wurde in dieser Studie als Hemmung der Dehydrogenaseaktivität gemessen. Dieses Enzym spielt in vielen Stoffwechselprozessen, z.B. der Atmungskette, eine entscheidende Rolle. Als Testorganismus wurde das aerobe, chemoheterotrophe Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis* verwendet, das die dominierende Bakterienart in Böden darstellt.

Im Test mit nativen Sedimenten wiesen die beiden Probennahmestellen Schwarzach und Öpfingen den höchsten bakterientoxischen Effekt auf (54 und 27 mg/ml). Eine geringere toxische Wirkung ging von den bayrischen Standorten (Ingolstadt 157 mg/ml; Bad Abbach 178 mg/ml; Jochenstein 170 mg/ml) und den Proben aus Sigmaringen (260 mg/ml) aus. Einen mittleren toxischen Effekt zeigten die Proben aus der Lauchert (87,5 mg/ml), Riedlingen (74 mg/ml) und Ehingen (121,5 mg/ml). Es bleibt dennoch zu berücksichtigen, dass durch Quenching-Effekte der nativen Sedimente eventuell eine zu hohe Toxizität ermittelt wurde als tatsächlich vorhanden ist.

Die höchste Bakterientoxizität wiesen die Sedimentextrakte aus Ehingen (50 mg/ml), der Schwarzach (128 mg/ml), Öpfingen (140 mg/ml), Ingolstadt (165 mg/ml) und Bad Abbach (198 mg/ml) auf. Keine Toxizität ging hingegen von den Proben aus Sigmaringen, der Lauchert, Riedlingen und Jochenstein aus. Eine Korrelation der Ergebnisse zwischen den beiden Expositionspfaden (natives Sediment, Extrakt) konnte nicht festgestellt werden.

Aufgrund der Ergebnisse muss von einer erhöhten bakterientoxischen Belastung der Donausedimente ausgegangen werden, wobei die beiden Proben aus der Schwarzach und dem Öpfinger Stausee in beiden Testvarianten die höchsten Messwerte erreichten.

Im Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* wird der Umsatz des Farbstoffs Resazurin in das rosafarbene Resorufin durch mikrobielle Dehydrogenasen gemessen, die nur in vitalen Bakterien vorkommen. Je geringer der Farbumschlag, desto höher ist die Bakterientoxizität. Der Bakterienkontakttest wurde in dieser Studie mit nativen und extrahierten Sedimentproben durchgeführt.

3.3.1 Bakterienkontakttest mit nativen Sedimenten

Alle getesteten nativen Donauproben wiesen im unverdünnten Sediment eine 80 - 100 %-ige Hemmung der Bakterienaktivität auf. In Abbildung 3.5 sind exemplarisch die Dosis-Wirkungskurven von drei Donaustandorten dargestellt. Selbst in der höchsten Verdünnung des Sediments mit Quarzmehl (1:32 entspricht einer Konzentration 10,4 mg/ml) wurde in nur wenigen Proben eine Hemmung unter 50 % erreicht. Aus diesem Grund wurde für alle Proben vorwiegend der EC₇₅-Wert anstelle des EC₅₀-Werts bestimmt (Abb. 3.6). Die Sedimentprobe aus Rottenacker wurde nur bis zu einer Verdünnung von 1:16 (entspricht 21 mg/ml) mit Quarzmehl verdünnt, wies aber bis zu dieser Verdünnungsstufe immer noch eine 100 %-ige Hemmung auf, weshalb von einem EC₇₅ deutlich unterhalb von 21 mg/ml ausgegangen werden muss. Ebenfalls eine sehr hohe Bakterientoxizität wiesen die beiden Standorte Schwarzach und Öpfingen auf (54 und 27 mg/ml). Eine vergleichsweise geringe toxische Wirkung ging von den bayrischen Standorten (Ingolstadt 157 mg/ml; Bad Abbach 178 mg/ml; Jochenstein 170 mg/ml) und der Probe aus Sigmaringen (260 mg/ml) aus. Einen mittleren toxischen Effekt zeigten die Proben aus der Lauchert (87,5 mg/ml), Riedlingen (74 mg/ml) und Ehingen (121,5 mg/ml).

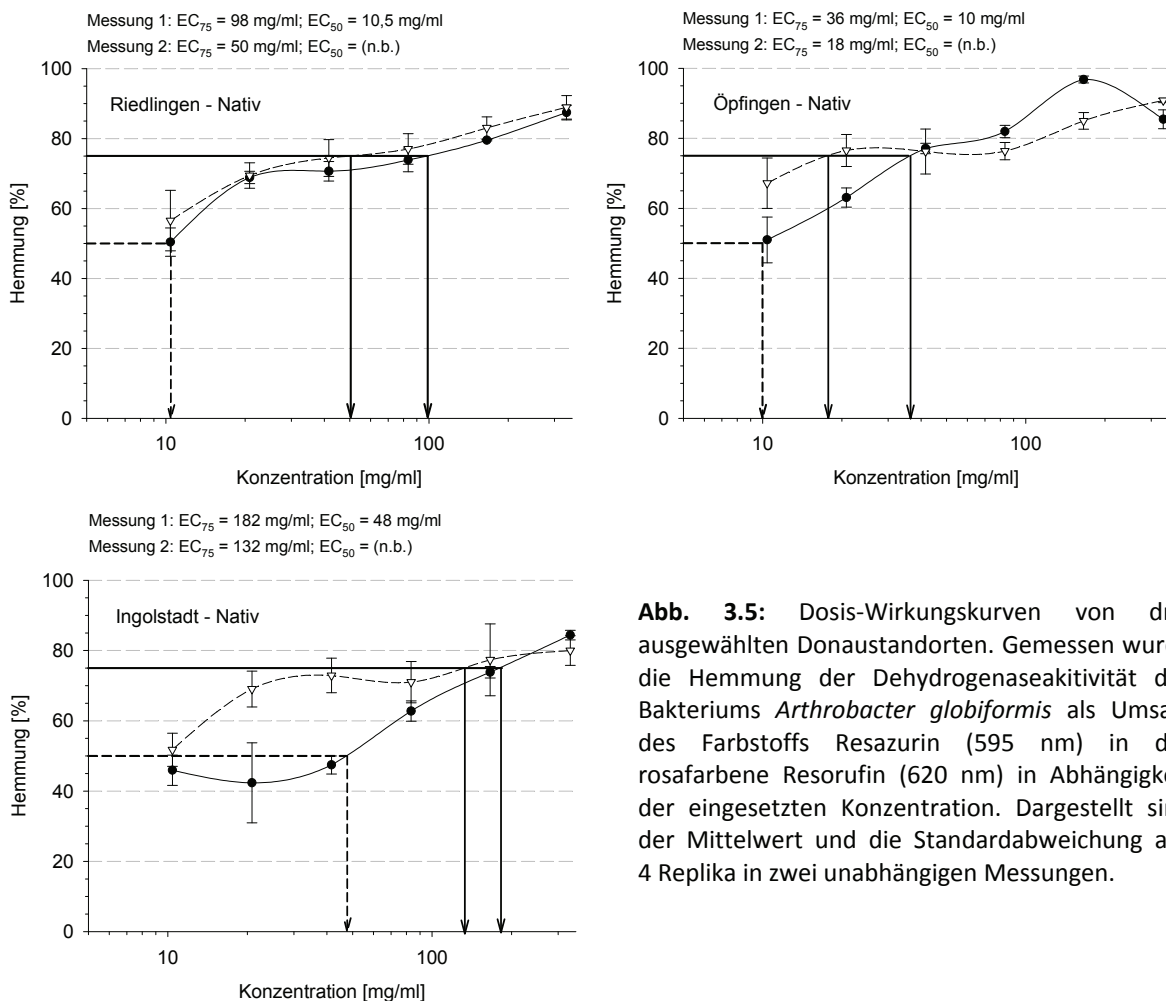


Abb. 3.5: Dosis-Wirkungskurven von drei ausgewählten Donaustandorten. Gemessen wurde die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität des Bakteriums *Arthrobacter globiformis* als Umsatz des Farbstoffs Resazurin (595 nm) in das rosafarbene Resorufin (620 nm) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 Replika in zwei unabhängigen Messungen.

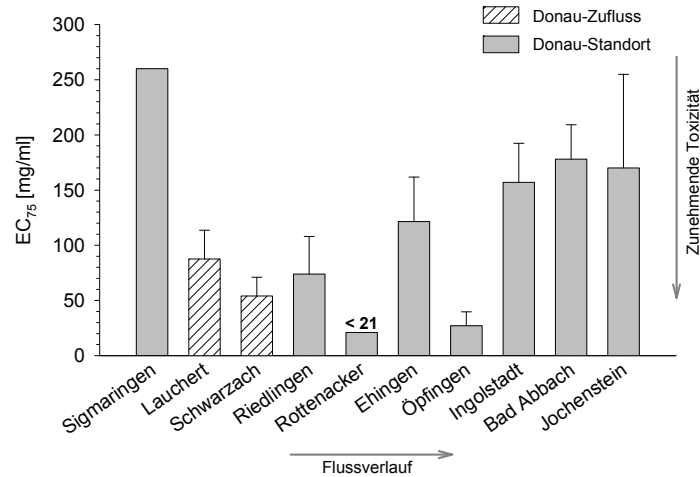


Abb. 3.6: Bakterientoxizität der Donauproben mit *Arthrobacter globiformis*, dargestellt als EC₇₅ (n = 2). Die EC₇₅-Werte sind als mg natives Sediment pro ml Medium angegeben. Für den Standort Rottenacker konnte kein EC₇₅ bestimmt werden, da die Probe bis zur niedrigsten Konzentration eine 100 %-ige Hemmung aufwies.

3.3.2 Bakterienkontakttest mit Sedimentextrakten

In Abbildung 3.7 ist exemplarisch der Dosis-Wirkungsverlauf von drei getesteten Probenstandorten dargestellt. Im Bakterienkontakttest mit Extrakten konnte nicht für alle Proben der EC₅₀-Wert bestimmt werden, was jedoch nicht auf zu hohe Hemmwerte in niedrigen Konzentrationen zurückzuführen ist, wie beim Test mit nativen Sedimentproben, sondern auf eine zu niedrige bzw. keine

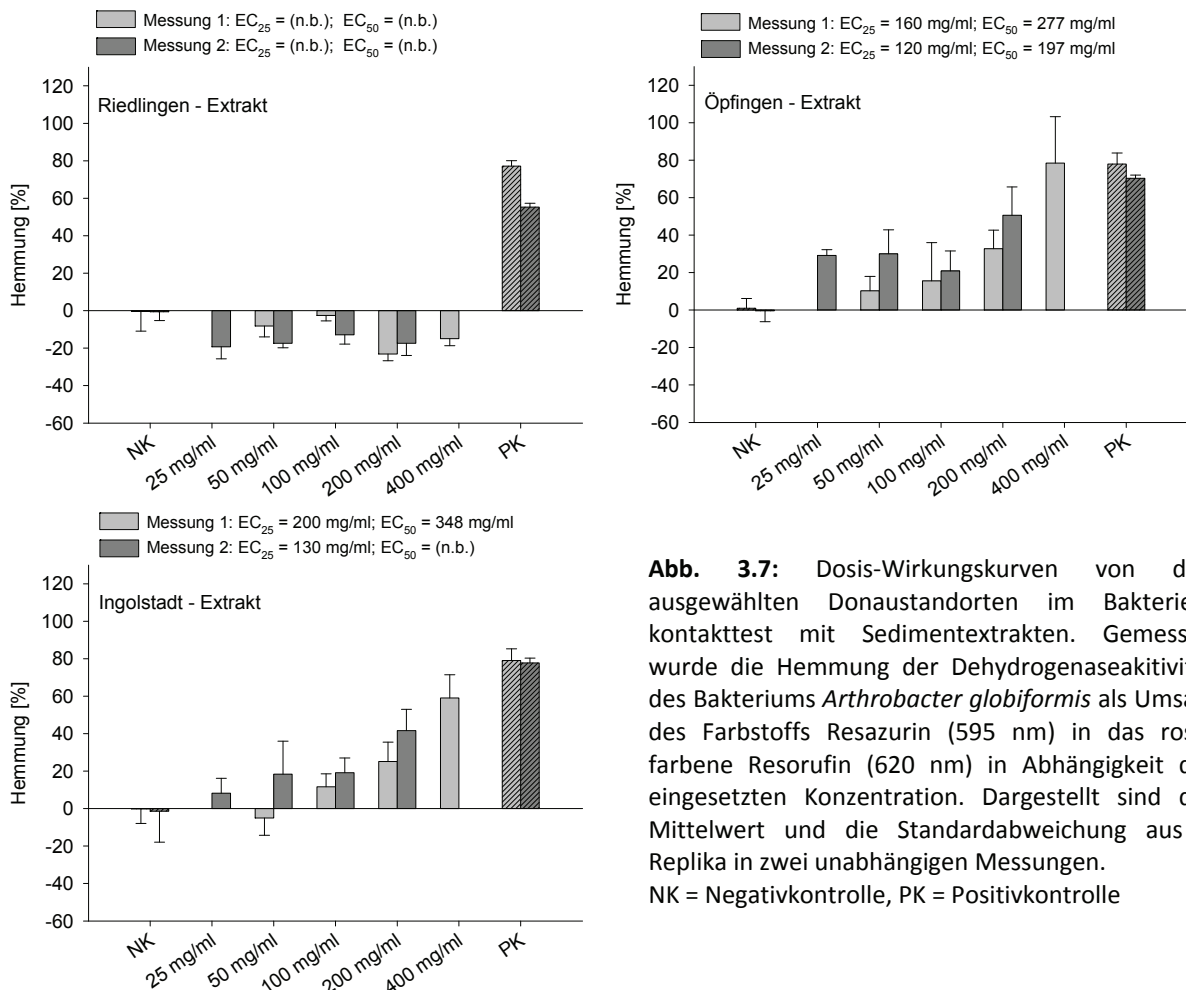


Abb. 3.7: Dosis-Wirkungskurven von drei ausgewählten Donaustandorten im Bakterienkontakttest mit Sedimentextrakten. Gemessen wurde die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität des Bakteriums *Arthrobacter globiformis* als Umsatz des Farbstoffs Resazurin (595 nm) in das rosa-farbene Resorufin (620 nm) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 Replika in zwei unabhängigen Messungen. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle

Hemmung in den getesteten Konzentrationen. Aufgrund dessen wurde der EC_{25} -Wert für alle Proben ermittelt. Den höchsten bakterientoxischen Effekt wiesen demnach die Sedimentextrakte aus Ehingen (50 mg/ml), der Schwarzach (128 mg/ml), Öpfingen (140 mg/ml), Ingolstadt (165 mg/ml) und Bad Abbach (198 mg/ml) auf. Keine Toxizität ging hingegen von den Proben aus Sigmaringen, der Lauchert, Riedlingen und Jochenstein aus (Abb. 3.8).

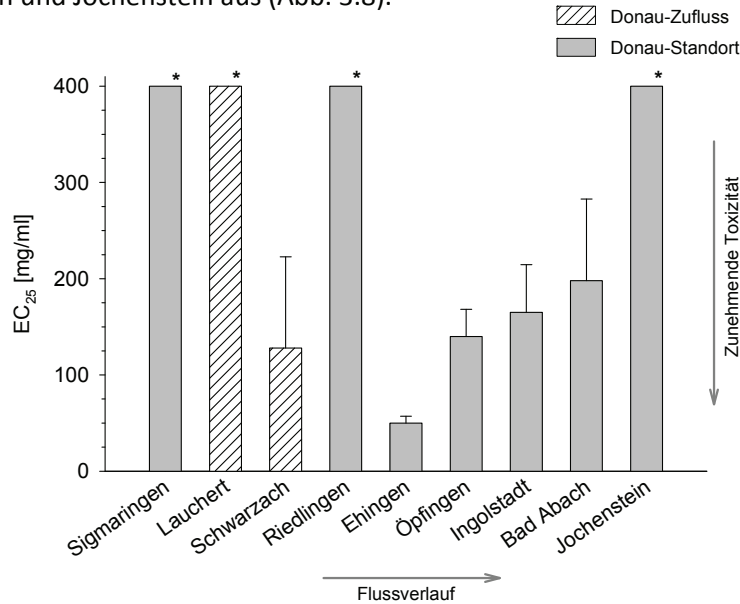


Abb. 3.8: Bakterientoxizität der Sedimentextrakte mit *Arthrobacter globiformis*, dargestellt als EC_{25} ($n = 2$). Die EC_{25} -Werte sind als mg Sedimentäquivalent pro ml DMSO angegeben. Für die Standorte Sigmaringen, Lauchert, Riedlingen und Jochenstein konnten keine EC_{25} bestimmt werden. Mit * markierte Balken markieren Proben ohne bakterientoxische Wirkung ($EC_{25} > 400$ mg/ml).

3.3.3 Vergleich der beiden Expositionspfade

Aufgrund der unterschiedlichen aufgenommenen EC-Werte (EC_{75} bei nativen und EC_{25} bei extrahierten Proben) ist ein direkter Vergleich der beiden Expositionspfade nicht möglich, deshalb wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Dabei konnte nur eine geringe Übereinstimmung der Bakterientoxizität zwischen nativen und extrahierten Proben festgestellt werden. Bemerkenswert sind die hohen Hemmwerte in den unverdünnten, nativen Sedimenten, die darauf hinweisen, dass ein erhebliches bakterientoxisches Potential in der Donau vorliegt. Ein Problem bei der Fluoreszenzmessung der bakteriellen Aktivität mit Resazurin stellen jedoch unbekannte Komponenten in nativen Sedimenten dar, die Resazurin chemisch zu Resorufin reduzieren (Liß & Ahlf 1997). Ahlf (2007) forderte daher, einen Kontrollansatz der nativen Sedimente ohne Bakterien, um solche unerwünschten Nebeneffekte ausschließen zu können. In der vorliegenden Studie wurden daher alle Sedimentproben in einem eigenen Ansatz ohne Bakterien getestet. Dabei wurde keine Reduktion von Resazurin durch Sedimentinhaltsstoffe nachgewiesen (Daten nicht dargestellt). Ein weiterer Effekt der im Test mit nativen Sedimenten auftreten kann, ist das sogenannte Quenching, dabei wird das Fluoreszenzsignal durch Sedimentpartikel reduziert, wodurch letztlich eine höhere Hemmung angezeigt wird. Heise und Ahlf (2005) schlagen deshalb einen Kalibrierungsschritt vor, bei dem für jede verwendete Sedimentkonzentration verschiedene Resazurinmengen getestet werden, um so dem Quenching-Effekt Rechnung zu tragen und falsch positive Resultate auszuschließen. In dieser Studie konnte aufgrund der limitierten Probenmenge diese Kalibrierung nicht durchgeführt werden, weshalb eine Beeinträchtigung des Testsystems durch Quenching nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein Grund für die Aktivierung des Bakterienwachstums in einigen Tests mit Sedimentextrakten kann ein erhöhtes Nahrungsangebot sein (Burton 1991). Nährstoffe stimulieren das Wachstum der Bakterien und führen somit zu einer Erhöhung der Dehydrogenaseaktivität (Keiter et al. 2006). Ein anderer Grund könnte aber auch eine Membranschädigung bei den Bakterien sein, die zum Austritt der Dehydrogenasen aus den Zellen führt und so in einem höheren Messwert resultiert. Neben einer Zerstörung der bakteriellen Zellwände kommt schließlich auch eine Hormesis in Betracht. Sie liegt vor, wenn eine Störung des Stoffwechsels durch Schadstoffe eine übermäßige Kompensationsreaktion der Organismen und somit eine gesteigerte Aktivität bewirkt (Chapman 2002). Eine besonders verstärkte Enzymaktivität im Energiestoffwechsel lässt sich anhand der Dehydrogenasen nachweisen (Thomson et al. 1986). Burton (1991) schlägt vor, auch diese Effekte als mögliche Störung zu interpretieren (Gratzer & Ahlf 1999, Liß & Ahlf 1997, Neumann-Hensel & Melby 2006).

Nach diesen Gesichtspunkten können die verschiedenen Donauproben – insbesondere die Standorte Ehingen und Öpfingen sowie der Zufluss Schwarzach – als bakterientoxisch bewertet werden, wobei im Test mit den nativen Sedimenten ein Quenching nicht ausgeschlossen werden kann, und man daher bei einzelnen Proben von einer geringeren bakterientoxischen Wirkung ausgehen kann. Dessen ungeachtet gelten Bakterien als eine kritische Komponente beim Abbau von organischen Stoffen, und die Messung ihrer Reaktion wird als erster Hinweis auf Belastungen eines Ökosystems empfohlen. Auch wenn Bakterien nicht über die gleiche Komplexität verfügen wie eukaryotische Zellen, so verfügen sie doch über eine zumindest teilweise ähnliche enzymatische Ausstattung (Ahlf 1995, Liß & Ahlf 1997, Rönnpagel et al. 1995). So konnte auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus einem anderen Bakterientest auf den Daphnientest und Fischtest bestätigt werden (Ahlf 1995).

3.4 Cytotoxizität im Neutralrottest mit der Zelllinie RTL-W1

Zusammenfassung: Im Neutralrottest mit der Zelllinie RTL-W1 wurde die Cytotoxizität der acetonischen Sedimentextrakte und einer Multilayer-Fraktion geprüft. Dabei konnte insbesondere für den Standort Rottenacker (4,8 mg SEQ/ml) ein sehr hohes, sowie für die Proben aus der Schwarzach und aus Ehingen und Öpfingen (je 20 mg SEQ/ml) ein hohes cytotoxisches Belastungspotential beobachtet werden. Eine sehr niedrige cytotoxische Wirkung ging hingegen von den Proben aus der Lauchert und Riedlingen aus (180 und 195 mg SEQ/ml). Die bayrischen Standorte sowie der Standort Sigmaringen wiesen eine mittlere bis hohe Cytotoxizität auf. Keine toxischen Effekte gingen von den Multilayer-Fraktionen aller getesteten Proben aus.

Im Vergleich mit anderen Flussgebieten erwiesen sich die Sedimente aus der Donau ähnlich toxisch wie aus dem Rhein und signifikant toxischer als solche aus dem Neckar. Auch im direkten Vergleich mit den Donauproben aus dem Jahr 2002 hatte sich an der hohen cytotoxischen Belastungssituation nur wenig verändert.

Eine Korrelationsanalyse der Resultate aus der PAH-Analyse und dem Neutralrottest wies auf einen direkten Zusammenhang zwischen chemischer Belastung und erhöhter Cytotoxizität hin, wobei eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Konzentrationen des 4-Ring-PAHs Benzo[*a*]anthracen und dem 3-Ring-PAH Phenanthren ermittelt werden konnte. Diese beiden Substanzen hatten sich bereits in anderen Studien als cytotoxisch gegenüber Fischzelllinien erwiesen.

Berücksichtigt man nun die in anderen Studien festgestellte Korrelation zwischen *In vitro*-Cytotoxizität und *In vivo*-Fischtoxizität sowie die hohen PAH-Konzentrationen, kann ein Zusammenhang zwischen dem Fischrückgang und einer PAH-Kontamination nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

3.4.1 Cytotoxizität der Sedimentextrakte und der Multilayer-Fraktion

Die Sedimentextrakte der zehn Donaustandorte und die Prozesskontrolle wurden mit der Zelllinie RTL-W1 und dem Endpunkt Neutralrotretention (NR) auf ihr cytotoxisches Potential hin untersucht. Die Cytotoxizität wurde photometrisch über die Absorption von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt und alle Proben in drei unabhängigen Replikaten gemessen. Aus den Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Probenextrakte konnten NR_{50} -Werte von 4,8 bis 182,7 mg SEQ/ml (mg Sedimentäquivalent/ml Medium) graphisch ermittelt werden. In Abbildung 3.9 sind die NR_{50} -Mittelwerte mit den Standardabweichungen dargestellt. Für die Extrakte der Standorte Riedlingen und Lauchert konnte nur ein geringes cytotoxisches Potential nachgewiesen werden bzw. cytotoxische Effekte traten erst über der eingesetzten Höchstkonzentration von 200 mg SEQ/ml auf. Mit Ausnahme der Probe aus der Lauchert erwiesen sich alle übrigen Proben im Vergleich zur Probe aus Riedlingen als statistisch signifikant unterschiedlich (t-Test; $p \leq 0,05$). Die höchste Cytotoxizität konnte für den Standort Rottenacker (4,8 mg SEQ/ml; Abb. 3.9) gemessen werden.

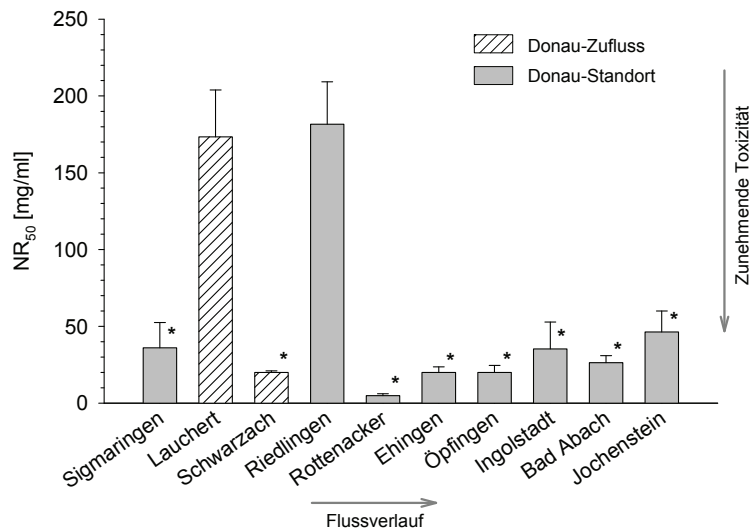


Abb. 3.9: Cytotoxizität der Donauproben mit der Zelllinie RTL-W1, dargestellt als NR_{50} mit dem Endpunkt Neutralrot ($n = 3$). Die NR_{50} -Werte sind als mg Sedimentäquivalent (SEQ) pro ml Medium angegeben. Mit Ausnahme der Lauchert-Probe unterschieden sich alle Proben signifikant (*) von der Riedlingen-Probe (t-Test mit $p \leq 0,05$). Datengrundlage: Grund et al. (2007).

Die untersuchten Multilayer-Fractionen übten keine zelltoxischen Effekte auf die RTL-W1-Zellen aus. Eine Bestimmung des NR_{50} -Wertes war daher bei keiner Probe möglich. Lediglich die Proben von Schwarzach und Rottenacker zeigten eine deutliche Zunahme der Cytotoxizität in der höchsten Konzentration (Daten detailliert in Grund (2005) dargestellt).

3.4.2 Vergleich der Cytotoxizität zwischen Donau, Rhein und Neckar

Die in dieser Studie getesteten Sedimentextrakte wiesen zum größten Teil ein hohes toxisches Potential auf. Die Ergebnisse aus dieser Donaustudie wurde mit Rhein- (Kosmehl et al. 2004) und Neckarproben (Hollert et al. 2000) sowie mit Donauproben der Vorstudie aus dem Jahr 2002 (Keiter et al. 2006) verglichen, um die gewonnenen Resultate besser einordnen zu können. Dabei zeigte sich, dass die Donau im Vergleich mit dem Jahr 2002 ein geringfügig niedrigeres cytotoxisches Potential aufwies; dies ist jedoch wahrscheinlich auf eine veränderte Beprobungsstrategie zurückzuführen. Im Jahr 2004 wurde auf die Entnahme von Schwebstoffen (Keiter et al. 2006) verzichtet und stattdessen zwei Zuflüsse und drei Standorte der Donau in Bayern in die Beprobung miteinbezogen. Außerdem

konnte gezeigt werden, dass die Donau über ein deutlich höheres toxisches Potential verfügt als Proben aus dem Neckar und eine ähnlich hohe cytotoxische Belastung aufwies wie der Rhein (Abb. 3.10). Der Rhein wird industriell stark genutzt und auch heute noch durch diverse Unfälle zeitweise stark belastet, auch wenn sich insgesamt die Wasserqualität in den letzten zehn Jahren erheblich verbessert hat (Ulrich et al. 2002). In Analogie zu den Befunden der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass auch in Rheinsedimenten, die als Schwebstoffsенke und -quelle dienen, ein relativ hohes toxisches Potential vorliegt (Kosmehl et al. 2004, Ulrich et al. 2002). Die Donau wird deutlich weniger stark industriell genutzt und galt in der Vergangenheit als wenig belastet (Hertel et al. 2001). Jedoch kann aufgrund der vergleichbaren Resultate im Cytotoxizitätstest zwischen Rhein und Donau von einer ähnlich hohen Belastung dieser beiden Flüsse ausgegangen werden.

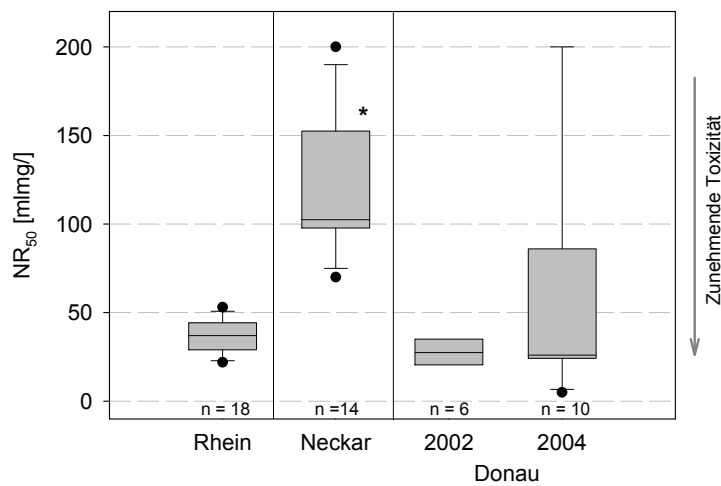


Abb. 3.10: Vergleich zwischen den NR₅₀-Werten von Rhein- (Kosmehl et al. 2004), Neckar- (Hollert et al. 2000) und Donauextrakten aus den Jahren 2002 (Keiter et al. 2006) und 2004 (Grund et al. 2007). Die mit einem Stern gekennzeichneten Neckarproben sind signifikant unterschiedlich gegenüber der Donau 2004 (einfaktorielle nichtparametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunn's Test; $p < 0,05$). Die anderen Proben von Rhein und Neckar zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Donau 2004.

3.4.3 Vergleich Cytotoxizität und PAH-Kontamination

Akute Cytotoxizität gilt als ein wichtiger Biomarker zur Risikobewertung von kontaminierten Umweltproben (Davoren et al. 2005, Fent 2004). So konnte auch gezeigt werden, dass akute Cytotoxizität *in vitro* sehr gut mit akuter Fischtoxizität *in vivo* korreliert (Castano et al. 1995, Segner 1998a). In einer Studie von Fent und Bätischer (2000) wurden 19 verschiedene PAHs auf ihre akute Cytotoxizität im Neutralrottest mit der Zelllinie PLHC-1 (Hepatomezellen aus *Poeciliopsis lucida*) getestet, wobei sich jedoch nur Benzo[a]anthracen als signifikant cytotoxisch erwies. Des Weiteren zeigten Schirmer et al. (1998), dass von den 16 prioritären EPA-PAHs lediglich 2- und 3-Ring PAHs einen direkten cytotoxischen Effekt gegenüber der Kiemenzelllinie aus der Regenbogenforelle (RTgill-W1; Naphthalen (2-Ring) \cong Acenaphthylen (3-Ring) \cong Acenaphthen (3-Ring) > Fluoren (3-Ring) \cong Phenanthren (3-Ring)) aufwiesen. Aufgrund dieser Studien wurden die eigenen Ergebnisse aus der PAH-Analyse und dem Neutralrottest mit der Zelllinie RTL-W1 gegeneinander korreliert. Weil die eigenen Daten nicht normalverteilt waren, wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (r_s) und zur graphischen Darstellung eine Regressionsanalyse durchgeführt. Demnach besteht eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen des Neutralrottests mit dem 4-Ring PAH Benzo[a]anthracen ($r_s = 0,83$) und eine sehr hohe Korrelation mit dem 3-Ring PAH Phenanthren ($r_s = 0,91$). Fluoren, ein

3-Ring PAH, verfügte nur über eine mäßige Korrelation mit dem cytotoxischen Effekt der Sedimente ($r_s = 0,59$). Keine Korrelationsanalyse wurde für Naphthalen, Acenaphthylen und Acenaphthen durchgeführt, weil in den meisten Proben diese Substanzen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, bzw. nicht chemisch-analytisch detektiert werden konnten.

Diese statistischen Analysen lassen jedoch keine Aussage über die spezifische Cytotoxizität der einzelnen Substanzen gegenüber der Zelllinie RTL-W1 zu, sondern zeigen lediglich auf, dass eine erhöhte Cytotoxizität mit einer PAH-Kontamination einhergeht. Diese Vermutung wird unterstützt durch die sehr hohe Korrelation zwischen der Summenkonzentration aller 16 PAHs mit den Ergebnissen aus dem Cytotoxizitätstest ($r_s = 0,9$; Abb. 3.11). Berücksichtigt man nun die in den Studien von Segner (1998a) und Castano et al. (1995) festgestellte Korrelation zwischen *In vitro*-Cytotoxizität und *In vivo*-Fischtoxizität, kann ein Zusammenhang zwischen dem Fischrückgang und einer PAH-Kontamination angenommen werden.

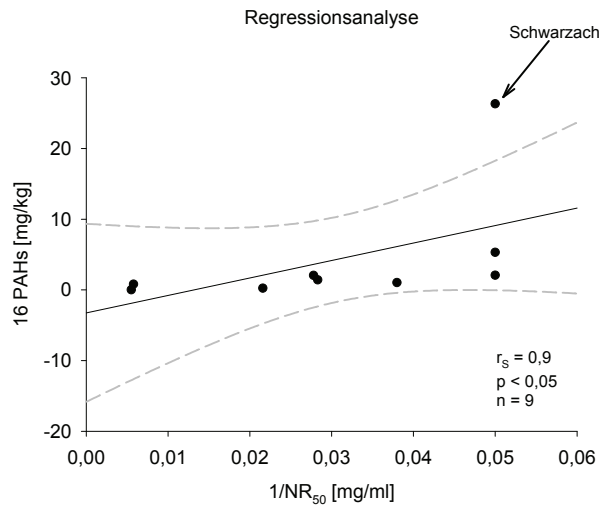


Abb. 3.11: Lineare Regression mit dem 95 % Konfidenzintervall aus dem Kehrwert der NR₅₀-Werte der Sedimentextrakte und der Summenkonzentration der analysierten 16 PAHs der Donauproben und zwei ihrer Zuflüsse. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman

3.5 Embryotoxizität und Teratogenität im Fischeitest mit *Danio rerio*

Zusammenfassung: Im Fischeitest mit *Danio rerio* wurden sowohl acetonische Extrakte als auch native Sedimente aus der Donau auf ihre Embryotoxizität und Teratogenität getestet. Dabei konnte eine hohe Korrelation zwischen diesen beiden Expositionspfaden festgestellt werden (nach 48 h; $r_s = 0,92$).

Die Extrakte verursachten häufig extreme Ödeme und Missbildungen der Wirbelsäule. Mit fortschreitender Versuchsdauer konnte eine leichte Zunahme der Mortalität beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der erweiterten Kriterien nach 168 h nahm dann die Mortalität signifikant zu. Deshalb werden eine Verlängerung der Versuchsdauer und/oder eine Erweiterung der Bewertungskriterien empfohlen, um eine Unterschätzung des embryotoxischen Schädigungspotentials zu vermeiden.

Eine Entwicklungsverzögerung der Larven von *Danio rerio* war der häufigste beobachtete Effekt beim Fischeitest mit nativen Proben. In niedrigen Konzentrationen glichen die Embryonen den Rückstand meist wieder aus, während in den höheren Konzentrationen die meisten Tiere abstarben. Missbildungen und Ödeme waren seltener und schwächer ausgeprägt als im Test mit Extrakten. Insgesamt konnte mit anhaltender Versuchsdauer ein Rückgang der Mortalität beobachtet werden.

Hypoxie hat beim Zebraäbrbling eine Verzögerung der Entwicklung zur Folge, deshalb wurde der Sauerstoffgehalt bei allen Testansätzen überprüft. Dabei konnte jedoch festgestellt werden, dass der kritische Wert von 2 mg O₂/ml nie unterschritten wurde.

Ein Ranking der Ergebnisse aus beiden Expositionspfaden nach der embryotoxischen Wirkung lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- **Native Proben:** Rottenacker > Öpfingen > Ehingen > Schwarzach > Ingolstadt > Bad Abbach > Jochenstein > Lauchert > Riedlingen > Sigmaringen
- **Extrakte:** Ehingen > Rottenacker > Schwarzach > Öpfingen > Bad Abbach > Ingolstadt > Jochenstein > Lauchert \cong Riedlingen \cong Sigmaringen

PAHs verursachen in frühen Stadien des Zebraäbrblings unterschiedliche Effekte, z.B. Störung der Herzfunktion, craniofaciale Fehlbildungen, Ödeme am Perikard und Dottersack sowie ein reduziertes Wachstum und eine generell erhöhte Mortalitätsrate. Eine Korrelationsanalyse zwischen den PAH-Analysen (Phenanthren, Pyren und Summe der EPA-PAHs) und den Ergebnissen aus dem Fischeitest mit nativen und extrahierten Donauproben ergab eine mittlere bis hohe Korrelation. Deshalb kann auch aufgrund der hohen PAH-Konzentrationen und den teilweise extremen embryotoxischen Effekten ein Zusammenhang dieser Parameter und dem Fischrückgang in der Donau nicht ausgeschlossen werden.

Ein Vergleich der Donau mit Proben aus dem Einzugsgebiet des Rheins ergab für die beiden Expositionspfade unterschiedliche Resultate: a) die Sedimentextrakte der Donau sind signifikant weniger embryotoxisch belastet als die Proben vom Rhein, und b) die nativen Sedimente weisen ein ähnlich hohes bzw. höheres embryotoxisches Potential auf als die Proben aus dem Rhein. Im Gegensatz zu den Rheinproben waren die nativen Sedimente aus der Donau deutlich weniger toxisch als die entsprechenden Extrakte.

Im Rahmen dieser Studie wurden gefriergetrocknete Sedimente und Sedimentextrakte embryotoxikologisch am Zebrafisch (*Danio rerio*) untersucht. In beiden Ansätzen wurden teratogene und embryotoxische Effekte über eine Woche alle 24 Stunden beobachtet und dokumentiert. Außerdem wurde für alle Proben der EC_{50} -Wert nach 48 und 168 h nach DIN 38415-T6 bestimmt. Da jedoch nicht jeder Embryo, der nach 168 h nach DIN-Endpunkten als lebend bewertet wird, im natürlichen Lebensraum tatsächlich auch überlebensfähig wäre, wurden erweiterte Kriterien verwendet (vgl. Tabelle 2.6) und auch hierfür der EC_{50} -Wert ermittelt. Zusätzlich wurde der EC_{50} -Wert nach 24 h nach den Kriterien von Hollert et al. (2003) bestimmt.

3.5.1 Embryotoxizität der verschiedenen Kontrollen

Um unerwünschte Effekte von DMSO, Quarzmehl und dem Extraktionsverfahren ausschließen zu können, wurden alle drei Komponenten gesondert im Fischeitest auf ihre Embryotoxizität hin überprüft. Die Prozesskontrolle der Soxhlet-Extraktion zeigte zu keinem Zeitpunkt negative Effekte auf die Embryonalentwicklung, so dass eine nachteilige Beeinflussung durch die Extraktion ausgeschlossen werden konnte. Beim Fischeitest mit Quarzmehl wurde ebenfalls kein Unterschied zur Negativkontrolle mit Kunstwasser beobachtet. In Abbildung 3.12 ist die normale Entwicklung des Zebrafischs zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

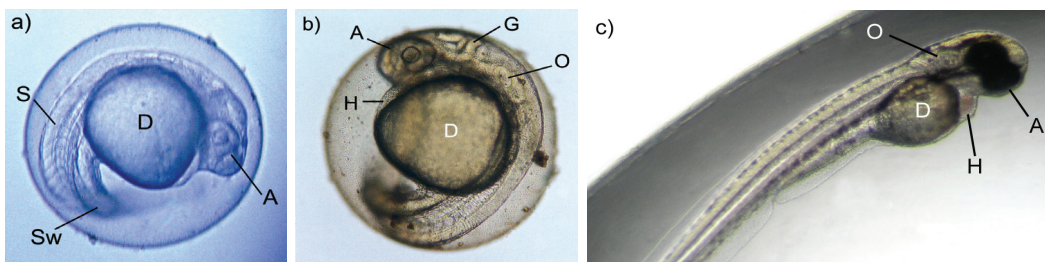


Abb 3.12: Normale Entwicklung des Zebrafischs (*Danio rerio*) über 72 h: a) Entwicklung nach 24 h, der Schwanz (Sw) hat sich vom Dottersack (D) gelöst, Somiten (S), Ohrplackode (O) und Augenanlage (A) sind deutlich zu erkennen; b) nach 48 h sind das Gehirn (G) und der Blutkreislauf mit Herz (H) zu sehen (Bild aus Hollert et al. 2003); c) nach 72 h schlüpft der Embryo, der Dottersack ist kleiner und die Pigmentierung ist ausgeprägt.

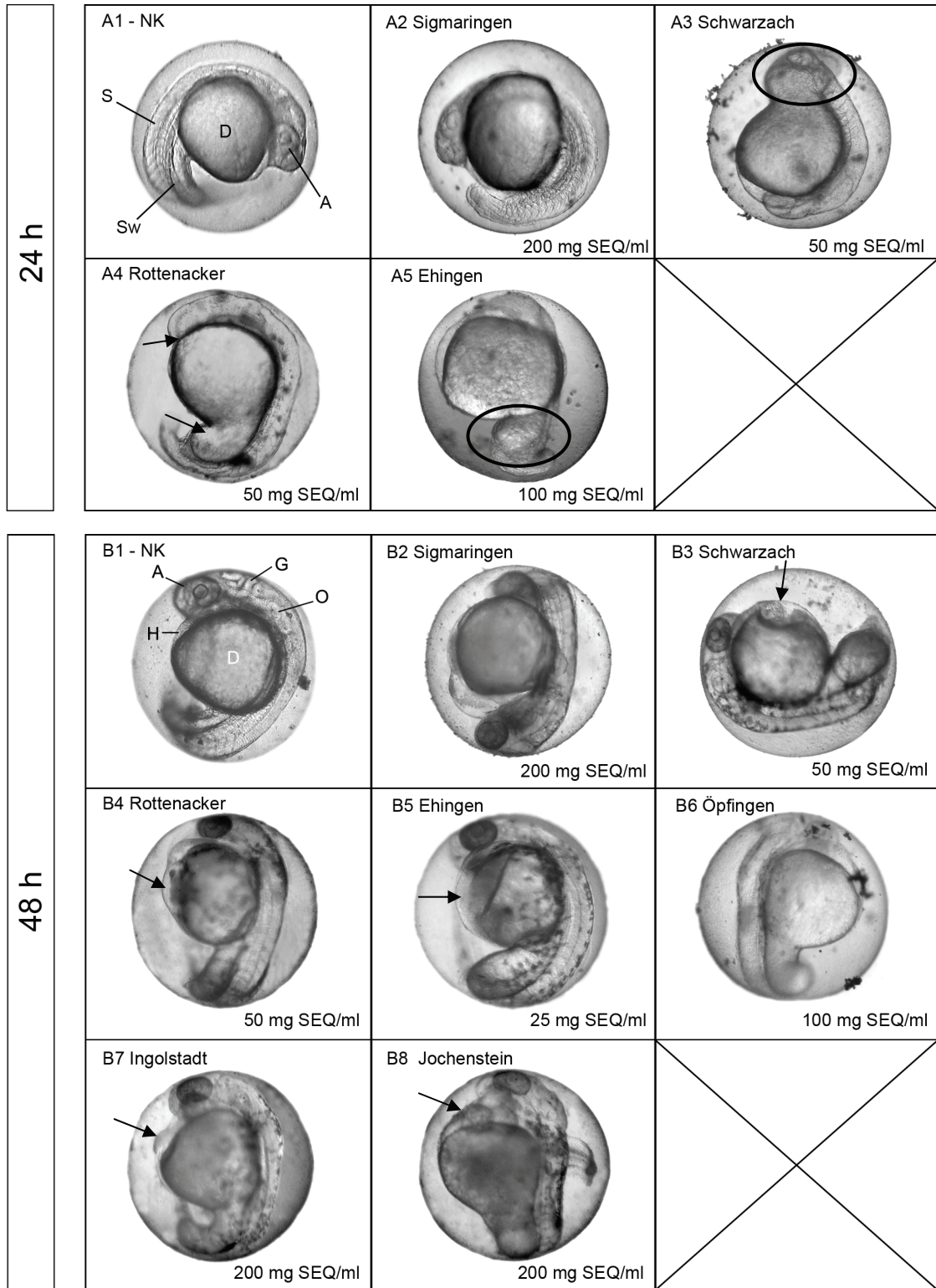
Bei einem DMSO-Gehalt von 2 und 4 % konnten erhebliche teratogene Effekte nachgewiesen werden. So wurde bei einem 4 %-igen DMSO Gehalt nach 24 h eine leichte Entwicklungsverzögerung und auffällige Zuckungen bei einigen Tieren beobachtet. Nach 48 h war bei 50 % aller Embryonen kein Herzschlag nachweisbar. Nach 72 und 96 h waren nahezu alle Embryonen abgestorben. Bei 2 % DMSO wurden teilweise leichtere Ödeme und eingeschränkte bzw. unkoordinierte Bewegungen beobachtet. Nach 120 h waren der Herzschlag und der Blutkreislauf zum Teil unregelmäßig. Aus diesen Untersuchungen konnte nach 48 h ein $EC_{50-DMSO}$ von 4 % ermittelt werden. In allen Tests mit Extrakten wurde daher darauf geachtet, dass ein DMSO-Gehalt von 1 % nicht überschritten wurde, dieser entspricht einer Höchstkonzentration 200 mg SEQ/ml (SEQ = Sedimentäquivalent).

3.5.2 Embryotoxizität der Sedimentextrakte

Die Extrakte hatten z.T. sehr erhebliche, aber auch sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung von *Danio rerio*. Im Folgenden soll deshalb die Wirkung der verschiedenen Proben etwas genauer beschrieben werden.

- **Sigmaringen:** Nach 24 h wurden lediglich in der höchsten Konzentration (200 mg SEQ/ml) schwache Effekte, wie z.B. kleinere Ödeme oder ein unvollständig abgelöster Schwanz

beobachtet (Abb. 3.13 A2). Auch nach 48 h wurde bei 200 mg SEQ/ml nur teilweise eine leichte Störung des Herzkreislaufsystems und Ödeme beobachtet (Abb. 3.13 B2). Nach 96 h waren bei 200 mg SEQ/ml nur 60 % der Tiere geschlüpft und nach insgesamt 168 h 35 % der Embryonen gestorben oder koaguliert. Die übrigen Larven wiesen eine Unterentwicklung, Ödeme und Missbildungen auf und zeigten keinen Blutkreislauf (Abb. 3.13 C2). Bei einer Konzentration von 100 mg SEQ/ml konnten teilweise Ödeme und ein fehlender Blutkreislauf beobachtet werden. Unterhalb dieser Konzentration waren keine negativen Effekte nachweisbar.



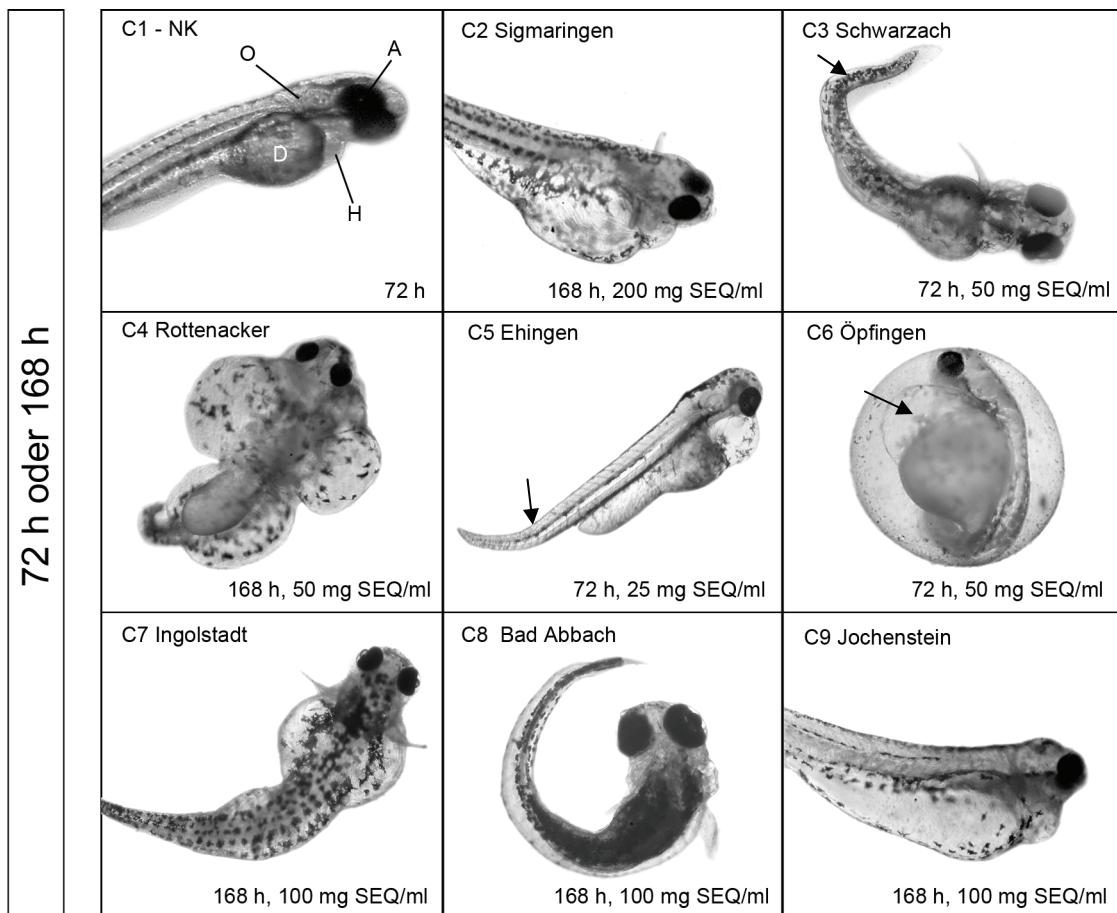


Abb. 3.13: Fischeitest mit Sedimentextrakten nach 24 h (A2 - A5), 48 h (B2 - B8) und nach 72 bzw. 168 h (C2 - C9) und entsprechende Negativkontrollen (NK; A1, B1 und C1) zum Vergleich: **A1** NK Schwanz (Sw) ist vom Dotter (D) gelöst, Somiten (S), Ohrplackode (O) und Augenanlage (A) sind deutlich zu erkennen. **A2** geringe Entwicklungsverzögerung. **A3** Schwanz nicht abgelöst und missgebildet, Hantelembryo. **A4** Schwanz nicht abgelöst, Augenanlage unterentwickelt. **A5** Hantelembryo mit Ödem. **B1** NK mit entwickeltem Gehirn, Blutkreislauf und Herz. **B2** perikardiales Ödem. **B3** Ringembryo mit kurzem und verdicktem Schwanz, Dottersacködem mit Blutansammlung. **B4** perikardiales und Dottersacködem. **B5** großes Dottersacködem. **B6** unterentwickelter Embryo, Pigmentierung, Herzschlag und Blutkreislauf fehlen. **B7** kleines Dottersacködem. **B8** unterentwickelter Embryo mit großem Dotter, ohne Herzschlag und Blutkreislauf. **C1** NK nach ca. 72 h erfolgt meist der Schlupf. **C2** missgebildeter Embryo nach 168 h mit aufgeblähtem Dottersack. **C3** Missbildung der Wirbelsäule nach 72 h. **C4** Erheblich missgebildete Larve mit extremen Ödemen. **C5** Geknickte Schwanzwirbelsäule und aufgeblähter Herzbereich. **C6** großes perikardiales Ödem. **C7** gebogene Wirbelsäule, Dottersack- und Schwanzödem. **C8** stark gebogene Wirbelsäule. **C9** Embryo mit sehr großem Dotter, Ödem und gebogener Wirbelsäule. Bilder aus Seitz (2005).

- **Lauchert und Riedlingen:** In den verwendeten Konzentrationen konnten weder letale noch subletale Effekte nachgewiesen werden.
- **Schwarzach:** In den beiden höchsten Konzentrationen (200 und 100 mg SEQ/ml) waren nach 24 h alle Eier koaguliert. Bei 50 und 25 mg SEQ/ml konnten nach 24 h teilweise Missbildungen und typische Ring- und Hantelembryonen sowie vereinzelt die unvollständige Ablösung des Schwanzes und nach 48 h auch Ödeme beobachtet werden (Abb. 3.13 A3, B3). Nach 72 h schlüpften die ersten Tiere, zeigten jedoch häufiger Ödeme und Missbildungen, wie z.B. Wirbelsäulendeformationen (Abb. 3.13 C3). In der weiteren Entwicklung kam es bei 50 mg SEQ/ml teilweise zum Ausfall des Herzschlags, die Embryonen waren unterentwickelt und wiesen vereinzelt eine starke Deformation der Wirbelsäule und des Dottersacks auf. Nach 168 h hatten

- nur 20 % der Larven überlebt, jedoch mit extremen Missbildungen. Bei 25 mg SEQ/ml kam es nur in Einzelfällen zu Wirbelsäulendeformationen.
- **Rottenacker:** In den beiden höchsten Konzentrationen waren aller Eier koaguliert. Bei 50 mg SEQ/ml war nach 24 h bei ca. 50 % der Embryonen der Schwanz nicht abgelöst oder deformiert (Abb. 3.13 A4). Nach 48 h Exposition konnte bei keinem Embryo ein Herzschlag oder Blutkreislauf nachgewiesen werden. Außerdem konnten sehr häufig Ödeme beobachtet werden (Abb. 3.13 B4). In der weiteren Entwicklung waren die meisten Larven erheblich deformiert und starben letztendlich ab (Abb. 3.13 C4). Bei einer Konzentration von 25 mg SEQ/ml wurden nach 24 h lediglich vereinzelt Ödeme beobachtet, bzw. nach 48 h ebenfalls Ödeme und Missbildungen der Wirbelsäule. Auffällig war jedoch, dass die Larven keine Schwimmbewegungen zeigten, aber mit den Brustflossen schlugen und zitterten. Dessen ungeachtet konnte nach den Kriterien von DIN 38415-T6 keine Mortalität festgestellt werden.
 - **Ehingen:** In den Konzentrationen von 200, 100 und 50 mg SEQ/ml waren nach 24 h alle und bei 25 mg SEQ/ml die Hälfte der Eier koaguliert. Die überlebenden Embryonen wiesen nach 48 h vor allem deutlich ausgeprägte perikardiale Ödeme auf (Abb. 3.13 B5). Nach 72 - 120 h wiesen sie dann häufig große Ödeme, Wirbelsäulenverkrümmungen und eine gedrungene Körperform auf. Nach weiteren zwei Tagen waren alle nicht koagulierten Larven so stark missgebildet, dass man ihnen unter natürlichen Bedingungen kaum eine Überlebensfähigkeit einräumen könnte. In niedrigeren Konzentrationen hingegen verlief die Entwicklung nahezu störungsfrei. Lediglich bei einer Konzentration von 12,5 mg SEQ/ml konnte bei 20 % der Larven eine gekrümmte Wirbelsäule beobachtet werden (Abb. 3.13 C5).
- Öpfingen:** Nach 24 h waren bei 200 mg SEQ/ml alle Eier koaguliert. In der nächst niedrigeren Konzentration betrug die Mortalitätsrate nach DIN-Kriterien 70 %. Nach 48 und 72 h stieg die Mortalitätsrate auf 85 %. Die Embryonen waren entweder koaguliert oder Herzschlag, Blutkreislauf und Pigmentierung fehlten (Abb. 3.13 B6). Bei 50 mg SEQ/ml waren nach 48 und 72 h häufiger Ödeme sowie eine reduzierte Schlupfrate zu beobachten (Abb. 3.13 C6). Nach 96 und 120 h lagen die geschlüpften Larven auf der Seite oder kreisten scheinbar orientierungslos umher. Sie wiesen vor allem perikardiale Ödeme und Wirbelsäulendeformationen auf. Nach einer Woche betrug dann die Mortalität 25 % und die übrigen Tiere schienen aufgrund ihrer starken Missbildungen kaum überlebensfähig. Bei 25 mg SEQ/ml zeigten einzelne Tiere ähnliche, wenn auch schwächere Effekte.
- **Ingolstadt:** Nach 24 h waren in der höchsten Konzentration fast alle Eier koaguliert oder der Schwanz war nicht abgelöst bzw. die Augenanlage und Somiten fehlten. Nach 48 h betrug die Mortalitätsrate in dieser Konzentration 90 % und steigerte sich bis zum Ende der Versuchsdauer auf 100 % (Abb. 3.13 B7). Bei 100 mg SEQ/ml war nach 24 h eine deutliche Unterentwicklung der Embryonen zu beobachten, außerdem kam es zu keinerlei Spontanbewegung. Am folgenden Tag waren einzelne Eier koaguliert, andere besaßen Ödeme, die meisten waren jedoch normal entwickelt. Nach 72 h war die Hälfte der Tiere bei 100 mg SEQ/ml geschlüpft, lagen aber nahezu unbeweglich am Grund und wiesen teilweise Ödeme und Missbildungen auf. Besonders die teils erheblichen Ödeme und Wirbelsäulendeformationen der Larven waren sehr auffällig, die sich im 168 h Stadium manifestierten (Abb. 3.13 C7). Bei 50 mg SEQ/ml waren lediglich einzelne Embryonen verendet. In den niedrigeren Konzentrationen zeigten alle Tiere eine normale Entwicklung.

- **Bad Abbach:** Auch hier waren in der höchsten Konzentration bereits nach 24 h alle Eier koaguliert. Bei 100 mg SEQ/ml betrug die Mortalität nach 24 h 45 % und bei einigen Tieren konnte eine leichte Entwicklungsverzögerung beobachtet werden. Nach 48 h waren in dieser Konzentration 30 % der Eier koaguliert, die Pigmentierung und Mobilität reduziert und der Herzschlag unregelmäßig. Ferner wurden Ödeme beobachtet. Nach 72 und 96 h war die Schlupfrate gering und in der weiteren Entwicklung koagulierten weitere Eier. Bei den übrigen Larven nahmen die Missbildungen deutlich zu (Abb. 3.13 C8). Außerdem verendeten einige Larven nach dem Schlupf. In den niederen Konzentrationen konnten keine Störungen beobachtet werden.
- **Jochenstein:** Diese Probe wies nach 24 h in der höchsten Konzentration eine Mortalitätsrate von 50 % und in den übrigen Eiern eine Entwicklungsverzögerung auf. Diese steigerte sich im weiteren Verlauf auf 75 %, wobei die Eier entweder koaguliert oder ein Herzschlag und Blutkreislauf im Embryo nicht nachzuweisen waren; der Schlupf erfolgte nicht (Abb. 3.13 B8). Bis zum Ende des Versuchs starben alle Larven ab. In 100 mg SEQ/ml wiesen die Embryonen nach 24 h eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Entwicklungsverzögerung auf, die jedoch nach 48 h nicht mehr zu erkennen war. Nach 96 h zeigten viele Larven in dieser Konzentration jedoch Missbildungen, Ödeme und einen stark vergrößerten Dottersack. 20 % der Tiere war nach 168 h verendet, die übrigen zeigten Entwicklungsverzögerungen und extreme Missbildungen (Abb. 3.13 C9). In den niedrigeren Konzentrationen waren keine Effekte erkennbar.

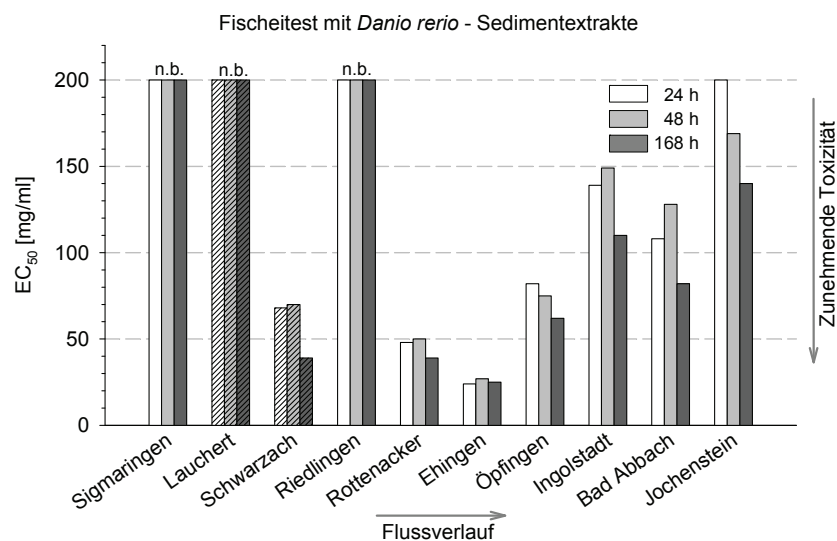


Abb. 3.14: EC_{50} -Werte der Sedimentextrakte der Donauproben nach DIN-Endpunkten (48 und 168 h) und Kriterien nach Hollert et al. 2003 (24 h) im Fischartest. Für die Standorte Sigmaringen, Lauchert und Riedlingen konnte aus dem Dosis-Wirkungsverlauf kein EC_{50} -Wert bestimmt werden. Die Toxizität dieser Proben lag oberhalb der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 mg SEQ/ml. Schraffierte Balken kennzeichnen die beiden Donauzuflüsse. Datengrundlage: Seitz (2005); n.b. = nicht bestimmbar (> 200 mg SEQ/ml); $n = 1$.

Durch die Ergebnisse der Beobachtungen konnten Dosis-Wirkungskurven nach 24, 48 und 168 h Exposition erstellt und sowohl nach DIN- als auch den erweiterten Kriterien (168 h) die EC_{50} -Werte bestimmt werden (Abb. 3.14 und 3.15). Die Dosis-Wirkungskurven sind detailliert in Seitz (2005) dargestellt. Für die Standorte Sigmaringen, Lauchert und Riedlingen war die Toxizität der Extrakte für die Erhebung eines EC_{50} -Werts zu gering. Eine sehr hohe embryotoxische Wirkung hingegen konnte für die folgenden Standorte ermittelt werden: Ehingen $>$ Rottenacker $>$ Schwarzach $>$ Öpfingen (Standorte nach der Toxizität sortiert). Für die bayrischen Probennahmestellen konnte nur eine

mittlere Toxizität festgestellt werden. Vergleicht man die EC_{50} -Werte der Sedimentextrakte nach DIN- und den erweiterten Kriterien im 168 h-Stadium, so zeigt sich, dass die Toxizität unter Berücksichtigung der erweiterten Kriterien stets höher war, auch wenn kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen ist (Abb. 3.15).

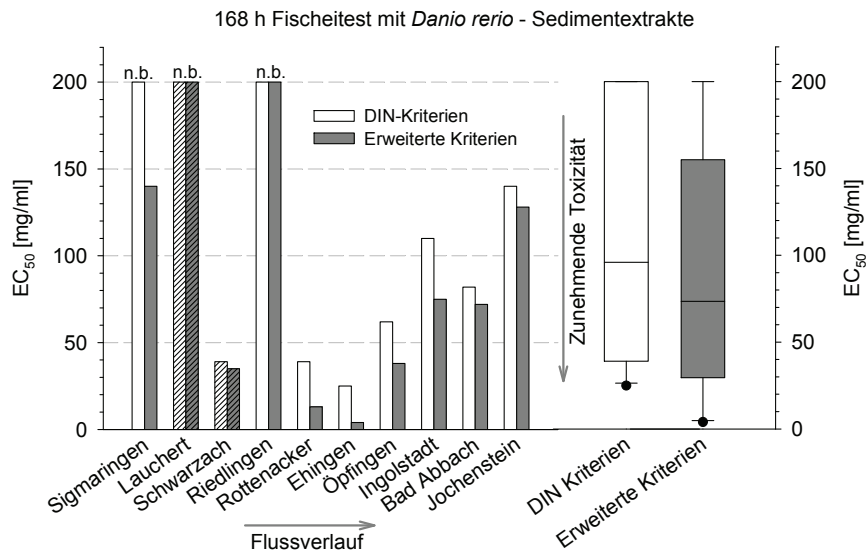


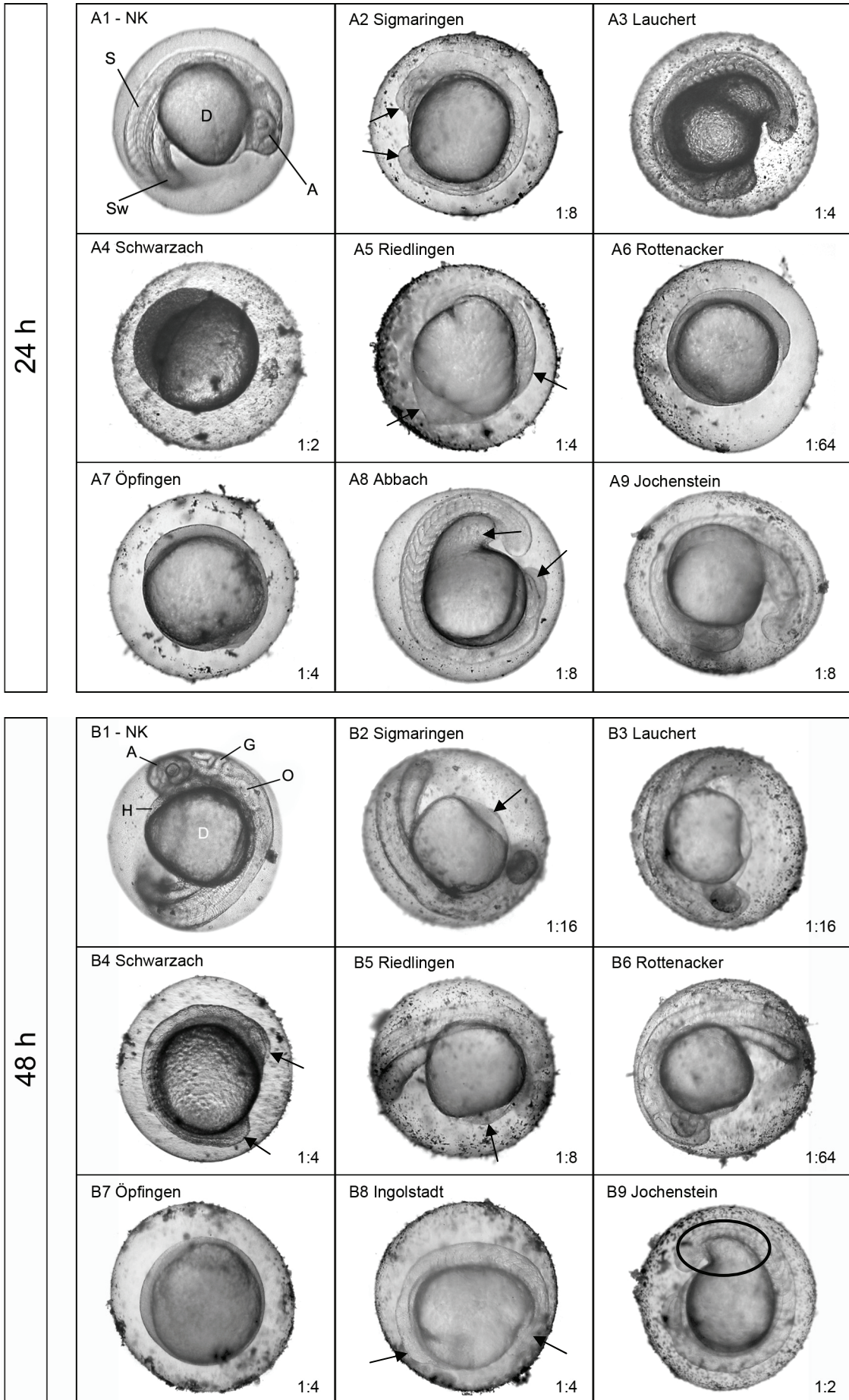
Abb. 3.15: EC_{50} -Werte der Sedimentextrakte der Donauproben nach 168 h, ermittelt nach DIN-Endpunkten und erweiterten Kriterien im Fischeitest. Für die Standorte Lauchert und Riedlingen konnte aus dem Dosis-Wirkungsverlauf kein EC_{50} -Wert bestimmt werden. Beim Extrakt aus Sigmaringen ließen die Kriterien nach DIN keine Bestimmung des EC_{50} -Wertes zu. Die Toxizität dieser Proben lag oberhalb der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 mg SEQ/ml. Schraffierte Balken kennzeichnen die beiden Donauzuflüsse. Die beiden Boxplots repräsentieren alle Daten aus dem linken Balkendiagramm. Bei Proben für die keine embryotoxische Wirkung festgestellt werden konnte, wurde ein Wert von 200 mg SEQ/ml angenommen. Datengrundlage: Seitz (2005); n.b. = nicht bestimmbar (> 200 mg SEQ/ml); n = 1.

3.5.3 Embryotoxizität der nativen Sedimentproben

Wie bereits bei den Sedimentextrakten wurden auch bei der Exposition mit nativen Sedimenten z.T. sehr erhebliche Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung von *Danio rerio* dokumentiert. Der am häufigsten beobachtete Effekt war eine deutliche Entwicklungsverzögerung und ein damit verspäteter Schlupf der Larven. Im Folgenden soll deshalb die Wirkung der nativen Proben auf Embryonen von *Danio rerio* genauer beschrieben werden.

- **Sigmaringen:** Im unverdünnten Sediment befanden sich nach 24 h alle Embryonen im Epiboliestadium und nach 48 h konnte bei vielen weder Herzschlag noch Blutkreislauf beobachtet werden (Abb. 3.16 A2 und B2). Nach 72 h fehlte bei vielen Tieren die Pigmentierung, der Kopf war unterentwickelt, Ödeme waren zu erkennen und nur wenige Tiere waren geschlüpft. Bis zum Ende des Versuchs (168 h) hatten aber alle Tiere diesen Entwicklungsrückstand aufgeholt, vereinzelt konnten jedoch extreme Wirbelsäulendeformationen beobachtet werden (Abb. 3.16 C2). Eine Entwicklungsverzögerung mit ähnlichen Symptomen wie beim unverdünnten Sediment, war auch bei einer 1:2 Verdünnung zu beobachten, die jedoch nach 96 h vollständig ausgeglichen schien. In den Verdünnungen 1:4 und 1:8 hatte sich nach 24 h bei vielen Embryonen der Schwanz nur unvollständig abgelöst; auch der Kopfbereich war unterentwickelt. Bereits am zweiten Tag waren in diesen Konzentrationen keine Unterschiede mehr zur Negativkontrolle zu erkennen. In den Verdünnungen 1:16 und 1:32 wurden keine Effekte beobachtet.

- **Lauchert:** Nach 24 h befanden sich viele der Eier in der 1:1 und 1:2-Verdünnung noch im Epiboliestadium. Häufig waren keine Somiten angelegt, der Schwanz war nicht abgelöst oder Kopf- und Augenanlagen waren unterentwickelt. Bereits am zweiten Tag waren diese Verzögerungen weitestgehend aufgeholt. Vielfach fehlte jedoch die Pigmentierung oder die Augen- und Kopfanlagen waren leicht unterentwickelt. Vereinzelt wurden kleine Ödeme oder eine schwach gebogene Wirbelsäule beobachtet. Bei den 1:4 und 1:8-Verdünnungen wurde die geringe Entwicklungsverzögerung des ersten Tages (Abb. 3.16 A3) bis zum zweiten Tag fast vollständig aufgeholt. Bei den übrigen Verdünnungsstufen konnten kaum nachteilige Effekte beobachtet werden (Abb. 3.16 B3 und C3). Besonders auffällig war bei dieser Sedimentprobe die hohe Mortalität in Verbindung mit einer deutlichen Unterentwicklung in höheren Konzentrationen am ersten Tag, die sich wesentlich schneller als bei allen anderen Sedimenten in der Folgezeit reduzierte.
- **Schwarzach:** In der niedrigsten Verdünnungsstufe (1:4) waren nach 24 h vereinzelt Eier koaguliert, bzw. hatten lediglich das Epiboliestadium erreicht (Abb. 3.16 A4 und B4). In der weiteren Entwicklung koagulierten bis zum dritten Tag nahezu alle verbliebenen Eier. Bei einer Verdünnung von 1:8 hatte sich nach 24 h bei keinem der Embryonen der Schwanz gelöst und bei einigen waren die Somiten nur unvollständig angelegt. Nach 72 h entsprach der Entwicklungsstand maximal dem nach 48 h üblichen. Nach 168 h waren nur 80 % der Larven geschlüpft, jedoch mit leichten Entwicklungsrückständen. Eine deutliche Entwicklungsverzögerung konnte auch noch bei einer Verdünnung von 1:16 sowohl nach 24 h als auch nach 48 h beobachtet werden. Dieser Rückstand wurde bis zum Versuchsende ausgeglichen. In der Verdünnungsstufe 1:32 verlief die Entwicklung ähnlich verzögert. Bei den höchsten Verdünnungen (1:64 und 1:128) hatte sich nach 24 h nicht bei allen Tieren der Schwanz abgelöst. Nach 48 h waren die Embryonen jedoch weitestgehend normal entwickelt.
- **Riedlingen:** In der unverdünnten Probe hatten nach 24 h die Embryonen lediglich das Epiboliestadium erreicht (Abb. 3.16 A5) und zeigten auch im weiteren Verlauf eine verzögerte Entwicklung. So war z.B. nach 48 h bei einigen Larven das Herzkreislaufsystem unterentwickelt und es fehlte die Pigmentierung (Abb. 3.16 B5). Die meisten Tiere schlüpften verzögert, waren deutlich kleiner, der Dotter war wenig zurückgebildet und sie wiesen perikardiale Ödeme auf (Abb. 3.16 C5). Einzelne Tiere verstarben. Auch in höheren Verdünnungsstufen zeigte sich eine ähnliche Entwicklung, wenn auch mit einer deutlich weniger ausgeprägten Verzögerung in der Embryonalentwicklung. Bei den Verdünnungen 1:16 und 1:32 konnten keine negativen Effekte nachgewiesen werden.
- **Rottenacker:** In den höchsten Konzentration (1:4 und 1:8) koagulierten alle Eier in den ersten Tagen. Bei einer 1:16-Verdünnung befanden sich alle Eier nach 24 h noch im Epiboliestadium, koagulierten jedoch meist in den nächsten beiden Tagen. Nach 96 h hatten nur wenigen Larven überlebt, befanden sich jedoch im 48 h-Stadium. Selbst bei einer 1:32-Verdünnung war noch eine deutliche Entwicklungsverzögerung zu beobachten, wobei sich die Tiere in den folgenden Tagen regenerierten und etwa ab dem fünften Tag schlüpften. Bei einer 1:64-Verdünnung war die Situation kaum verändert (Abb. 3.16 A6, B6 und C6). In der höchsten getesteten Verdünnung (1:128) hatte sich bei 40 % der Embryonen nach 24 h der Schwanz noch nicht vollständig vom Dotter gelöst. Bereits nach 48 h waren die Tiere jedoch normal entwickelt. Der Schlupf war leicht verspätet. Andere Effekte konnten nicht beobachtet werden.



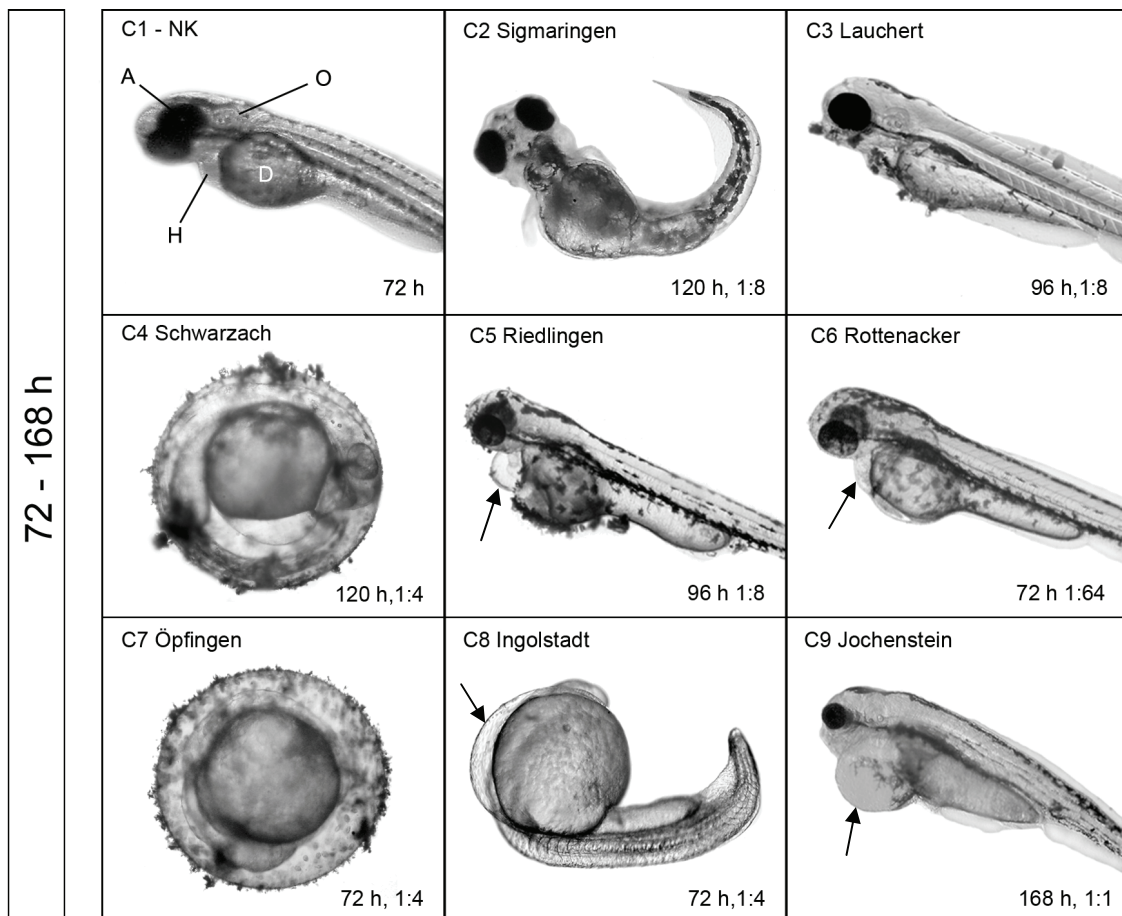


Abb. 3.16: Fischeitest mit nativen Sedimentproben nach 24 h (A2 - A9), 48 h (B2 - B9) und nach 72 bzw. 168 h (C2 - C9) sowie entsprechende Negativkontrollen (NK; A1, B1 und C1) zum Vergleich: **A1** NK Schwanz (Sw) ist vom Dotter (D) gelöst, Somiten (S), Ohrplackode (O) und Augenanlage (A) sind deutlich zu erkennen. **A2** Schwanz nicht abgelöst, Kopf- und Augenanlage unterentwickelt. **A3** Schwanz nicht abgelöst. **A4** lediglich Vielzellstadium. **A5** Schwanz nicht abgelöst, Kopf- und Augenanlage unterentwickelt. **A6, A7** Somiten, Kopf- und Augenanlage fehlen. **A8, A9** Schwanz nicht abgelöst, Kopf- und Augenanlage unterentwickelt. **B1** NK mit entwickeltem Gehirn, Blutkreislauf und Herz. **B2** kein Herzschlag, Dottersacködem. **B3** Dottersacködem. **B4** Somiten unvollständig ausgebildet, Schwanz nicht abgelöst, Kopf- und Augenanlage unterentwickelt. **B5, B6** Herzkreislaufsystem unvollständig ausgebildet, fehlende Pigmentierung, generell unterentwickelt. **B7** Epiboliestadium. **B8** Somiten, Kopf- und Augenanlage fehlen. **B9** Schwanz nicht abgelöst. **C1** NK, nach ca. 72 h erfolgt meist der Schlupf. **C2** Wirbelsäulenverkrümmung. **C3** Pigmentierung schwach ausgeprägt. **C4** unterentwickelter, nicht geschlüpfter Embryo. **C5, C6** aufgeblähtes Herz und Dottersacködem. **C7** extreme Entwicklungsverzögerung unterhalb des 24 h Stadium. **C8** kein Herzschlag und Blutkreislauf, fehlende Pigmentierung, generell unterentwickelt, Dottersacködem. **C9** stark aufgeblähter Herzbereich. Bilder aus Seitz (2005).

- **Ehingen:** Auch bei dieser Probe koagulierten alle Eier in den Verdünnungen 1:4 und 1:8 bereits nach den ersten Tagen. In der 1:16-Verdünnung befanden sich die meisten Embryonen nach 24 h erst in der Epibolie oder sogar in einem noch früheren Stadium. Nach 48 h konnten keine letalen Effekte, aber eine deutliche Unterentwicklung beobachtet werden. Selbst nach 168 h waren nur 75 % der Larven geschlüpft, diese waren jedoch wesentlich blasser, gedrungener und weniger mobil als die Negativkontrollen. Auch in der 1:32 und 1:64-Verdünnung waren zu Beginn deutliche Entwicklungsrückstände zu beobachten, die aber mit fortschreitender Zeit aufgeholt wurden. Bei der höchsten Verdünnung (1:128) waren zu keinem Zeitpunkt Missbildungen oder Entwicklungsverzögerungen erkennbar.

- **Öpfingen:** In der niedrigsten Verdünnung (1:4) befanden sich alle Eier nach 24 h im Epiboliestadium (Abb. 3.16 A7). Kein Embryo entwickelte sich über das 24 h-Stadium hinaus und alle Eier koagulierten innerhalb der ersten Woche (Abb. 3.16 B7 und C7). In den Verdünnungsstufen 1:8 und 1:16 hatte sich bei den Larven nach 24 h der Schwanz nicht abgelöst, Somiten waren nicht angelegt oder die Eier befanden sich in der Epibolie. Der Entwicklungsrückstand konnte jedoch weitestgehend ausgeglichen werden, auch wenn die Larven verspätet schlüpften und eine vergleichbar geringe Agilität aufwiesen. Auch in der 1:32-Verdünnung waren nach 24 h noch keine Somiten angelegt. Nach 48 h konnte noch eine deutliche Entwicklungsverzögerung beobachtet werden: die Kopfanlage war unterentwickelt, die Pigmentierung fehlte und bei manchen Embryonen war kein Herzkreislaufsystem zu erkennen. In der 1:64-Verdünnung war ebenfalls nach 24 h eine deutliche Unterentwicklung zu beobachten, die nach DIN-Kriterien eine 100 %-ige Mortalität zur Folge hatte. Allerdings konnten die Embryonen diesen Rückstand nach dem zweiten oder dritten Tag ausgleichen. Selbst in der 1:128-Verdünnung wurde nach 24 h eine leichte Entwicklungsverzögerung nachgewiesen, die sich aber nach kurzer Zeit ausglich.
- **Ingolstadt:** Nach 24 h befanden sich in der 1:2-Verdünnung alle Eier noch in der Epibolie. Auch nach 48 h verharrten einige Eier in diesem Stadium oder waren koaguliert. In den folgenden Tagen koagulierten dann nahezu alle Eier. Die verbliebenen Embryonen waren unterentwickelt, missgebildet und kaum überlebensfähig. In der 1:4-Verdünnung lagen nach 24 h ebenfalls nur Epiboliestadien vor und nach 48 h hatten sich die Embryonen kaum über das 24 h-Stadium entwickelt (Abb. 3.16 B8). Auch in den folgenden Tagen zeigte sich eine deutliche Verzögerung in der Entwicklung (Abb. 3.16 C8). Bei einer 1:8-Verdünnung hatte sich nach 24 h bei keinem Embryo der Schwanz abgelöst, was bei vielen Tieren auch am folgenden Tag noch nicht der Fall war. Einige Larven wiesen kein Herzkreislaufsystem auf oder zeigten eine geringe Entwicklungsverzögerung. Bis zum vierten Tag war jedoch der größte Teil der Larven normal entwickelt und geschlüpft. In der 1:16-Verdünnung war bei ca. 50 % der Embryonen nach 24 h der Schwanz nicht vollständig abgelöst. Nach 48 h unterschieden sich die Tiere lediglich durch eine reduzierte Pigmentierung von den Kontrolltieren. Bei Verdünnungen ab 1:32 waren keine embryotoxischen Effekte erkennbar.
- **Bad Abbach:** In der höchsten Konzentration (1:2) koagulierten die meisten Eier in den ersten Tagen. Vereinzelt waren Larven nach 168 h geschlüpft, aber aufgrund erheblicher Unterentwicklungen und Missbildungen kaum überlebensfähig. In der 1:4-Verdünnung war die Entwicklung ebenfalls verzögert aber es starben weniger Larven ab. Allerdings war auch nach einer Woche noch immer eine deutliche Unterentwicklung zu erkennen. Bei einer 1:8-Verdünnung hatte sich nach 24 h bei keinem Tier der Schwanz abgelöst (Abb. 3.16 A8), teilweise waren die Somiten unvollständig ausgebildet. Nach 48 h konnte bei einigen Tieren kein Blutkreislauf beobachtet werden. Nach 96 h waren die Tiere weitestgehend normal entwickelt, allerdings nur etwa 50 % geschlüpft. In der 1:16-Verdünnung waren nur noch leichte Entwicklungsverzögerungen und in den übrigen Testansätzen keine nachteiligen Effekte zu beobachten.
- **Jochenstein:** In den höchsten Konzentrationen (1:1 und 1:2) hatten sich alle Eier nicht über die Epibolie hinaus entwickelt und am zweiten Tag noch nicht das 24 h-Stadium erreicht (Abb. 3.16 B9). In den folgenden Tagen koagulierten viele Eier, andere Embryonen wiesen kein Herzkreislaufsystem auf oder zeigten eine geringfügige Unterentwicklung. Nur wenige Tiere schlüpften und wiesen Ödeme und Missbildungen der Wirbelsäule auf (Abb. 3.16 C9). In der 1:4-Verdünnung war nach 24 h bei keinem Tier der Schwanz abgelöst. Mit Verzögerung entwickelten die

Tiere dieser Verdünnungsstufe Pigmentierung und ein Blutgefäßsystem. Bei einer 1:8-Verdünnung waren nur nach 24 h geringe nachteilige Effekte zu beobachten (Abb. 3.16 A9), die sich aber bis zum zweiten Tag vollständig ausglich und man im Weitern von einer normalen Entwicklung ausgehen konnte. In den übrigen Verdünnungen konnten keine Effekte beobachtet werden.

Aufgrund der beobachteten Effekte konnte die Mortalität sowohl nach Kriterien der DIN 38415-T6 als auch aus den Dosis-Wirkungskurven die EC_{50} -Werte nach 24, 48 und 168 h ermittelt werden. Die Dosis-Wirkungskurven sind detailliert in Seitz (2005) dargestellt. Der ausführlich beschriebene Ausgleich der Entwicklungsverzögerung mit fortschreitender Versuchsdauer schlug sich auch in den EC_{50} -Werten nieder (Abb. 3.17). So konnte für die Standorte Sigmaringen, Lauchert und Riedlingen nach 24 h noch sehr einfach eine EC_{50} bestimmt werden, jedoch war dies nach 48 h nur noch für die Sedimentprobe aus Riedlingen möglich und nach 168 h für keine Probe. Für die Proben aus Schwarzach, Rottenacker, Ehingen und Öpfingen traf diese Beobachtung nicht zu. Hingegen konnte für die bayrischen Sedimentproben dieser Effekt der geringeren Toxizität mit verlängerter Versuchsdauer wieder – wenn auch in deutlich geringerer Ausprägung – dokumentiert werden. Aus den ermittelten EC_{50} ergab sich die höchste embryotoxische Wirkung für die Proben aus Rottenacker, Öpfingen, Ehingen und den Zufluss Schwarzach. Eine mittlere Toxizität wurde für die bayrischen Proben und eine vergleichsweise geringe bzw. nicht nachweisbare Embryotoxizität für die Standorte Sigmaringen, Lauchert und Riedlingen festgestellt.

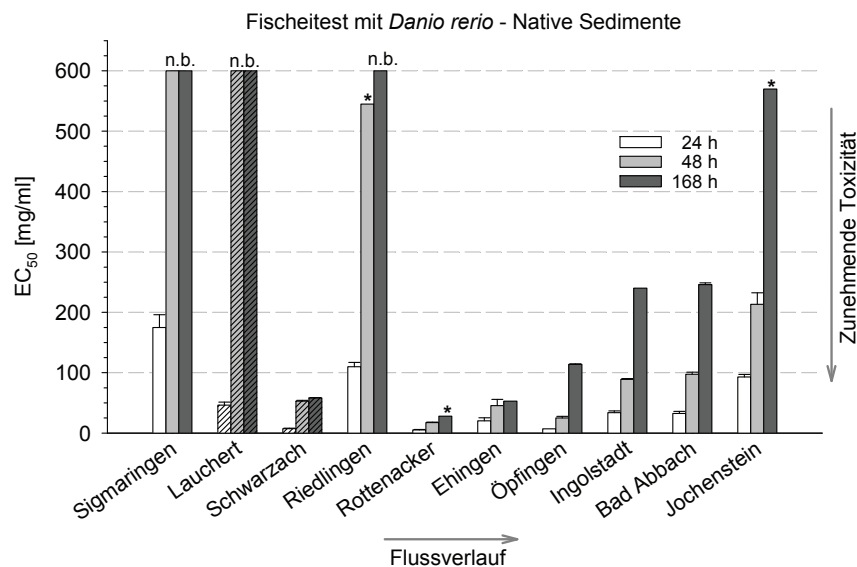


Abb. 3.17: EC_{50} -Werte der nativen Sedimentproben aus der Donau im Flussverlauf nach DIN-Endpunkten (48 und 168 h) und Kriterien nach Hollert et al. (2003; 24 h) im Fischartest mit *Danio rerio*. Bei Ergebnissen, die mit einem Stern markiert sind, konnte nur bei einer Messung der EC_{50} -Wert bestimmt werden. Schraffierte Balken kennzeichnen die beiden Donauzuflüsse. Datengrundlage: Seitz (2005); n.b. = nicht bestimmbar bzw. Toxizität über 600 mg/ml; n = 2.

Um subletale Effekte besser erfassen zu können, wurden alle Proben auch mit den erweiterten Kriterien (vgl. Tabelle 2.6) nach 168 h bewertet und in Abbildung 3.18 den Ergebnissen, die nach den DIN-Endpunkten bestimmt wurden, gegenübergestellt. Im Gegensatz zu den Sedimentextrakten führten die erweiterten Kriterien mit Ausnahme des Standortes Jochenstein nur zu geringfügig anderen EC_{50} -Werten. Durch die Darstellung aller Ergebnisse als Boxplots wird dies noch deutlicher (Abb. 3.18), wobei für die Erstellung der Boxplots bei Proben mit nicht bestimmbarer Toxizität eine Konzentration von 600 mg/ml angenommen wurde.

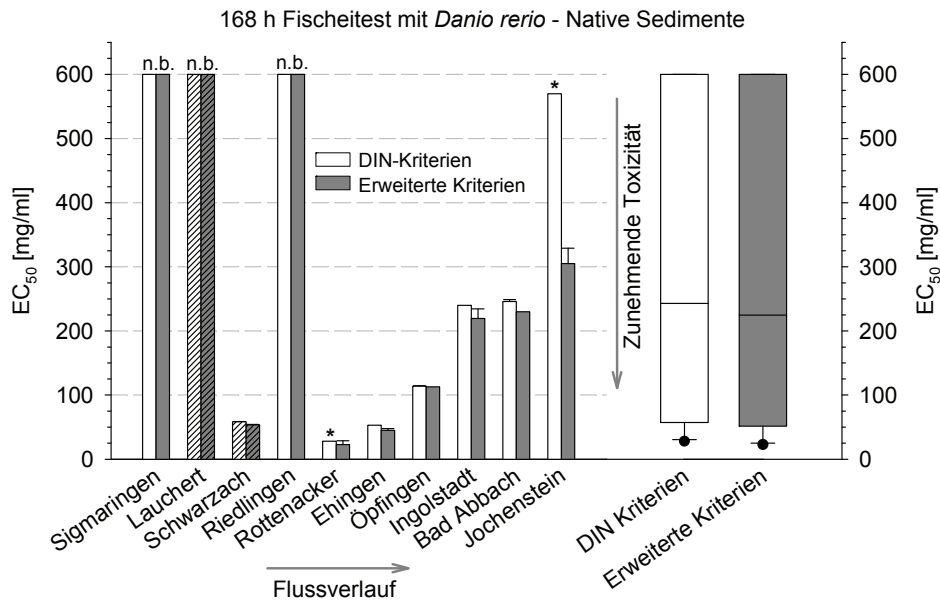


Abb. 3.18: EC₅₀-Werte der nativen Sedimentproben aus der Donau im Flussverlauf nach 168 h, ermittelt nach DIN-Endpunkten und erweiterten Kriterien im Fischeitest mit *Danio rerio*. Für die Standorte Sigmaringen, Lauchert und Riedlingen konnte aus dem Dosis-Wirkungsverlauf kein EC₅₀-Wert bestimmt werden. Die Toxizität dieser Proben lag oberhalb der höchsten eingesetzten Konzentration von 600 mg/ml. Schraffierte Balken kennzeichnen die beiden Donauzuflüsse. Die beiden Boxplots repräsentieren alle Daten aus dem linken Balkendiagramm. Datengrundlage: Seitz et al. (2007); n.b. = nicht bestimmbar.

3.5.4 Sauerstoffzehrung im Fischeitest mit nativen Sedimenten

Der Sauerstoffgehalt im Wasser ist eine kritische Größe in der Entwicklung von *Danio rerio*. Sinkt der Sauerstoffgehalt unter den für die Larven kritischen Wert von 2 mg/L (Braunbeck et al. 2002, 2005, Hollert et al. 2003), kann eine embryotoxische Wirkung aufgrund von Hypoxie nicht ausgeschlossen werden. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Hypoxie zu einer Entwicklungsverzögerung bei *Danio rerio* führt (Bagatto 2005, Barrionuevo & Burggren 1999, Padilla & Roth 2001). Deshalb wurde im Fischeitest mit nativen Sedimenten in einem Kontrollansatz über fünf Tage 24-stündig der O₂-Gehalt gemessen. Des Weiteren wurde am letzten Tag der Untersuchung die O₂-Konzentration in den Proben aus dem Fischeitest gemessen. Der Ausgangswert im Kunstwasser betrug zwischen 8 und 8,6 mg O₂/L. Die kritische Grenze von 2 mg/L wurde in keiner der Proben unterschritten. Für die Sedimente der Schwarzach und aus Ehingen konnte ein O₂-Gehalt von knapp über 4 mg O₂/L, für Öpfingen, Ingolstadt, Bad Abbach und Jochenstein zwischen 4,5 und 5 mg O₂/L und für die übrigen Proben über 5 mg O₂/L gemessen werden (stets für den höchsten Sedimentgehalt). Durch diese Ergebnisse kann daher eine Embryotoxizität durch Hypoxie für fast alle Standorte ausgeschlossen werden. Lediglich das Sediment aus Rottenacker wies eine hohe Sauerstoffzehrung auf, und bereits nach 24 h betrug der O₂-Gehalt 2,4 mg O₂/L. Dahingegen bleibt zu bemerken, dass eine Entwicklungsverzögerung auch noch in der 1:64-Verdünnungsstufe beobachtet wurde (5,8 mg O₂/L), weshalb man davon ausgehen muss, dass bestimmte Schadstoffe im Sediment vorhanden sind, die einen entwicklungsverzögernden Effekt verursachen. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass selbst im Fischeitest mit acetonischen Extrakten ebenfalls – wenn auch nur vereinzelt – eine Verzögerung der Entwicklung beobachtet werden konnte.

3.5.5 Vergleich der beiden Expositionspfade (natives Sediment vs. acetonisches Extrakt)

Die Sedimentextrakte verursachten sehr unterschiedliche embryotoxische Effekte im Fischeitest mit *Danio rerio*. So konnten keinerlei letale oder subletale Effekte für die Proben aus Sigmaringen, der Lauchert und Riedlingen, eine mittlere Toxizität für die bayrischen Standorte und eine sehr hohe embryotoxische Wirkung für die Proben aus der Schwarzach, Rottenacker, Ehingen und Öpfingen festgestellt werden. Eine sehr ähnliche Gruppierung der Standorte ergab sich durch die Toxizität der nativen Sedimentproben. Mit dem Unterschied, dass die Embryotoxizität zwischen dem ersten, zweiten und siebten Tag bei den nativen Proben deutlich zurückging, was sich auch in den Medianen der Boxplots widerspiegelt (24 h 33 mg/ml, 48 h 93,3 mg/ml, 168 h 243 mg/ml), die aus allen gemessenen EC_{50} -Werten gebildet wurden (Abb. 3.19).

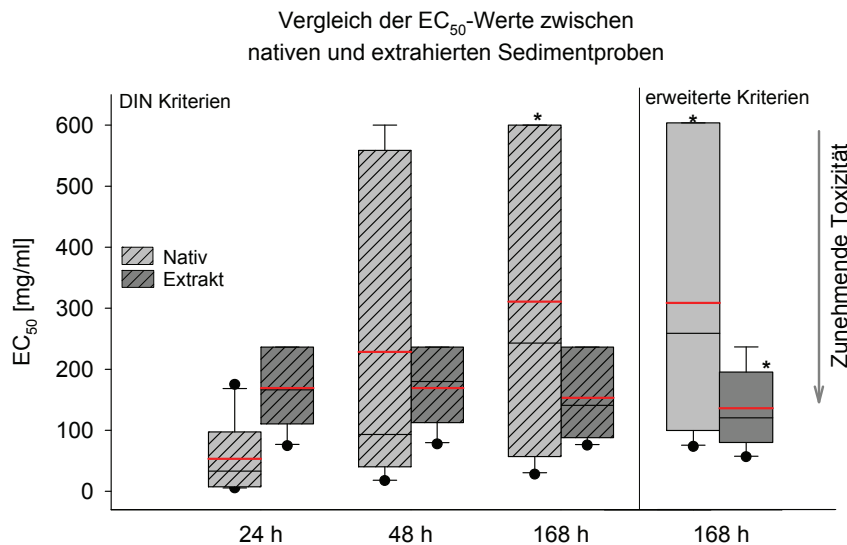


Abb. 3.19: Vergleich der EC_{50} -Werte der Extrakte und der nativen Proben aus der Donau nach 24, 48 und 168 h, ermittelt sowohl nach erweiterten als auch nach DIN-Kriterien im Fischeitest. Dargestellt sind die Daten als Boxplots mit dem Median (schwarze Linie) und dem Mittelwert (rote Linie) aus je 10 Werten. Die mit einem Stern gekennzeichneten Boxen unterscheiden sich signifikant von den entsprechenden Ergebnissen nach 24 h (einfaktorielle nichtparametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunn's bzw. Tukey Test, $p < 0,05$). Datengrundlage: Seitz (2005).

Grund hierfür war meist die beobachtete Entwicklungsverzögerung, welche vor allem am ersten Tag zu einer erhöhten Mortalitätsrate bei den Embryonen führte. Da sich jedoch nach 48 bzw. 168 h die Embryonen sehr oft der Normalentwicklung angeglichen hatten, ging folglich auch die Mortalität zurück. Die Darstellung der Ergebnisse aus dem Fischeitest mit acetonischen Extrakten als Boxplots hingegen ergab nur eine geringfügige Änderung der Toxizität über die Zeit. Dies hängt damit zusammen, dass in diesem Ansatz kaum Entwicklungsverzögerungen beobachtet wurden, sondern dass sehr häufig bereits nach kurzer Zeit die Eier koaguliert waren. Jedoch ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen 24 h und 168 h Exposition, wenn in der Bewertung der Embryotoxizität die erweiterten Kriterien berücksichtigt werden.

Trotz der unterschiedlichen Effekte, die durch die acetonischen Extrakte und nativen Proben verursacht wurden, konnte durch Regressions- und Korrelationsanalysen eine hohe bis sehr hohe Kongruenz zwischen den beiden Expositionspfaden nach 24, 48 und 168 h festgestellt werden (Abb. 3.20). Demnach ergibt sich eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen nach 24 h mit $r_p = 0,78$ und eine sehr hohe Korrelationen nach 48 und 168 h mit $r_s = 0,92$ und $r_p = 0,97$ (r_p = Pearson Korrelationskoeffizient; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient). Diese sehr hohe Korrelation weist auf

verschiedene embryotoxische Schadstoffe hin, die sowohl leicht bioverfügbar aber auch fester an das Sediment gebunden sind und somit eine chronische Belastung für aquatische Organismen darstellen. Des Weiteren ist es durch diesen Vergleich möglich, verschiedene Hotspots bezüglich embryotoxischer Effekte an der Donau auszumachen. Zur besseren Einstufung der verschiedenen Standorte nach ihrer Toxizität wurde ein Ranking für alle Bewertungszeitpunkte sowohl für die nativen als auch extrahierten Proben durchgeführt (Tab. 3.10), das sich wie folgt zusammenfassen lässt:

- **Native Proben:** Rottenacker > Öpfingen > Ehingen > Schwarzach > Ingolstadt > Bad Abbach > Jochenstein > Lauchert > Riedlingen > Sigmaringen
- **Extrakte:** Ehingen > Rottenacker > Schwarzach > Öpfingen > Bad Abbach > Ingolstadt > Jochenstein > Lauchert \cong Riedlingen \cong Sigmaringen
- **Gesamt:** Rottenacker > Ehingen > Schwarzach > Öpfingen > Bad Abbach > Ingolstadt > Jochenstein > Lauchert > Riedlingen > Sigmaringen

Tab. 3.10: Ranking der Sedimentextrakte und der nativen Proben im Fischeitest mit *Danio rerio* nach 24, 48 und 186 h Exposition. Datengrundlage: Seitz (2005).

	24 h		48 h		168 h		Durchschnitt		Gesamt
	Nativ	Extrakt	Nativ	Extrakt	Nativ	Extrakt	Nativ	Extrakt	
Sigmaringen	10	7	9	8	8	8	9,0	7,7	8,3
Lauchert	7	7	9	8	8	8	8,0	7,7	7,8
Schwarzach	3	3	4	3	3	3	3,3	3,0	3,2
Riedlingen	9	7	8	8	8	8	8,3	7,7	8,0
Rottenacker	1	2	1	2	1	2	1,0	2,0	1,5
Ehingen	4	1	3	1	2	1	3,0	1,0	2,0
Öpfingen	2	4	2	4	4	4	2,7	4,0	3,3
Ingolstadt	6	6	5	6	5	6	5,3	6,0	5,7
Bad Abbach	5	5	6	5	6	5	5,7	5,0	5,3
Jochenstein	8	7	7	7	7	7	7,3	7,0	7,2

Ein Vorteil des Fischeitests besteht darin, dass er nicht nur mit wässrigen Umweltproben, sondern auch mit nativen Sedimenten und Sedimentextrakten durchgeführt werden kann (Hollert et al. 2003), um so der Rolle der Sedimente als Schadstoffsinken besonders für schwer lösliche, lipophile Substanzen gerecht zu werden (Ahlf et al. 2002, Chapman et al. 1992). Der Fischeitest mit Extrakten ist einfach und schnell durchzuführen bzw. auszuwerten. Es ist jedoch fraglich, ob in einer 48-stündigen Belastungszeit, wie angestrebt, tatsächlich eine langfristige Exposition gegenüber den potentiell verfügbaren Schadstoffen mit hinreichender Verlässlichkeit simuliert werden kann. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen außerdem, dass bei einer Auswertung nach DIN-Endpunkten nach 48 h das Schädigungspotential nicht ausreichend eingeschätzt werden kann. Vor allem dadurch, dass sich die Embryotoxizität durch Sedimentextrakte, wenn auch nur geringfügig, über den Schlupf hinaus bis nach 168 h erhöhte, bzw. bei nativen Sedimenten abnahm (Abb. 3.19).

Im Fischeitest mit nativen Sedimenten wird hingegen versucht, das bioverfügbare Schädigungspotential der Proben zu erfassen, um eine weitgehende Übertragbarkeit auf die Situation im Freiland zu gewährleisten. Vor allem die Analyse möglicher embryotoxischer Effekte der nativen Sedimente auf Fische besaß vor dem Hintergrund des dokumentierten Fischrückgangs in der Donau eine große ökologische Relevanz, da die Embryotoxizität enorme Auswirkungen auf die Populationsdynamik haben kann (Wright & Tillitt 1999). Bei der eindeutigen Entwicklungsverzögerung, welche im Test mit nativen Sedimenten beobachtet wurde, handelte es sich stets um eine Verzögerung gegenüber der

Normalentwicklung der Kontrolltiere in Kunstwasser bzw. auf Quarzmehl. Hier bleibt zu überlegen, wie entscheidend entwicklungsverzögernde Effekte in den niedrigeren Konzentrationen nach den DIN-Endpunkten zur Bewertung der Embryotoxizität von nativen Sedimenten sind. Sicherlich sind die Endpunkte nach DIN für den Vergleich verschiedener Proben bezüglich ihrer Embryotoxizität geeignet. Ein Vergleich mit den natürlichen Gegebenheiten ist jedoch schwierig.

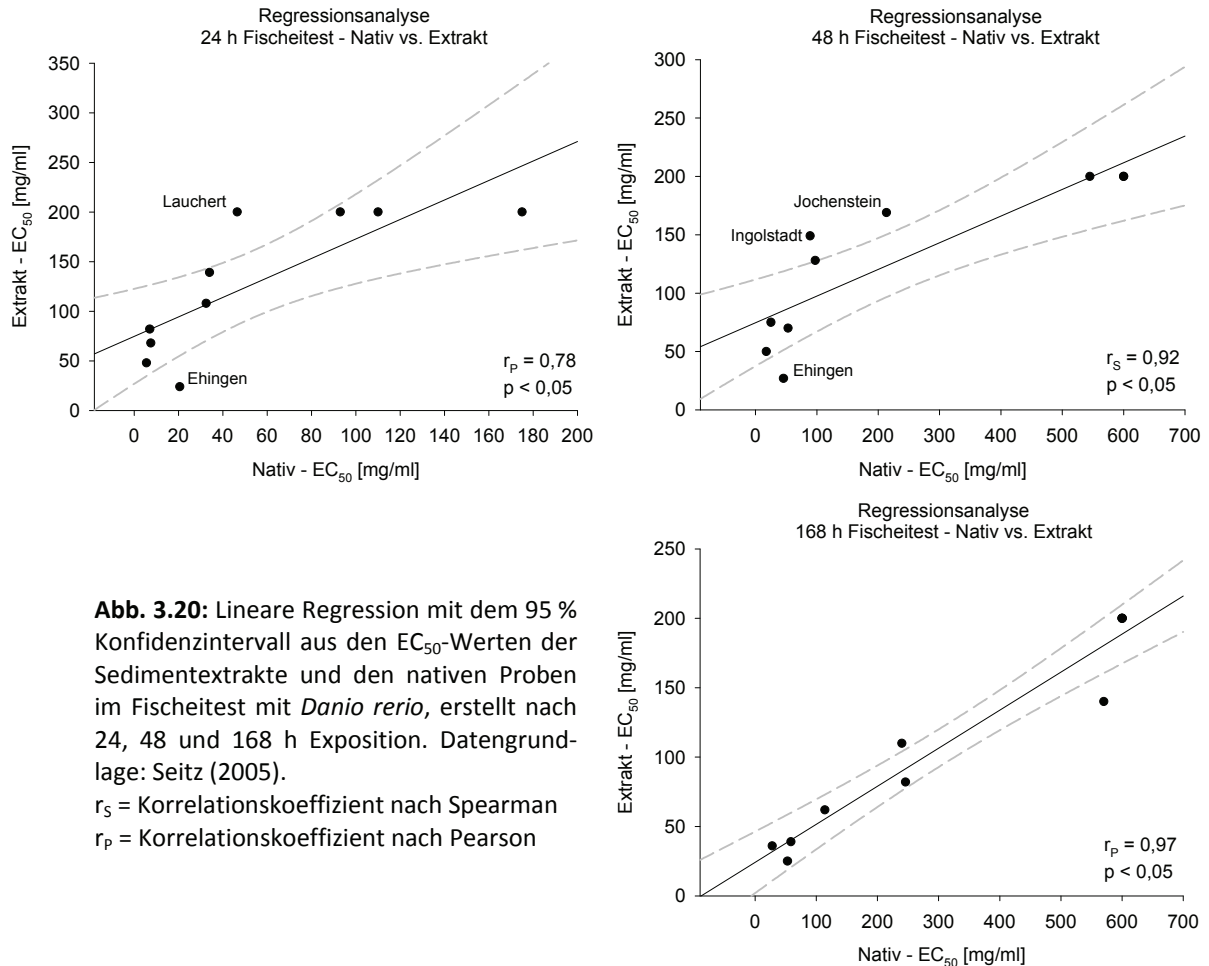


Abb. 3.20: Lineare Regression mit dem 95 % Konfidenzintervall aus den EC₅₀-Werten der Sedimentextrakte und den nativen Proben im Fischeitest mit *Danio rerio*, erstellt nach 24, 48 und 168 h Exposition. Datengrundlage: Seitz (2005).
 r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman
 r_p = Korrelationskoeffizient nach Pearson

3.5.6 Korrelation zwischen chemischer Analyse und Embryotoxizität

Der Fischeitest mit 48 h alten Embryonen von *Danio rerio* ist ein nach DIN 38415-T6 standardisierter Test zur Abwasserprüfung und wurde auch zur Normierung durch die ISO eingereicht (Braunbeck et al. 2005). Er stellt eine Alternative zum methodisch und ethisch umstrittenen akuten Fischtest dar (Braunbeck et al. 2002, Nagel 2002). Nach Braunbeck et al. (2005) besteht eine verlässliche Korrelation zwischen Fischembryo- und akutem Fischtest. In den meisten Fällen reagiert der Fischeitest ähnlich sensitiv auf eine Schadstoffexposition wie der Fischtest (Lange et al. 1995, Nagel 2002). Die frühen Embryogenese- und Larvalstadien sind gegenüber chemischen Noxen sogar besonders empfindlich (McKim 1977) und für zahlreiche Substanzen ist bekannt, dass sie ihre toxische oder teratogene Phase nur zu einem sensiblen Zeitpunkt während der frühen Organentwicklung des Fischembryos entfalten (Nagel & Isberner 1998). Auch PAHs verursachen in frühen Stadien von *Danio rerio* unterschiedliche embryotoxische Effekte, wie z.B. Störung der Herzfunktion, craniofaciale Fehlbildungen, Ödeme am Perikard und Dottersack sowie ein reduziertes Wachstum und eine generell erhöhte Mortalitätsrate (Antkiewicz et al. 2006, Billard et al. 2006). Incardona et al. (2004) konnten zeigen, dass beispielsweise 3-Ring PAHs, wie Phenanthren direkten Einfluss auf die

Erregungsleitung des Herzens nehmen, was wiederum sekundäre Konsequenzen auf die weitere Entwicklung des Herzens, der Nieren und auch des Neuralrohrs hat. In der gleichen Studie wurde nachgewiesen, dass Pyren, ein 4-Ring PAH, unter anderem Anämie und neuronalen Zelltod verursacht. Früheren Hypothesen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Cytochrom P450 (CYP1A) durch Dioxine bzw. Dioxin-ähnlich wirkende Substanzen wie PAHs und den oben beschriebenen Effekten gibt, widerspricht eine Arbeit von Carney et al. (2004). In dieser Studie wurde die Induktion von CYP1A inhibiert, und dennoch konnten die gleichen bekannten Effekte von TCDD beobachtet werden. Zu einem gleichen Ergebnis kamen auch Antkiewicz et al. (2006), jedoch konnte in deren Arbeit gezeigt werden, dass durch die Inhibition der Expression von zfAhR2* und zfARNT1 Störungen im Herz (z.B. Ödeme und Reduktion der Herzmuskelzellen) nicht mehr auftreten, wenn die Larven von *Danio rerio* mit TCDD belastet werden. Carney et al. (2004, 2006) kamen daher zu dem Schluss, dass andere Prozesse und genetische Regulationsmechanismen (als der Phase I Reaktionsmechanismus von CYP1A) in *Danio rerio* nachteilig durch AhR-Agonisten (PAHs, PCBs und PCDD/Fs) beeinflusst werden.

Dessen ungeachtet konnte durch eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen den eigenen Ergebnissen aus der chemischen Analyse (Phenanthren, Pyren und Summe der 16 EPA-PAHs) und dem Fischeitest mit Extrakten sowie nativen Sedimentproben eine mittlere bis hohe Korrelation festgestellt werden (Tab. 3.11). Deshalb kann ein Zusammenhang zwischen PAH-Belastung und embryotoxischer Wirkung nicht prinzipiell ausgeschlossen werden.

Tab. 3.11 Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen Ergebnissen der PAH-Analyse und dem Fischeitest mit nativen und extrahierten Proben. Angeben ist der Korrelationskoeffizient r_s . $n = 9$

	Phenanthren	Pyren	16 EPA-PAHs
1/EC ₅₀ Nativ	0,67	0,68	0,68
1/EC ₅₀ Extrakt	0,74	0,73	0,73

3.5.7 Vergleich der Donau mit anderen Flusssystemen

Um die eigenen Resultate nach 48 h Exposition besser einordnen zu können, wurden sie mit verschiedenen Boden- und Sedimentproben aus dem Rheineinzugsgebiet verglichen (Abb. 3.21; Daten Iffezheim aus Ulrich et al. 2002; Daten Ober- und Hochrhein aus König 2002). Dabei erzielten die Sedimentextrakte der Donau eine signifikant niedrigere embryotoxische Belastung als die Proben vom Rhein (einfaktorielle nichtparametrische Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Test, $p < 0,05$). Hierbei wird jedoch die Tatsache vernachlässigt, dass die Extrakte der Donauproben besonders unter Berücksichtigung der erweiterten Kriterien nach 168 h einen signifikanten Anstieg der Mortalität bzw. der Embryotoxizität verzeichnen (vgl. Boxplots in Abb. 3.19). Beim Vergleich der nativen Proben weisen die Donauproben ein ähnlich hohes bzw. höheres embryotoxisches Potential auf als die Proben aus dem Rhein. Hierbei ist auffällig, dass im Gegensatz zu den Rheinproben die nativen Sedimente aus der Donau über eine deutlich höhere toxische Wirkung verfügen als die entsprechenden Extrakte. Dies legt wiederum den Schluss nahe, dass die Donau eher mit leicht bioverfügbaren Substanzen belastet ist (vgl. Cytotoxizitätstest, Abs. 3.4.3).

* Im Zebraabrling (*Danio rerio*) existieren zwei divergente Ah-Rezeptoren. AhR2 hat eine hohe Affinität zu Dioxinen und vermittelt die Reaktion der Zellen gegenüber diesen Substanzen. AhR1 bindet nicht an TCDD und weist auch keine transkriptionelle Aktivität auf (Andreasen et al. 2002).

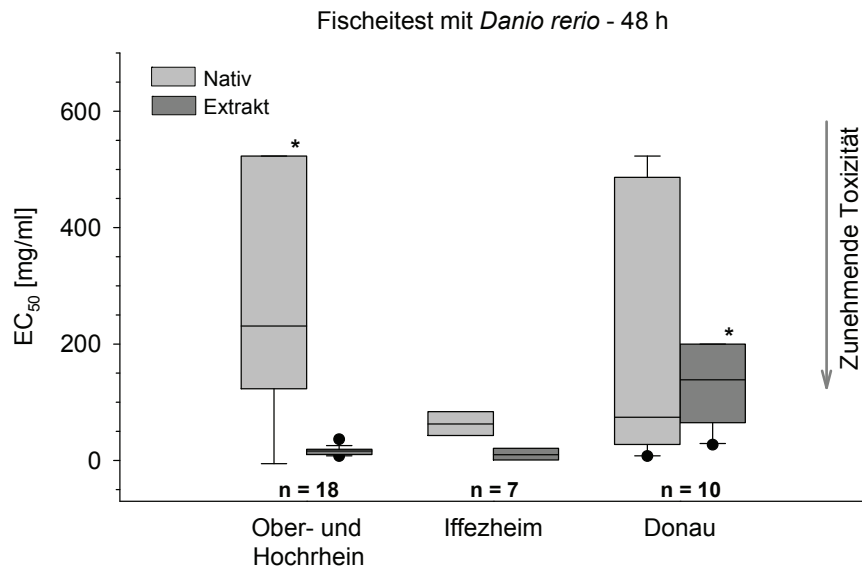


Abb. 3.21: Vergleich der im Fischeitest mit *Danio rerio* ermittelten EC₅₀-Werte nach 48 h sowohl zwischen nativen als auch extrahierten Proben aus dem Rheineinzugsgebiet (Ober- und Hochrhein, König 2002; Iffezheim, Ulrich et al. 2002) und der Donau (Seitz et al. 2007). Mit einem Stern gekennzeichnete Proben sind signifikant unterschiedlich (einfaktorielle nichtparametrische Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Test, $p < 0,05$) gegenüber den Proben aus Iffezheim.

3.6 Dioxin-ähnliche Wirksamkeit

Zusammenfassung: In dieser Teilstudie sollte untersucht werden, ob und in welcher Höhe eine Dioxin-ähnliche Aktivität mit den Sedimenten aus der Donau in Verbindung gebracht werden kann. Hierfür wurden sowohl bioanalytische Verfahren (GPC.2D-, DR-CALUX- und EROD-Assay) als auch eine chemische Analyse von PAHs, PCBs und PCDD/Fs verwendet.

Nahezu alle getesteten Sedimentextrakte wiesen ein hohes AhR-induzierendes Potential auf, wobei eine hohe Korrelation lediglich zwischen dem DR-CALUX und dem EROD-Assay festgestellt werden konnte. Der GPC.2D-Assay verfügte über eine signifikant niedrigere AhR-vermittelte Induktion. Die unterschiedliche Sensitivität der *In vitro*-Testsysteme ist vermutlich auf selektive Inhibitionsmechanismen, verschiedene Expositionszeiten und spezies- bzw. zellspezifische Unterschiede, aber auch auf unbekannte Schadstoffe zurückzuführen.

In der chemische Analyse wurden sehr hohe PAH-Konzentrationen, aber deutlich geringere Mengen an POPs gemessen. Durch den Vergleich der Chem-TEQs mit den Bio-TEQs (TCDD-Äquivalenzkonzentrationen der analysierten Substanzen bzw. der gemessenen Induktion im bioanalytischen Verfahren) konnten aber lediglich 3 bis maximal 50 % des Effekts in den Biotests den chemisch analysierten, prioritären Schadstoffen zugeordnet werden. Es ist daher davon auszugehen, dass noch nicht identifizierte nicht-prioritäre Schadstoffe in den Sedimentextrakten vorhanden sind, die über AhR-vermittelte Aktivität verfügen.

Aufgrund der hohen Dioxin-ähnlichen Aktivität, aber auch der hohen PAH-Konzentrationen, die in dieser Studie festgestellt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Fischrückgang in der Donau evtl. durch die Kontamination mit chemischen Schadstoffen verursacht wurde.

In dieser Studie wurde die Dioxin-ähnliche Wirksamkeit von acetonischen Sedimentextrakten sowie deren Multilayer-Fractionen mit Hilfe von drei verschiedenen *In vitro*-Biotestverfahren gemessen: EROD- (RTL-W1-Zellen), DR-CALUX- (H4IIE-Zellen) und GPC.2D-Assay (GPC.2D.Luc-Zellen). Die Dioxin-ähnliche Aktivität von Schadstoffen wie PAHs, PCBs und PCDD/Fs wird meist über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt. Der AhR ist ein cytosolischer Rezeptor, der nach der Bindung mit seinem Liganden in den Zellkern transportiert wird und dort unter Vermittlung des ARNT (AhR-Nuclear-Translocator) mit hoher Spezifität an das Dioxin-Responsive-Element (DRE) bindet. Die drei verwendeten Testsysteme unterscheiden sich maßgeblich in diesen Strukturen (vgl. Tab. 1.4).

3.6.1 Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der verschiedenen Proben

Sedimentextrakte: Die drei in dieser Studie eingesetzten Zelllinien wiesen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den acetonischen Sedimentextrakten der Donau auf. Jedoch konnte für jedes Extrakt in allen drei Testverfahren ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Dioxin-ähnlichen Aktivität festgestellt werden. Die dabei erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven variierten in Form und der maximalen Induktion, wiesen aber in der Regel einen sigmoidalen Verlauf auf. Nur vereinzelt zeigten die Proben in höheren Konzentrationen einen cytotoxischen Effekt, der die Dioxin-ähnliche Wirkung maskierte.

Die niedrigsten Induktionen (dargestellt als Bio-TEQ; vgl. Abs. 2.3.6) für alle Sedimentextrakte wurden mit der Zelllinie GPC.2D.Luc gemessen (Abb. 3.22). Die geringsten Bio-TEQ-Werte in allen Testsystemen wurden für die Sedimentextrakte aus Riedlingen und der Lauchert beobachtet. Die höchsten Induktionen hingegen konnte für nahezu alle Biotests für die Proben aus Rottenacker, Öpfingen und der Schwarzach dokumentiert werden. Die übrigen Sedimentextrakte wiesen in den verschiedenen Biotests nur eine geringe Übereinstimmung in deren Aktivität auf. Durch eine Korrelationsanalyse nach Pearson konnte daher auch keine Übereinstimmung sowohl zwischen den Ergebnissen aus dem GPC.2D- und dem DR-CALUX-Assay ($r_p = 0,21$) als auch zwischen dem GPC.2D- und dem EROD-Assay ($r_p = 0,04$) ermittelt werden. Eine hohe Korrelation wurde dagegen zwischen dem DR-CALUX- und dem EROD-Assay festgestellt ($r_p = 0,84$).

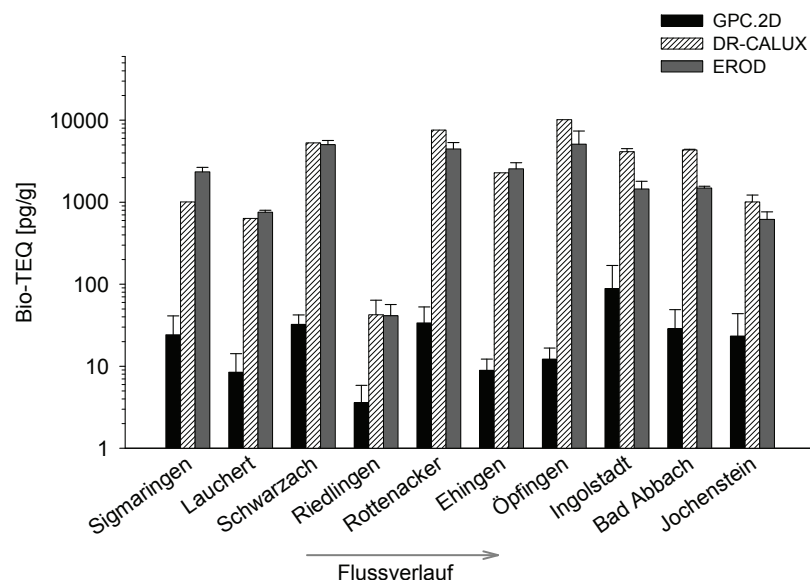


Abb. 3.22: Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der Sedimentextrakte aus der Donau, ermittelt mit dem GPC.2D (GPC.2D.Luc Zellen; n = 3 - 6), DR-CALUX- (H4IIE Zellen; n = 1 - 3) und EROD-Assay (RTL-W1 Zellen; n = 3). Die Bio-TEQs wurde in Relation zur der TCDD-Aktivität dargestellt, die 25 % der maximalen Induktion entspricht. Datengrundlage: Keiter et al. (2007).

Multilayer-Fraktion: Die Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der Multilayer-Fractionen (sie enthält säureresistente organische Schadstoffe wie z.B. PCBs und PCDD/Fs) der Donauproben ist in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Für alle Proben der baden-württembergischen Donau konnte mit Ausnahme von Riedlingen eine Dioxin-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden. Für den GPC.2D-Assay war ein Test der Fraktionen leider nicht möglich.

Im EROD-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 war die Induktion der fraktionierten Proben deutlich geringer als im DR-CALUX. Dennoch konnte eine mittlere Korrelation ($r_s = 0,6$) zwischen diesen Biotestverfahren ermittelt werden. Die niedrigsten BioTEQ-Werte in beiden Testsystemen erzielten die Proben aus dem Zufluss Lauchert (112 pg/g im EROD- und 20 pg/g im DR-CALUX-Assay) und dem Donaustandort Ehingen (117 pg/g im EROD- und 40 pg/g im DR-CALUX-Assay).

Die höchste AhR vermittelte Reaktion im DR-CALUX konnte für die Fraktion aus dem Öpfinger Stausee beobachtet werden (1400 pg/g). Eine ebenfalls hohe Dioxin-ähnliche Aktivität wiesen die Proben aus der Schwarzach (876 pg/g), Sigmaringen (633 pg/g) und Rottenacker (210 pg/g) auf. Die höchste EROD-Induktion wurde hingegen für die Multilayer-Fraktion der Schwarzach gemessen (123 pg/g). Geringfügig niedrigere Werte erzielten die Proben aus Öpfingen (70 pg/g), Sigmaringen (54 pg/g) und Rottenacker (44 pg/g).

Tab. 3.12: Bio-TEQs der Multilayer-Fractionen der oberen Donau sowie die entsprechende zellspezifische Chem-TEQs aus der chemischen Analyse der PCBs und PCDD/Fs in pg/g und die sich daraus ergebenden prozentualen Anteile der chemisch analysierten Stoffe am Gesamteffekt im Biotest. Datengrundlage: Keiter et al. (2007a).

	EROD			DR-CALUX		
	Bio-TEQ	Chem-TEQ	[%]	Bio-TEQ	Chem-TEQ	[%]
Sigmaringen	54	83	153	633	35	6
Lauchert	20	61	308	112	28	25
Schwarzach	123	250	203	876	117	13
Rottenacker	44	137	310	210	59	28
Ehingen	40	110	273	117	47	40
Öpfingen	63	303	478	1400	126	9

3.6.2 Chem-TEQs - Anteil der Induktion im Biotest

Einer der stärksten Induktoren für Dioxin-ähnliche Wirksamkeit ist 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin (TCDD; Whitlock 1993). PAHs, PCBs und verschiedene PCDD/Fs verfügen ebenfalls über ein Dioxin-ähnliches Potential in den verschiedenen Biotests, jedoch mit zellspezifischen Unterschieden. Um zu klären über welchen Anteil diese organischen Verbindungen an der Gesamtinduktion in den Biotests verfügen, wurden für nahezu alle analysierten PAHs, PCBs und PCDD/Fs die TCDD-Äquivalenz-Konzentrationen (Chem-TEQs) berechnet. Hierfür wird die Konzentration einer Substanz mit dem REP-Faktor (Relative Potency Factor) multipliziert. Dieser Faktor ist spezifisch für die Wirkung einer Chemikalie im relativen Verhältnis zu TCDD in einer bestimmten Zelllinie (Behnisch et al. 2003, Bols et al. 1999, Clemons et al. 1998, Machala et al. 2001, Safe 1994). Mittels der spezifischen REP-Faktoren konnte für alle Standorte die Summe der Chem-TEQs der verschiedenen Substanzklassen in Abhängigkeit zur Zelllinie berechnet werden (Tab. 3.13). Für die Zelllinie GPC.2D.Luc stehen keine REP-Faktoren zur Verfügung, weshalb die Chem-TEQs für dieses Testverfahren nicht berechnet werden konnten.

Tab. 3.13: Chem-TEQs aller Standorte für die Zelllinien RTL-W1 und H4IIE, berechnet mittels Multiplikation der spezifischen REPs mit den Konzentrationen der verschiedenen Substanzen. Datengrundlage: Keiter et al. (2007a).

	Zelllinien	Sigmaringen	Lauchert	Schwarzach	Rottenacker	Ehingen	Öpfingen	Ingolstadt	Bad Abbach	Jochenstein
PAHs [pg/g]	RTL-W1*	293	125	2502	-	281	757	193	122	35
	H4IIE**	4234	183	2884	-	401	1044	196	143	28
PCBs und PCDD/Fs [pg/g]	RTL-W1***	83	61	250	137	110	303	-	-	-
	H4IIE***	35	28	117	59	47	126	-	-	-
Summe [pg/g]	RTL-W1	376	186	2752	137	391	1060	193	122	35
	H4IIE	459	211	3001	59	448	1170	196	143	28

*REPs aus Bols et al. (1999), ** REPs aus Behnisch et al. (2003) und Machala et al. (2001), *** REPs aus Clemons et a. (1998) und Safe (1994)

Durch die Subtraktion der Chem-TEQs von den Bio-TEQs wurde festgestellt, dass in beiden Biotestverfahren für nahezu alle Sedimentproben weniger als 25 % der Induktion durch die Ergebnisse aus der chemischen Analyse erklärt werden konnten (Abb. 3.23 und 3.24). Eine Ausnahme bildete der Sedimentextrakt der Schwarzach. Für diese Probe konnten etwa 50 - 55 % der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit im Biotest durch chemische Analysedaten erklärt werden. Für die Probe vom Standort Sigmaringen zeigte sich im DR-CALUX, dass etwa 55 % der Aktivität durch unbekannte Substanzen verursacht wurde. Der höchste Anteil am nachweisbaren Effekt wurde in allen Proben durch die PAHs induziert.

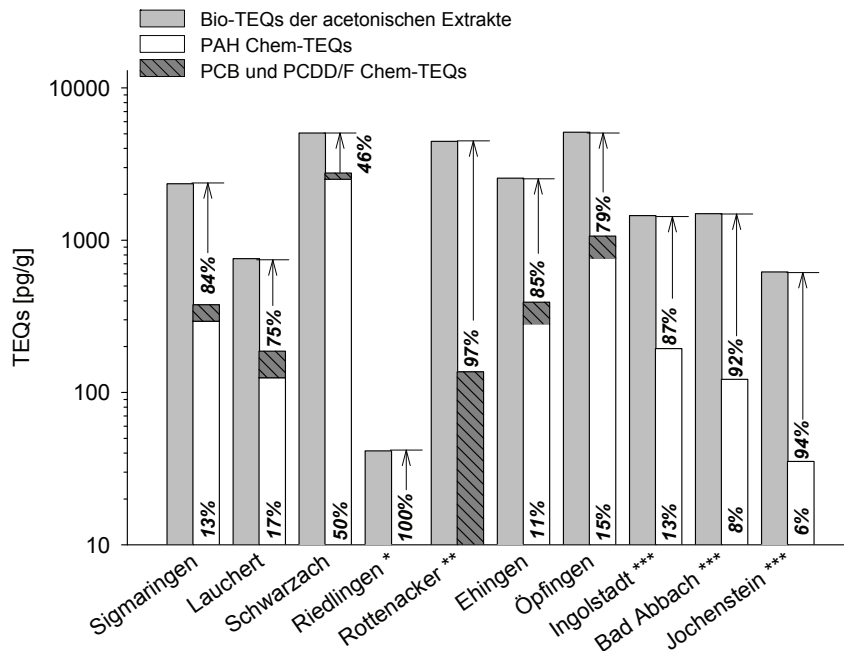


Abb. 3.23: Prozentualer Anteil der Chem-TEQs; ermittelt aus den Konzentrationen der PAHs, PCBs und PCDD/Fs und den entsprechenden REP-Faktoren am Gesamteffekt (Bio-TEQs) der Donausedimente im **EROD-Assay**. PAH Chem-TEQs wurden durch Multiplikation der PAH-Konzentrationen mit den REP-Faktoren aus Bols et al. (1999) berechnet. Die Berechnung der PCB und PCDD/F Chem-TEQs erfolgte entsprechend mit den REP-Faktoren aus Clemons et al. (1998) und Safe (1994). *Substanzkonzentrationen befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze; **PAH bzw. ***PCB und PCDD/F Konzentrationen stehen nicht zur Verfügung. Datengrundlage: Keiter et al. (2007a).

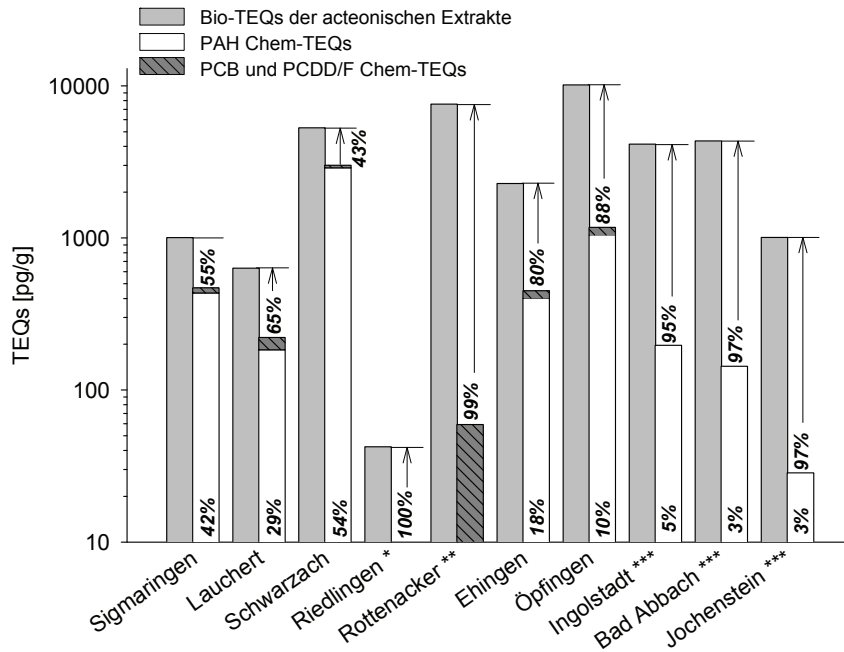


Abb. 3.24: Prozentualer Anteil der Chem-TEQs; ermittelt aus den Konzentrationen der PAHs, PCBs und PCDD/Fs und den entsprechenden REP-Faktoren am Gesamteffekt (Bio-TEQs) der Donausedimente im **DR-CALUX-Assay**. PAH Chem-TEQs wurden durch Multiplikation der PAH-Konzentrationen mit den REP-Faktoren aus Behnisch et al. (2003) und Machala et al. (2001) berechnet. Die Berechnung der PCB und PCDD/F Chem-TEQs erfolgte entsprechend mit den REP-Faktoren aus Clemons et al. (1998) und Safe (1994). *Substanzkonzentrationen befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze; **PAH bzw. ***PCB und PCDD/F Konzentrationen stehen nicht zur Verfügung. Datengrundlage: Keiter et al. (2007a).

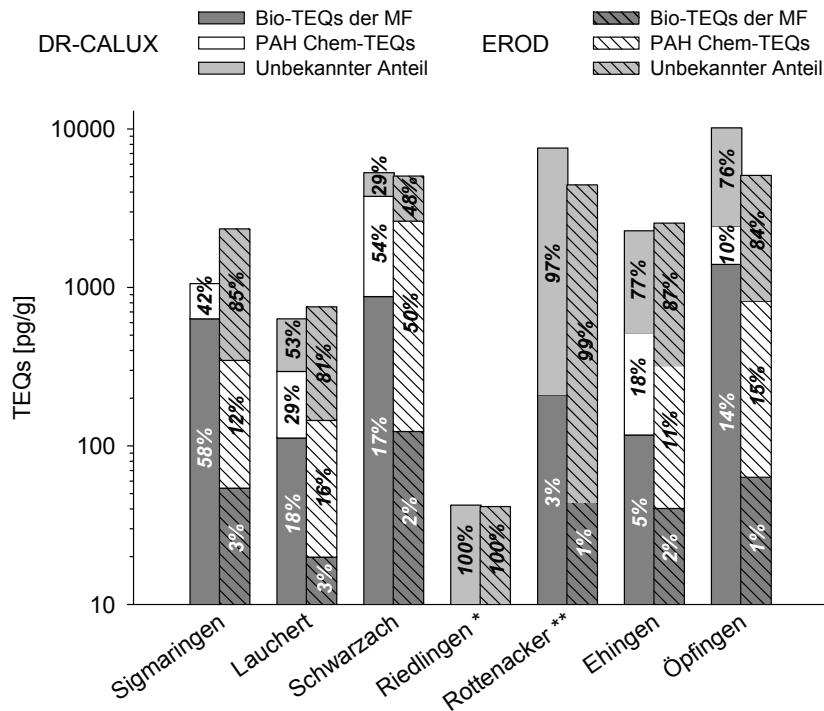


Abb 3.25: Verantwortlicher Anteil der unbekannt nicht-persistenten und nicht-prioritären Schadstoffe (hellgraue Abschnitte der Balken) in Prozent im EROD- und DR-CALUX-Assay, berechnet durch die Subtraktion der Bio-TEQs der Multilayer-Fractionen (DR-CALUX- und EROD-Assay; dunkelgraue Abschnitte der Balken) und der PAH Chem-TEQs (weiße Abschnitte der Balken) von den entsprechenden Bio-TEQs der Rohextrakte. MF = Multilayer-Fraktion; * PAHs und Dioxin-ähnliche Aktivität war unterhalb der Nachweisgrenze; **PAH Konzentrationen stehen für diese Probe nicht zur Verfügung. Datengrundlage: Keiter et al. (2007a).

In Abbildung 3.25 wird der Anteil unbekannter, nicht-prioritärer und nicht-persistenter Schadstoffe dargestellt, indem der Bio-TEQ aus den Tests mit den Multilayer-Fraktionen sowie der PAH Chem-TEQs von der Gesamtinduktion subtrahiert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass in nahezu allen Proben der Hauptanteil am Gesamteffekt in beiden Biotestsystemen durch unbekannte nicht-prioritäre und nicht-persistente Schadstoffe verursacht wurde. Eine Ausnahme bildete hierbei der Zufluss Schwarzach, bei dem ein Großteil der Dioxin-ähnlichen Aktivität durch prioritäre PAHs hervorgerufen wurde (50 - 54 %). Ferner kann in Abbildung 3.25 gezeigt werden, dass der DR-CALUX-Assay gegenüber den säureresistenten Schadstoffen aus der Multilayer-Fraktion sehr viel sensitiver reagiert als der EROD-Assay. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass die durch die Multilayer-Fraktion ausgelöste Induktion im EROD-Assay sehr gering war und die gemessenen Bio-TEQs sich deutlich unterhalb der berechneten Chem-TEQs der PCBs und PCDD/Fs befanden (Tab. 3.13).

Im DR-CALUX hingegen war der Anteil der gemessenen PCBs und PCDD/Fs, die für die Induktion der Multilayer-Fraktion verantwortlich gemacht werden konnten, nicht höher als ca. 40 % (Ehingen; vgl. Tab. 3.12). Die höchste Dioxin-ähnliche Aktivität der Multilayer-Fraktion wurde für den Standort Öpfingen gemessen (1400 pg/g). Hier konnten jedoch nur 9 % durch die Konzentrationen der gemessenen persistenten organischen Schadstoffe erklärt werden. Ähnlich war die Situation am Probennahmestandort Sigmaringen, hier betrug der Anteil der Multilayer-Fraktion (633 pg/g) am Gesamteffekt (1006 pg/g) 58 %, jedoch konnten von diesem wiederum nur 6 % (35 pg/g entspricht 3,5 % am Gesamteffekt) durch die chemisch analysierten PCBs und PCDD/Fs erklärt werden.

3.6.3 Bewertung der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit

In allen drei verwendeten Biotests (DR-CALUX-, GPC.2D- und EROD-Assay) induzierten die Sedimentproben aus der Donau eine Dioxin-ähnliche Aktivität, jedoch mit zellspezifischen Unterschieden. So zeigten beispielsweise die H4IIE-Zellen eine leicht höhere Induktionsrate als die RTL-W1-Zellen. Dessen ungeachtet verfügten aber beide Zelllinien über eine signifikant höhere Aktivität als die GPC.2D-Zellen (Abb. 3.26). Gestützt wurden diese beobachteten Unterschiede durch Korrelationsanalysen: Keine Korrelation wurde zwischen den Ergebnissen mit GPC.2D-Zellen und den beiden anderen Zelllinien H4IIE und RTL-W1 festgestellt. Eine eindeutige Korrelation, wie sie auch schon in anderen Studien festgestellt werden konnte (Gustavsson et al. 2004, Olsman et al. 2007), wurde zwischen H4IIE- und RTL-W1-Zellen ermittelt ($r = 0,84$). Der geringfügige Unterschied dieser beiden Zelllinien kann möglicherweise durch Spezies-spezifische Induktionsmechanismen (Bols et al. 2005, Olsman et al. 2007), verschiedene Expositionszeiten, aber auch durch eine Substratinhibition bei RTL-W1-Zellen in höheren Konzentrationen erklärt werden (Murk et al. 1996, Sanderson et al. 1996).

Die beiden Hypothesen, nach denen eine EROD-Inhibition und eine verlängerte Expositionszeit eine geringere Gesamtaktivität verursachen (Murk et al. 1996, Sanderson et al. 1996), könnten auch die geringen Bio-TEQ Werte der Multilayer-Fraktionen im EROD-Assay erklären. Außerdem lagen hier die Bio-TEQs stets unterhalb der berechneten Chem-TEQs der PCBs und PCDD/Fs. Obwohl die Metabolismusrate für halogenierte Verbindungen auch aufgrund ihrer molekularen Größe gering ist (Birnbaum et al. 2003), kann nicht ausgeschlossen, dass diese Fischzelllinie über eine Inkubationszeit von 72 h bestimmte halogenierte Substanzen abbaut (Olsman et al. 2007). Im Gegensatz dazu waren die Bio-TEQs der Multilayer-Fraktion im DR-CALUX stets höher als die entsprechenden Chem-TEQs der gemessenen PCBs und PCDD/Fs.

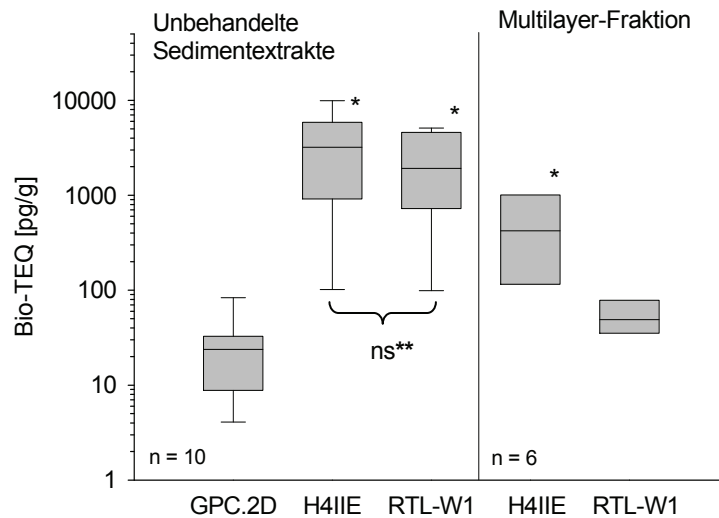


Abb. 3.26: Vergleich zwischen den Bio-TEQ Werten der Sedimentextrakte und der Multilayer-Fractionen aus der Donau im GPC.2D-, DR-CALUX- und EROD-Assay. Die Daten sind als Boxplots dargestellt, die Box repräsentiert das 25 bis 75 % Intervall der Daten. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Mit einem Stern markierte Boxplots sind signifikant unterschiedlich zu der Box, die den niedrigsten Effekt einer Zelllinie darstellt (H-Test mit anschließendem Dunn's Test, $p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen dem DR-CALUX- und dem EROD-Assay festgestellt werden (ns** = nicht signifikant; t-Test, $p < 0,05$). Datengrundlage: Keiter et al. (2007).

Es ist daher davon auszugehen, dass die Unterschiede zwischen den Bio-TEQs aus dem EROD-Assay und den Chem-TEQs nicht nur allein durch EROD-Inhibition und eine längere Expositionszeit erklärt werden können, sondern es müssen auch in Abhängigkeit der Spezies und der Zelllinie unterschiedliche Induktionsmechanismen sowie die Gegenwart unbekannter persistenter Schadstoffe berücksichtigt werden (Garrison et al. 1996, Olsman et al. 2007). Dessen ungeachtet stellen beide Zelllinien sehr gut geeignete Biotestsysteme dar, um die Dioxin-ähnliche Wirksamkeit in Sedimentextrakten nachzuweisen, da chemische Analysen fast immer für den Nachweis aller Schadstoffe im Sediment unvollständig bleiben müssen.

Der GPC.2D-Assay wies eine bis zu hundertfach niedrigere Induktion als die beiden anderen Testsysteme auf. Gründe hierfür könnten sowohl Unterschiede in den transfizierten DRE's als auch zellspezifische Mechanismen sein, wie z.B. Chemikalien-abhängige Translokatoren und Rezeptoren (Garrison et al. 1996, Zhou et al. 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Induktion der GPC.2D-Zelllinie wäre es notwendig zunächst folgendes zu untersuchen: (1) Testung verschiedener prioritärer Schadstoffe als Monosubstanzen und als Substanzgemische, da es bekannt ist, dass in Abhängigkeit der Zelllinie bestimmte organische Verbindungen antagonistisch wirken; (2) die Ermittlung von REPs für unterschiedliche Substanzen (PAHs, PCBs und PCDD/Fs) zur Kalkulation von TEQs, damit eine bessere Vergleichbarkeit zu anderen Zelllinien gegeben ist.

Unter der Annahme einer Konzentrationsadditivität (Clemons et al. 1998, White 2002) konnte für alle Sedimentextrakte gezeigt werden, dass – in Abhängigkeit der berechneten Chem-TEQs – lediglich ein sehr geringer Anteil der in den Biotests verursachten Induktion durch PCBs und PCDD/Fs hervorgerufen wurde. So wurden stets weniger als 8 % am Gesamteffekt im DR-CALUX- und EROD-Assay durch diese persistenten Verbindungen verursacht. Ein eindeutig höheres Induktionspotential ging von den weniger persistenten PAHs aus, die in allen Proben den höchsten prozentualen Anteil aller gemessenen Substanzen am Gesamteffekt aufwiesen. Diese quantifizierten PAHs konnten durchschnittlich für 13 - 18 % (in Ausnahmen bis zu über 50 %) der AhR-vermittelten Aktivität im

EROD- bzw. im DR-CALUX-Assay verantwortlich gemacht werden. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den acetonischen Rohextrakten und mit den Multilayer-Fractionen, dass der DR-CALUX- meist höher induzierte als der EROD-Assay. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass der DR-CALUX sensitiver auf komplexe Umweltproben und prioritäre Schadstoffe reagiert als der EROD-Assay. Olsman et al. (2007) hingegen wiesen nach Belastung mit PCDD/Fs in RTL-W1-Zellen eine höhere Induktion nach als in H4IIE-Zellen. Des Weiteren wiesen Bols et al. (1999) ebenfalls für RTL-W1-Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber PAHs nach als für H4IIE-Zellen.

In den Arbeiten von Brack et al. (2005) und Hollert et al. (2002a) wurde indes beschrieben, dass auch verschiedene nicht-prioritäre Schadstoffe über eine AhR-vermittelte Aktivität verfügen können und damit auch über ein Gefährdungspotential für die Umwelt. Des Weiteren ist bekannt, dass chemische Verbindungen mit größerer Polarität, wie z.B. heterozyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Amine und einige Pestizide, durchaus als AhR-Agonisten agieren können (Behnisch et al. 2001). Außerdem wurde eine Reihe natürlicher Substanzen – wie verschiedene Holzbestandteile, Reten und Juvaione aber auch Bioflavonoide – als AhR-Liganden identifiziert (Doostdar et al. 2000, Huuskonen et al. 1998, Martel et al. 1997). Abschließend lässt sich feststellen, dass die hohe Dioxin-ähnliche Wirksamkeit der unbehandelten Sedimentextrakte, die in den Zelllinien RTL-W1 und H4IIE festgestellt wurde, weder durch prioritäre PAHs noch durch POPs gänzlich erklärt werden konnte. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Induktion in den Biotestsystemen durch andere, unbekannte nicht-prioritäre Schadstoffe verursacht wurde. Deshalb sind weitere Untersuchungen, wie z.B. Effekt-dirigierte Analysen notwendig, um die unbekannt Stoffe zu identifizieren, die für die hohe Dioxin-ähnliche Aktivität verantwortlich sind.

3.6.4 Schlussfolgerungen

Der DR-CALUX- und EROD-Assay stellen in Kombination mit einer Multilayer-Fraktionierung und chemischen Analysen geeignete Systeme dar, um den Anteil unbekannter Substanzen in Sedimentextrakten zu ermitteln, die für die hohe Dioxin-ähnliche Wirkung in den Donauproben verantwortlich sind. Die daraus gewonnenen Daten liefern somit weitere wichtige Informationen bezüglich dem Gehalt bekannter und unbekannter chemischer Verbindungen mit toxischen Effekten. Sie sind damit wichtiger Bestandteil einer umfassenden Bewertung der Donau im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes.

Im GPC.2D-Assay konnten lediglich die unbehandelten Extrakte getestet werden. Außerdem wies dieses Biotestverfahren keine Korrelation mit den beiden übrigen *In vitro*-Systemen auf. Um jedoch eine Vergleichbarkeit mit anderen AhR-basierten Tests zu erreichen, wird es notwendig sein REPs für bestimmte prioritäre Substanzen für den GPC.2D-Assay zu bestimmen.

Prinzipiell ist es sehr schwierig zu beweisen, dass die Belastung mit bestimmten Schadstoffen den Fischrückgang in der oberen Donau verursacht haben könnte. Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse der eingesetzten bioanalytischen Verfahren, der Multilayer-Fraktionierung sowie der chemischen Analyse ein Zusammenhang zwischen chemischer Kontamination und dem Rückgang der Fischereierträge nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Insbesondere die sehr hohen PAH-Konzentrationen in den verschiedenen Proben könnten eine Ursache für den Fischrückgang darstellen. So wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass eine PAH-Kontamination mit Karzinogenese, Haut- und Lebertumoren, Immunsuppression und einer endokrinen Dysfunktion in Fischen

einhergeht (Arcaro et al. 1999, Blaha et al. 2006, Gray et al. 2003, Nacci et al. 2002, Pinkney et al. 2001, 2004, Schirmer et al. 2000, White & Claxton 2004).

Allerdings würde die Höhe der gemessenen Chemikalien kaum eine ausreichende und zufriedenstellende Erklärung für den Rückgang der Fische in der oberen Donau darstellen. Andererseits konnte in dieser Studie die hohe Dioxin-ähnliche Aktivität nicht ausreichend durch chemische Analyseverfahren erklärt werden, weshalb eine toxische Belastung der Fischpopulationen durch unbekannte nicht-prioritäre Substanzen nicht ausgeschlossen werden kann.

3.7 Mutagenität im Ames-Test

Zusammenfassung: Im Ames-Test mit dem Stämmen TA98 und TA100 mit und ohne S9-Supplementierung konnte insgesamt nur eine geringe Mutagenität der Sedimentextrakte aus der Donau festgestellt werden, wobei die Testansätze mit dem Stamm TA98 +S9 deutlich höher induzierten als alle übrigen (TA98 +S9 > TA98 -S9 > TA100 +S9 > TA100 -S9). Der höchste Induktionsfaktor wurde im Test mit TA98 +S9 für die Probe aus dem Zufluss Lauchert bestimmt ($IF_{\max} = 1,9$), jedoch bei der höchsten getesteten Konzentration von 500 mg SEQ/Platte. Die zweithöchste Induktion zeigten die Proben aus Sigmaringen (31,25 mg SEQ/Platte) und Öpfingen (125 mg SEQ/Platte) mit jeweils dem Faktor 1,6 ebenfalls mit dem Stamm TA98 +S9. Berücksichtigt man jedoch, dass bei gleichem IF_{\max} die Probe als stärker belastet bewertet werden muss, bei der die geringere Konzentration eingesetzt wurde, ergeben sich unter Verwendung der LOEC-Werte folgende Ränge:

- TA98 +S9: Sigmaringen > Öpfingen > Ehingen > Riedlingen > Lauchert > Schwarzach \cong Ingolstadt \cong Bad Abbach \cong Jochenstein.
- TA98 -S9: Öpfingen > Riedlingen > Lauchert > Sigmaringen \cong Schwarzach \cong Ehingen \cong Ingolstadt \cong Bad Abbach \cong Jochenstein.
- TA100: keine Mutagenität, weder mit noch ohne S9-Aktivierung.

Überraschend war jedoch, dass die mit PAHs sehr hoch kontaminierte Probe aus der Schwarzach in keinem Versuchsansatz eine mutagene Aktivität aufwies. Des Weiteren konnte für alle Proben auch kein Zusammenhang zwischen PAH-Kontamination und Mutagenität festgestellt werden. Gründe für die geringe Induktion sind evtl. eine akute Toxizität der Extrakte gegenüber den Bakterien, die damit eine Mutagenität maskiert, oder dass nur wenige polare Mutagene durch die Extraktion mit dem unpolaren Aceton erfasst werden, bzw. das unbekannte Stoffe die Mutagenität von z.B. Benzo[a]pyren überlagern. Daher sollte in weiteren Untersuchungen zunächst: a) das bakterientoxische Potential der Extrakte gegenüber *Salmonella typhimurium* erfasst werden, b) die Extraktion auch mit polaren Lösungsmitteln durchgeführt werden, und c) eine Fraktionierung der Proben nach ihrer Polarität durchgeführt werden, um letztlich eine umfassendere Beurteilung des mutagenen Potentials der Donausedimente vornehmen zu können.

Die Mutagenität der Sedimentextrakte wurde im Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 sowohl mit als auch ohne S9-Mix überprüft. Zur quantitativen Bestimmung des mutagenen Potentials der Proben, wurde für alle Konzentrationen der Induktionsfaktor (IF) als Quotient aus der Anzahl der spontanen Revertanten der Negativkontrolle und der induzierten Revertanten der Probe berechnet.

3.7.1 Ergebnisse im Ames-Test

Die Ergebnisse aus dem Ames-Test für die Stämme TA98 und TA100 mit und ohne S9-Supplementierung sind in den Abbildungen 3.27 und 3.28 dargestellt.

TA98: Im Testansatz mit S9-Aktivierung wurde der höchste maximale Induktionsfaktor ($IF_{max} = 1,9$) für die Probe aus der Lauchert in einer Konzentration von 500 mg SEQ/Platte und der zweithöchste für die beiden Standorte Sigmaringen ($IF_{max} = 1,7$; 31,25 mg SEQ/Platte) und Öpfingen ($IF_{max} = 1,7$; 125 mg SEQ/Platte) gemessen. Eine ebenfalls erhöhte Induktion wurde in Probe aus Ehingen ($IF_{max} = 1,6$) festgestellt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve stieg hier zunächst an, fiel jedoch in höheren Konzentrationen wieder ab. Grund hierfür könnte eine akute Toxizität darstellen, welche die Mutagenität in hohen Konzentrationen maskiert. Ein vergleichbarer Effekt war auch in den Proben aus Sigmaringen und Öpfingen zu beobachten. Für die Extrakte der Probennahmestellen Schwarzach, Ingolstadt, Bad Abbach und Jochenstein wurde in keinem Testansatz eine signifikante Mutagenität nachgewiesen. Im Testansatz ohne S9-Mix wurde nur in den niedrigsten Konzentrationen der Proben aus Riedlingen und Öpfingen eine signifikant erhöhte Anzahl an Revertanten beobachtet, die jedoch schon in den nächst höheren Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen war. Auch hier könnte eine akute toxische Wirkung der Proben einen mutagenen Effekt in höheren Konzentrationen verhindern.

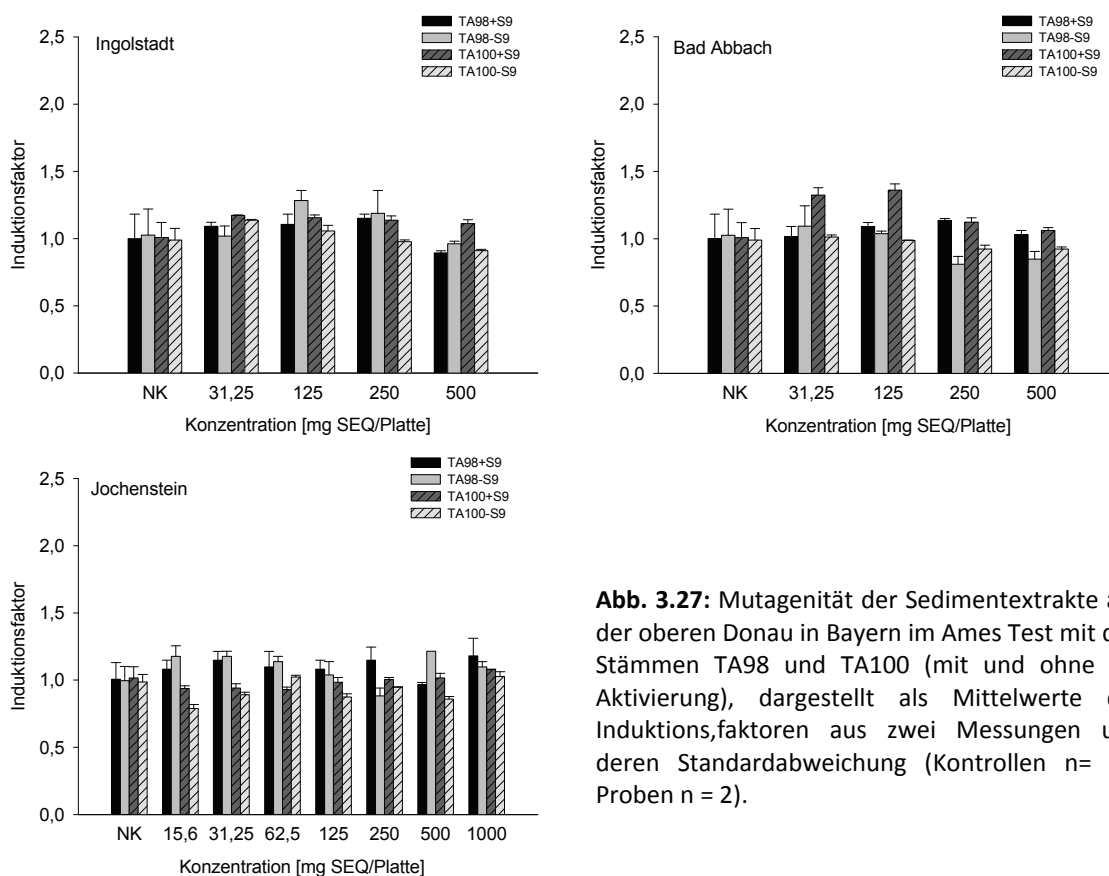


Abb. 3.27: Mutagenität der Sedimentextrakte aus der oberen Donau in Bayern im Ames Test mit den Stämmen TA98 und TA100 (mit und ohne S9-Aktivierung), dargestellt als Mittelwerte der Induktionsfaktoren aus zwei Messungen und deren Standardabweichung (Kontrollen n = 10, Proben n = 2).

Bei fast allen Proben, die einen signifikanten Anstieg der Revertanzahl zu verzeichnen hatten, führte die S9-Supplementierung zu einer Erhöhung der Induktion. Daraus lässt sich schließen, dass in

der Probe Schadstoffe vorhanden waren, die durch die Zugabe der S9-Leberfraktion bioaktiviert wurden (Maron & Ames 1983). Die Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch Cytochrom P450-abhängige Enzyme, dabei werden sog. Promutagene mittels Oxidation, Reduktion und Hydrolyse in eine aktive Form umgewandelt. Benzo[*a*]pyren (korrekte Bezeichnung Benzo[*def*]chrysen) ist zum Beispiel eine solche Substanz. Sie wird über mehrere Oxidationsprozesse in das kanzerogene 7,8-Dihydro-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[*a*]pyren transformiert, welches wiederum eine kovalente Bindung mit der DNA eingeht und letztlich Krebs verursachen kann.

TA100: Mit dem Stamm TA100 (mit und ohne S9) konnte mit Ausnahme der Probe des Zufluss Lauchert (höchste Konzentration mit S9-Aktivierung) keine signifikante Mutagenität festgestellt werden.

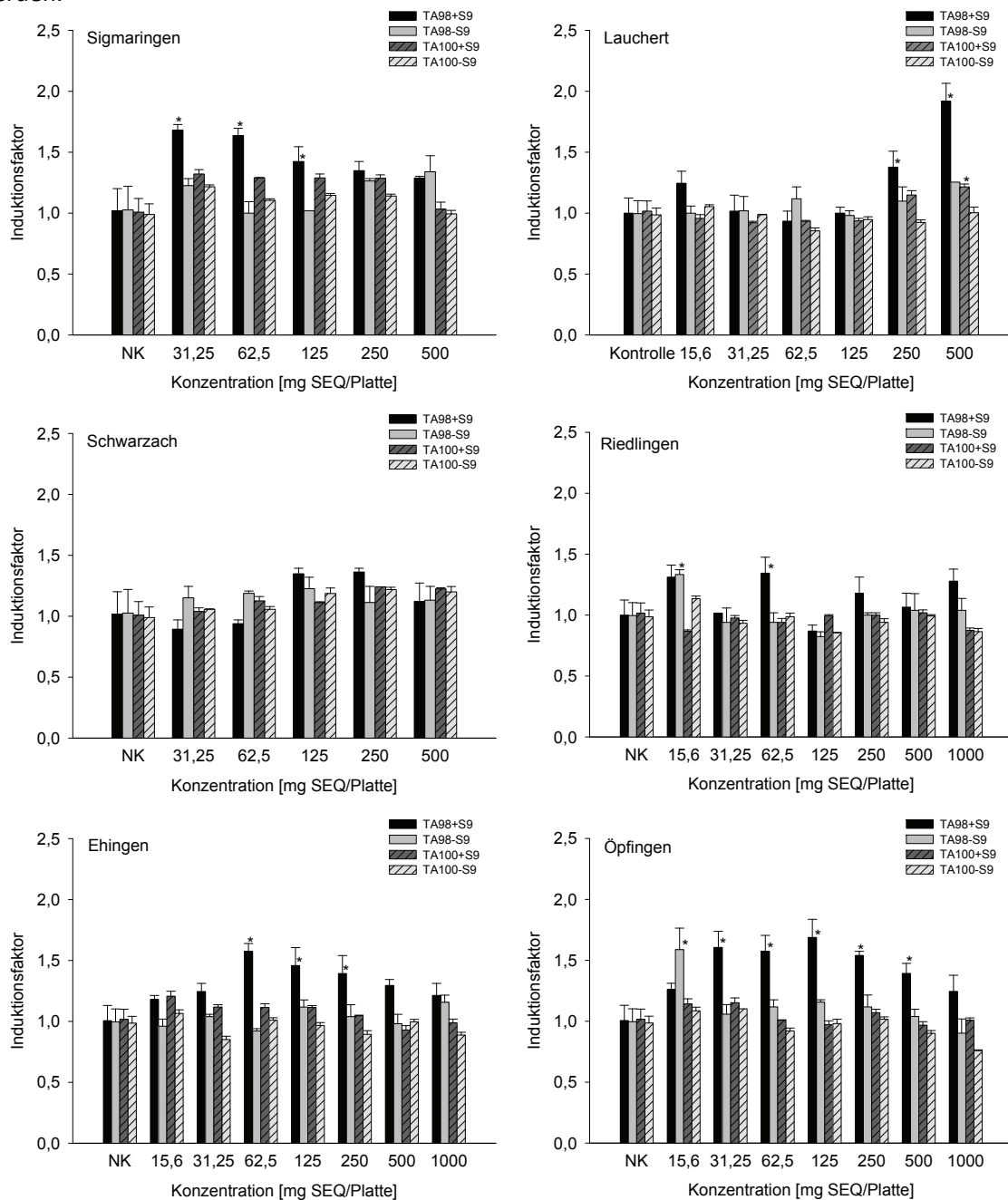


Abb. 3.28: Mutagenität der Sedimentextrakte aus der oberen Donau in Baden-Württemberg im Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 (mit und ohne S9-Aktivierung), dargestellt als Mittelwerte der Induktionsfaktoren aus zwei Messungen und deren Standardabweichung. Mit * gekennzeichnete Konzentrationen sind signifikant mutagen gegenüber der Kontrolle (einfaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett's Test, $p < 0,05$; Kontrollen: $n = 10$, Proben: $n = 2$).

Die höchste Mutagenität wurde für den Stamm TA98 +S9 und abnehmend für die Ansätze TA98 -S9 > TA100 +S9 > TA100 -S9 gemessen (Abb. 3.29). Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied jedoch nur zwischen den Stämmen TA98 +S9 und TA100 -S9 (einfaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunn's Test, $p < 0,05$). Außerdem ist deutlich aus den Abbildungen 3.27, 3.28 und 3.29 zu erkennen, dass die Metabolisierung der Sedimentextrakte durch den S9-Mix eine Steigerung der Induktionsfaktoren zur Folge hatte.

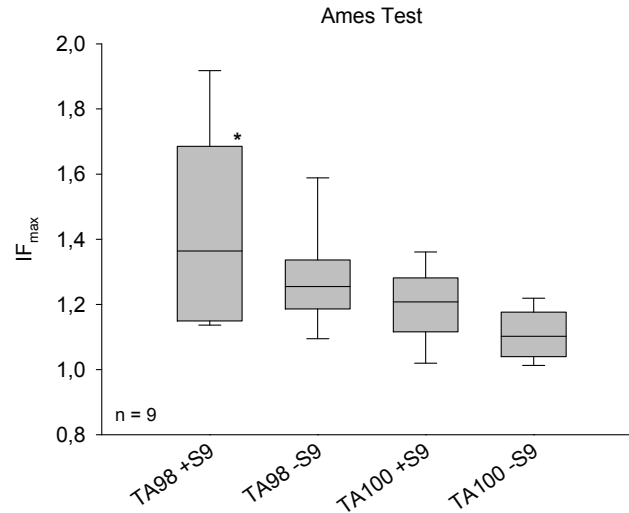


Abb. 3.29: Vergleich der im Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 (mit und ohne S9-Supplementierung) festgestellten Mutagenität der Donauproben. Mit einem Stern gekennzeichnete Konzentrationen sind signifikant unterschiedlich (einfaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunn's Test, $p < 0,05$) gegenüber dem Stamm TA100 ohne S9-Mix.

Tab. 3.14: Darstellung des mutagenen Potentials der Donauproben im Ames-Test als LOEC (Lowest Observed Effect Concentration in mg SEQ/Platte) mit den entsprechenden Induktionsfaktoren (IF).

	TA98				TA100			
	+S9		-S9		+S9		-S9	
	LOEC	IF	LOEC	IF	LOEC	IF	LOEC	IF
Sigmaringen	31,25	1,68	> 500	-	> 500	-	> 500	-
Lauchert	250	1,92	500	1,25	> 500	-	> 500	-
Schwarzach	> 500	-	> 500	-	> 500	-	> 500	-
Riedlingen	62,5	1,33	15,6	1,34	> 1000	-	> 1000	-
Ehingen	62,5	1,57	> 1000	-	> 1000	-	> 1000	-
Öpfingen	31,25	1,61	15,6	1,59	> 1000	-	> 1000	-
Ingolstadt	> 500	-	> 500	-	> 500	-	> 500	-
Bad Abbach	> 500	-	> 500	-	> 500	-	> 500	-
Jochenstein	> 1000	-	> 1000	-	> 1000	-	> 1000	-

Bewertet man die Extrakte nach dem maximalen Induktionsfaktor, so müsste die Probe aus der Lauchert mit einem IF_{max} von 1,9 (im Testansatz mit TA98 +S9) das höchste mutagene Potential aufweisen. Berücksichtigt man jedoch die Konzentration, in welcher der maximale Induktionsfaktor bestimmt wurde, so muss bei gleich hohem Induktionsfaktor die Probe als stärker mutagen bewertet werden, in welcher dieser Induktionsfaktor bei geringerer Konzentration gemessen wurde. Daher wurde zusätzlich die LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) bestimmt, um die Proben

untereinander besser vergleichen zu können (Tab. 3.14). Daraus ergeben sich für den Stamm TA98 die höchsten mutagenen Potentiale für die Probe aus Sigmaringen mit S9-Aktivierung und für den Ansatz ohne S9-Aktivierung für das Sedimentextrakt aus Öpfingen. Unter Berücksichtigung einer konzentrationsabhängigen Induktion lassen sich die Proben wie folgt nach ihrem mutagenen Potential anordnen:

- **TA98 +S9:** Sigmaringen > Öpfingen > Ehingen > Riedlingen > Lauchert > Schwarzach \cong Ingolstadt \cong Bad Abbach \cong Jochenstein.
- **TA98 -S9:** Öpfingen > Riedlingen > Lauchert > Sigmaringen \cong Schwarzach \cong Ehingen \cong Ingolstadt \cong Bad Abbach \cong Jochenstein.
- **TA100:** keine signifikant erhöhte Mutagenität weder mit noch ohne S9-Aktivierung.

3.7.2 Bewertung der Mutagenität der Donauproben

Der Ames-Test ist der am häufigsten eingesetzte Mutagenitätstest und wird in verschiedenen Varianten verwendet (Chen & White 2004). Die Teststämme, die im Ames-Test am häufigsten für die Überprüfung des mutagenen Potentials von komplexen Umweltproben genutzt werden, sind die Stämme TA98 und TA100. In verschiedenen Studien, einschließlich der hier vorliegenden, wurde für den Stamm TA98 eine höhere Sensitivität gegenüber verschiedenen Umweltproben beobachtet (Chen & White 2004, Erdinger et al. 2005, Kosmehl et al. 2004), wobei durch die Supplementierung mit dem S9-Mix meist noch eine höhere Induktion erzielt wird. Beide Stämme sind darüber hinaus dafür bekannt, dass sie auf Monosubstanzen, wie verschiedene PAHs, aromatische Amine sowie N-haltige bzw. S-haltige Heterozyklen, reagieren (Chen & White 2004, Cote et al. 1995, Fluckiger-Isler et al. 2004, Marvin et al. 2000, Ohe 1997).

Durch die chemische Analyse der Sedimente konnte eine sehr hohe PAH-Konzentration nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde würde man eine gesteigerte Mutagenität erwarten, insbesondere von der Probe aus der Schwarzach mit einer Summenkonzentration der 16 EPA-PAHs von 26,3 mg/kg. Dennoch wurde überraschenderweise in dieser Probe keine signifikante Mutagenität gemessen. In einer durch Chen und White (2004) durchgeführten Regressions- und Korrelationsanalyse wurde lediglich eine sehr geringe Korrelation zwischen mit PAH kontaminierten Umweltproben und einem mutagenem Potential im Ames-Test festgestellt ($R^2 = 0,19$; $n = 48$). Eine bessere Korrelation wurde erreicht, wenn in der Kalkulation nur Extrakte verwendet wurden, die mit polaren Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol, hergestellt wurden. So wurde beispielsweise in einer Studie von Suzuki et al. (1982) die relative Mutagenität (TA98 +S9) gesteigert, wenn die Proben mit einem polaren Lösungsmittels extrahiert wurden (Wasser > Ethylacetat > Methanol \cong n-Hexan). Daraus schlossen die Autoren dieser Studie, dass die mutagene Aktivität der Umweltproben hauptsächlich von polaren Substanzen ausgeht und nur zu einem geringen Anteil von unpolaren PAHs. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Untersuchung von Elbesedimenten beobachtet werden, dass eine höhere Mutagenität der Proben mit TA98 +S9 erreicht wird, wenn bei der Extraktion das unpolare Toluol anstelle von Methanol bzw. Wasser verwendet wurde (Vahl et al. 1997). Aber auch hier wurde nur eine geringe Induktion mit Werten zwischen 0,31 und 1,7 bei vergleichsweise hohen PAH-Konzentration (Σ 16 PAHs 1,63 - 7,2 mg/kg) festgestellt. Jedoch konnte in dieser Studie ebenfalls keine Korrelation zwischen PAH-Kontamination und Mutagenität ermittelt werden.

In der vorliegenden Studie wurden die im Ames-Test verwendeten Proben mit Aceton extrahiert, das in Relation zu Wasser eine Polarität von 0,355 aufweist und daher den nicht-polaren Lösungsmitteln zugeordnet wird, wobei es durchaus in der Lage ist leicht polare Substanzen zu lösen.

Dennoch erwiesen sich die mit PAH kontaminierten Proben als wenig mutagen. In einer Arbeit von Brack et al. (2005) wurde ebenfalls nur eine geringe Mutagenität durch acetonischen Sedimentextrakte im Stamm TA98 festgestellt, die jedoch auf akut toxische und interferierende Effekte verschiedener Substanzen zurückgeführt wurde. Durch eine Alumina-Fraktionierung konnte dann jedoch festgestellt werden, dass insbesondere nicht-polare und mäßig nicht-polare aromatische Verbindungen aus den Rohextrakten eine signifikante Mutagenität aufwiesen. Für die aliphatischen und stark polaren Fraktionen wurde hingegen keine Mutagenität festgestellt. Einer der stärksten Induktoren im Ames-Test, der für die Mutagenität in den Proben verantwortlich gemacht werden konnte, war nach Brack et al. (2005) Benzo[*a*]pyren. Daher wurden die Benzo[*a*]pyren-Konzentrationen und die Ergebnisse aus dem Ames-Test mit den Stamm TA98 aus der eigenen Studie miteinander korreliert, wobei allerdings keine Korrelation festgestellt werden konnte. In der Studie von Brack et al. (2005) wurden aber auch noch Perylen, Benzo[*a*]fluoranthen und 11H-Indeno[2,1,7-*cde*]pyrene als starke Induktoren in den Sedimentextrakten identifiziert, die in den eigenen Analysen jedoch nicht berücksichtigt wurden.

Die geringe Induktion der Sedimentextrakte aus der Donau kann daher evtl. auf folgende Faktoren zurückgeführt werden:

- a) Die Mutagenität wird vor allem in höheren Konzentrationen durch eine akute Bakterientoxizität der Extrakte maskiert (Brack et al. 2005).
- b) Durch die Extraktion mit Aceton werden evtl. nicht alle Schadstoffe erfasst, die eine Mutagenität induzieren könnten (Suzuki et al. 1982, Vahl et al. 1997).
- c) Im komplexen Gemisch der Sedimentextrakte sind Substanzen enthalten, die den Effekt mutagener Substanzen überlagern (Brack et al. 2005).

In zukünftigen Untersuchungen sollte daher zunächst die Bakterientoxizität geprüft werden. Vorstellbar wäre eine modifizierte Version des Bakterienkontakttest mit *Salmonella typhimurium* anstelle von *Arthrobacter globiformis*. Außerdem sollten verschiedenartig hergestellte Extrakte zum Einsatz kommen (Extraktion mit Methanol und/oder Wasser sowie Gewinnung des Porenwassers), um das mutagene Schädigungspotential von Sedimenten besser im Ames-Test abzubilden. Des Weiteren sollten die Proben nach ihrer Polarität fraktioniert werden, um eine Interferenz durch andere Substanzen in den komplexen Umweltproben auszuschließen und möglichst die bisher unbekannt mutagenen Stoffe zu identifizieren. Denn trotz einer geringen oder keiner signifikanten Induktion im Ames-Test, ist die Gegenwart von mutagenen Substanzen nicht auszuschließen (Brack et al. 2005).

3.8 Gentoxizität und Mutagenität in eukaryotischen Systemen

Zusammenfassung: Zur Bestimmung des gentoxischen und des mutagenen Gefährdungspotentials in der Donau wurden der Mikrokerntest (mit RTL-W1-Zellen und mit Erythrocyten aus der Barbe) und der Comet-Assay (Zelllinie RTL-W1 und Embryonen des Zebraärlings) verwendet. In den *In vitro*-Tests wurde sowohl das potentiell (Sedimentextrakte) aber auch das biologisch verfügbare (native Proben) gentoxische Schädigungspotential überprüft. Mit den Erythrocyten aus der Barbe (*Barbus barbus*) konnte getestet werden, ob ein gentoxischer Effekt *in situ* nachweisbar war.

Für die *In vitro*-Tests wurde für fast alle Proben ein deutlicher Dosis-abhängiger Effekt nachgewiesen. Durch Regressions- und Korrelationsanalysen konnte eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen eukaryontischen Testergebnissen ermittelt werden. Außerdem konnten mittels einer Clusteranalyse verschiedene Belastungsschwerpunkte bzw. wenig belastete Standorte an der Donau identifiziert werden. Berücksichtigt man ferner die Höhe der Induktion in den verschiedenen Testverfahren, ergibt sich für den Standort Rottenacker stets die höchste und für den Zufluss Lauchert stets die niedrigste Belastung.

Die *In vivo*-Mutagenität mit Barben-Erythrocyten wurde nur für vier Standorte (Sigmaringen, Riedlingen, Rottenacker und Ehingen) gemessen, wobei lediglich für den Standort Sigmaringen kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte. Die übrigen Standorte wiesen eine signifikant erhöhte Mikrokerninduktion gegenüber der Kontrolle auf und konnten sehr gut auf die Ergebnisse *in vitro* übertragen werden.

Ursachen für die teilweise sehr hohe gentoxische und mutagene Belastung könnten die hohen PAH-Konzentrationen sein, die jedoch lediglich mit den Ergebnissen des Comet-Assay gut bis sehr gut korrelieren. Zwischen den Ergebnissen aus dem Mikrokerntest und der Kontamination mit PAHs konnte nur eine mäßige Korrelation nachgewiesen werden. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Mikrokerntest neben Chromosomenbrüchen auch eine Störung des Spindelapparates detektiert werden kann, im Comet-Assay aber lediglich Einzelstrangbrüche. Außerdem müssen noch spezies- und zellspezifische Unterschiede berücksichtigt werden.

Aufgrund der eigenen Ergebnisse und anderen Studien ist jedoch ein Zusammenhang zwischen Fischrückgang und gentoxischer Belastung in der Donau wiederum nicht auszuschließen. Insbesondere ist bekannt, dass erhöhte PAH-Konzentrationen unter anderem die Vitalität von Gameten beeinträchtigen und auch Hauttumore in Fischen auslösen können, und daher insgesamt eine Fischpopulation schwächen können.

3.8.1 Mutagenität im Mikrokerntest

Mikrokerne entstehen bei Chromosomen-Strangbrüchen während der Zellteilung oder durch den Verlust von Chromosomen während der Anaphase (Kirsch-Volders et al. 2003). In dieser Teilstudie wurde der Mikrokerntest sowohl an Erythrocyten von *Barbus barbuis* als auch *in vitro* mit RTL-W1-Zellen (Sedimentextrakte) durchgeführt, um eine mögliche mutagene Belastung der Donau bzw. der Donausedimente feststellen zu können. Für die RTL-W1-Zellen musste der Mikrokerntest zunächst unter Verwendung einer Monosubstanz etabliert werden.

3.8.1.1 Mikrokerntest *in vitro* mit der Zelllinie RTL-W1

4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO): Zur Etablierung des Mikrokerntests mit RTL-W1-Zellen wurde zunächst als Referenzsubstanz 4-NQO auf sein Potential hin untersucht, Mikrokerne zu induzieren. Hierfür wurden in drei unabhängigen Testansätzen mit 4-NQO die auftretenden Anomalien (z.B. Kerndeformationen, Blebbing, kondensiertes Chromatin und Plasmabrücken zwischen Kernen) und

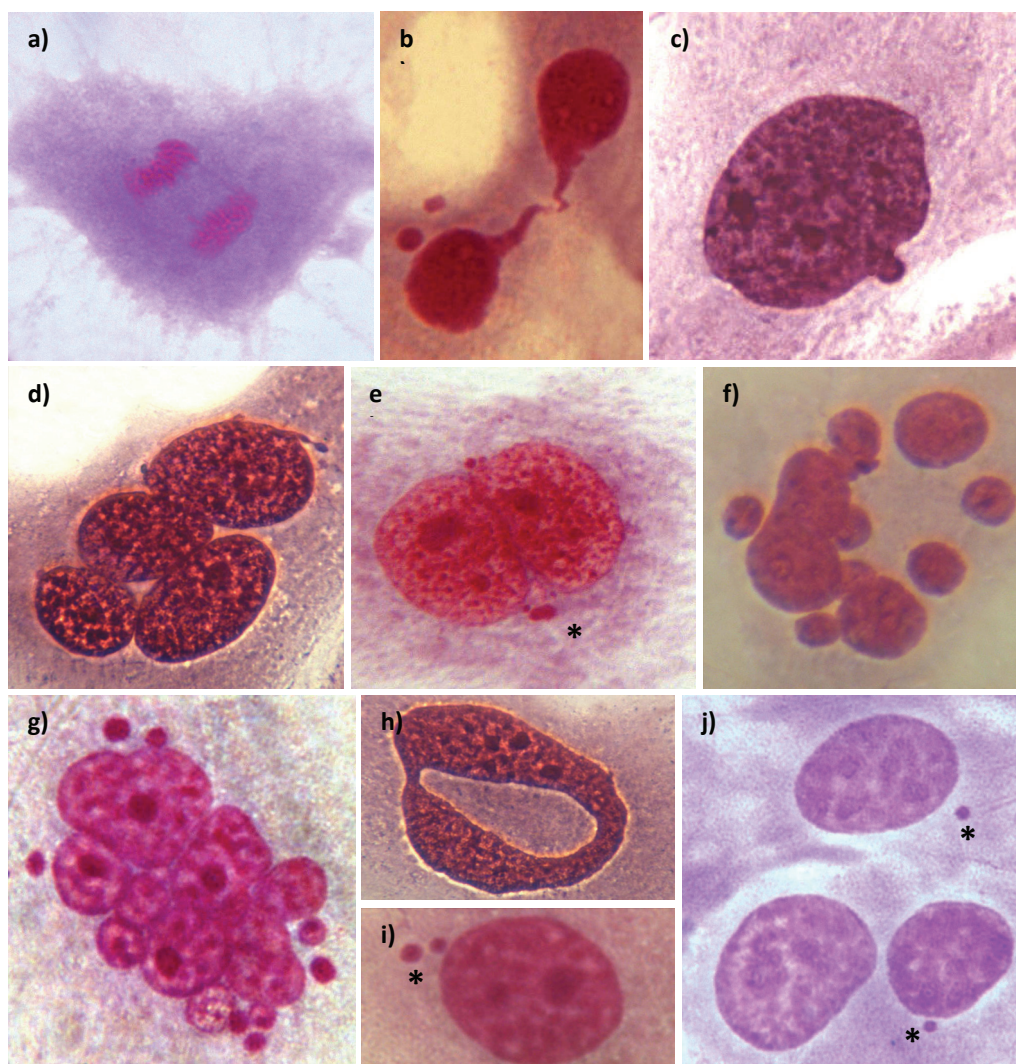


Abb. 3.30: Anomalien bei RTL-W1-Zellen nach Belastung mit 4-NQO. **a)** kondensiertes Chromatin (Anaphase), **b)** Plasmabrücke zwischen zwei Zellkernen (Zellen sind nicht vollständig getrennt), **c)** Kernmodifikation („Nase“), **d)** Polynukleierter Kern (Polynukleus); **e)** Binukleierter Kern mit Mikrokern, **f)** Blebbing, Kerndeformation, **g)** Kern fragmentiert, Fragmente mit stark kondensiertem Chromatin, Zellen abgerundet, **h)** Zellkernanomalie, **i)** Zellkern mit zwei Mikrokernen, **j)** Zwei Zellkerne mit Mikrokernen, eine normal entwickelte Zelle (Giemsa-Färbung, x 1220). * = Mikrokern; Bilder aus Böttcher (2005).

Mikrokerne in verschiedenen Konzentrationen dokumentiert (Abb. 3.30), wobei in den beiden ersten Ansätzen zwei Replika erstellt wurden und im dritten Ansatz nur ein Durchgang getestet werden konnte. Außerdem wurde die relative Häufigkeit sowohl der Mikrokerne als auch der nachweisbaren Anomalien berechnet (Tab. 3.16). Hierbei konnte stets ein dosisabhängiger Anstieg der Effekte beobachtet werden. Pro Konzentration und Replika wurden ca. 2000 Zellen ausgezählt und die Induktionsfaktoren gegenüber der Negativkontrolle berechnet (Abb. 3.31).

Tab. 3.16: Beobachtete Effekte von 4-NQO im Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen. Es wurden drei Testansätze durchgeführt, pro Testansatz und Konzentration wurden ca. 2000 Zellen ausgewertet. Tote Zellen wurden nicht in die Kalkulation des Induktionsfaktors (IF) miteinbezogen. Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

4-NQO [$\mu\text{g/L}$]	0	11,9	23,75	47,5	95	190
Mikrokerne	81	77	192	273	304	102
Anomalien (gesamt)	517	239	781	935	852	338
tote Zellen	25	0	26	85	98	128
Zellanzahl	6088	2012 *	6038	6024	6021	2002 *
Mikrokernrate [%]	1,33	3,82	3,17	4,53	5,04	5,09
Anomalierate [%]	7,53	11,87	12,93	15,52	14,15	16,88
IF _{Mikrokern}	1	2,87	2,384	3,40	3,79	3,82

* nur ein Testansatz konnte ausgewertet werden

In dieser Vorstudie konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie RTL-W1 prinzipiell geeignet ist, die Bildung von Mikrokernen anzuzeigen. Dabei wurde für 4-NQO eine eindeutig positive Dosis-Wirkungs-Beziehung mit einem signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle ab einer Konzentration von 24 $\mu\text{g/L}$ festgestellt (χ -Quadrat Test, $p < 0,05$). 4-NQO wird in eukaryotischen Zellen durch die DT-Diaphorase (NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase) zu 4-Hydroxyl-Aminoquinolin-N-Oxid bzw. 4-Acetoxy-Aminoquinolin-Oxid reduziert (Hasspieler et al. 1996, Nehls & Segner 2001, Sturve et al. 2005). In einem Vergleich mit einer früheren Studie mit RTG-2-Zellen (Schnurstein 2000) konnte für die Leberzelllinie eine um den Faktor 10 höhere Mikrokernrate nach Belastung mit 4-NQO ermittelt werden. Nehls und Segner (2001) konnten hingegen im Comet-Assay mit RTG-2 und RTL-W1 eine höhere Induktion für RTG-2-Zellen durch 4-NQO nachweisen. Jedoch wurde in dieser Arbeit auch beobachtet, dass der Gehalt an DT-Diaphorase in RTL-W1-Zellen deutlich höher war als in RTG-2-Zellen, weshalb die Autoren im Grunde eine höhere Induktion von den RTL-W1-Zellen erwartet hätten. Interessanterweise wurde in einer anderen Studie von Hasspieler et al. (1996) bei einem Vergleich einer menschlichen Zelllinie (HepG2) mit einer Fischzelllinie (Brown Bullhead Fibroblasten) durch Inhibition der DT-Diaphorase durch Dicoumarol folgendes festgestellt: Durch die Hemmung der DT-Diaphorase wurde in HepG2-Zellen die gentoxische Aktivität von 4-NQO erhöht. In der Fischzelllinie hingegen wurde der gegenteilige Effekt beobachtet: Die Hemmung der Reduktase führt zu einer Abnahme der Gentoxizität.

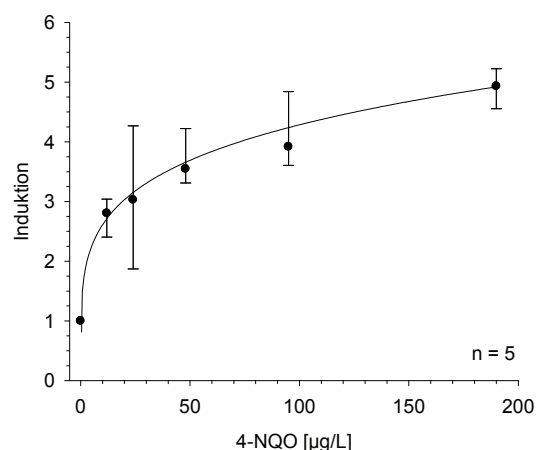


Abb. 3.31: Mutagene Wirkung von 4-NQO im Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen, dargestellt als Induktionsfaktoren in Abhängigkeit der Konzentration. Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

Dies bedeutet, dass die DT-Diaphorase den gentoxischen Effekt von 4-NQO in Fischzellen steigert. Darin könnte auch der Grund für die höhere Induktionsrate im Mikrokerntest der RTL-W1-Zellen im Vergleich zu RTG-2-Zellen liegen, da RTL-W1-Zellen bekanntermaßen über eine höhere Biotransformationskapazität verfügen als RTG-2-Zellen (Behrens et al. 2001, Bols et al. 1999, Brack et al. 1999, Nehls & Segner 2001, Segner et al. 2000). Nehls und Segner (2001) führten die niedrigere Induktion im Comet-Assay in RTL-W1-Zellen ebenfalls auf eine bessere Ausstattung mit Reparatur-enzymen in dieser Zelllinie zurück.

Induktion von Mikrokernen durch Sedimentextrakte: Alle Donauextrakte bewirkten einen signifikanten Anstieg der Mikrokerninduktion gegenüber der Negativkontrolle (χ -Quadrat Test, $p < 0,05$; Tab. 3.17). Einen sehr hohen Anstieg des Induktionsfaktors in niedrigen Konzentrationen wiesen die Extrakte aus der Schwarzach (IF = 3,5 bei 10 mg SEQ/ml), von Rottenacker (IF = 2,6 bei 2,5 mg SEQ/ml) und Ehingen (IF = 2,3 bei 2,5 mg SEQ/ml) auf. Deutliche Unterschiede zwischen den Proben zeigten sich im Verlauf der Dosis-Wirkungskurven: Die Induktion der Extrakte von Schwarzach, Rottenacker und Ehingen stieg innerhalb der niedrigsten Konzentrationen zunächst sehr stark an, stagnierte jedoch in höheren Konzentration (Ehingen ab ca. 5 mg SEQ/ml Ansatz) oder fiel auf das Induktionsniveau der Kontrollen ab (Sigmaringen, Schwarzach und Rottenacker). Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich eine cytotoxische Wirkung der Extrakte, die einen gentoxischen Effekt überlagert. Verdeutlicht wird diese durch die Überlagerung der beiden Diagramme aus dem Cytotoxizitäts- und Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen, hier exemplarisch dargestellt für die Probe aus dem Zufluss Schwarzach (Abb. 3.32). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass bei zunehmender Konzentration die Vitalität der Zellen stark abnimmt, und damit die Induktion von Mikrokernen in höheren Konzentrationen von diesem cytotoxischen Effekt verhindert wird. In den Diagrammen der Proben von Lauchert, Riedlingen und Öpfingen ist ein stetiger Anstieg der Induktion zu erkennen.

Tab. 3.17: Induktionsfaktoren für die Donausedimentextrakte, ermittelt als Quotient aus den Mikrokernraten in RTL-W1-Zellen aus Probe und Kontrolle, in Abhängigkeit der Konzentration. Grau unterlegte Werte geben den IF_{max} wieder. Der mit # markierte Wert ist nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (χ^2 Test, $p < 0,05$). Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

[mg SEQ/ml]	1,25	2,5	5	10	20	40
Sigmaringen	-	2,09	2,38	2,32	3,19	0,81
Lauchert	-	0,84	1,03	0,99	1,81	2,68
Riedlingen	-	1,75	1,72	2,03	2,56	3,44
Schwarzach	-	0,84 [#]	1,47	3,45	0,91	-
Rottenacker	1,89	2,60	0,58	0,59	-	-
Ehingen	-	2,30	2,45	2,45	2,59	1,63
Öpfingen	1,19	1,24	1,68	1,74	-	-
Ingolstadt	-	1,91	2,14	2,22	2,87	-
Bad Abbach	-	1,99	2,26	2,59	2,64	-
Jochenstein	-	1,98	2,38	2,61	3,38	-

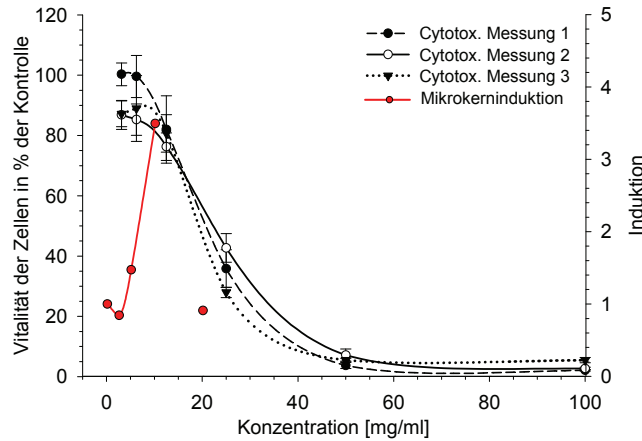


Abb. 3.32: Gegenüberstellung der Cytotoxizität und der Mikrokerninduktion mit RTL-W1-Zellen. Mit einsetzendem cytotoxischen Effekt wird die Mikrokerninduktion verhindert. Datengrundlage: Böttcher et al. (2007) und Grund et al. (2007).

Wie auch schon beim Ames-Test (vgl. Abs. 3.7.1), würde ein Ranking der Standorte unter Verwendung des maximalen Induktionsfaktors (IF_{max}) dazu führen, dass Proben mit vergleichsweise geringem IF_{max} in niedrigen Konzentrationen unterbewertet würden, da durch cytotoxische Effekte in höheren Konzentrationen die Bestimmung höherer Induktionsfaktoren nicht möglich war (Bsp. Rottenacker). Im Gegensatz zum Ames-Test bietet sich für den Mikrokernetest durch die Verwendung und Erstellung einer 4-NQO-Standardkurve (Abb. 3.31) die Möglichkeit (in Anlehnung an die Vorgehensweise im DR-CALUX- und EROD-Assay), für jede Probe ein 4-NQO-Äquivalenzkonzentration in Abhängigkeit des IF_{25} bzw. IF_{50} (Induktionsfaktor bei 25 % oder 50 % der maximalen Induktion) zu berechnen (4-NQO- EQ_{IF25} bzw. 4-NQO- EQ_{IF50} ; Tab. 3.18). Des Weiteren ist es möglich, jeden Induktionsfaktor der entsprechenden Konzentration einer Probe in die 4-NQO-Standardkurve zu übertragen und die daraus resultierende 4-NQO-Konzentration in die folgende Formel einzusetzen:

$$\mu\text{g 4-NQO Äquivalent/g Sediment} = 4\text{-NQO } [\mu\text{g/L}] / \text{Extraktkonzentration [g/L]}$$

Damit kann in Abhängigkeit der Induktion jeder Probenkonzentration die 4-NQO-Äquivalenzkonzentration (4-NQO- EQ_{IFKonz}) berechnet werden. Aus den so ermittelten 4-NQO- EQ_{IFKonz} kann dann der Mittelwert gebildet werden (**Tab. 3.18**).

Tab. 3.18: 4-NQO-Äquivalenzkonzentrationen der Donau-Sedimentextrakte, ermittelt in Abhängigkeit von: a) der 25 bzw. 50 %-igen maximalen Induktion von 4-NQO (4-NQO- $EQ_{IF25/50}$), b) jedem Induktionsfaktor der verschiedenen, verwendeten Extraktkonzentrationen (4-NQO- EQ_{IFKonz}). Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

	4-NQO- EQ_{IF25}		4-NQO- EQ_{IF50}		MW 4-NQO- EQ_{IFKonz}	
	[$\mu\text{g/g}$]	Rang	[$\mu\text{g/g}$]	Rang	[$\mu\text{g/g}$]	Rang
Sigmaringen	2,14	2	0,94	4	0,93	6
Lauchert	0,16	10	0,38	8	0,09	10
Schwarzach	0,65	7	1,83	2	1,45	2
Riedlingen	0,56	8	0,57	5	0,60	9
Rottenacker	2,64	1	5,6	1	3,10	1
Ehingen	2,04	3	n.b.	-	1,33	3
Öpfingen	0,38	9	0,4	7	0,79	8
Ingolstadt	1	6	0,47	6	0,80	7
Bad Abbach	1,5	4	n.b.	-	1,04	5
Jochenstein	1,4	5	1,31	3	1,08	4

MW = Mittelwert; n.b. = nicht bestimmbar

Durch den Vergleich der Ränge zwischen den drei Verfahren zur Bildung der 4-NQO-EQ ergibt sich die beste Übereinstimmung zwischen den Werten aus 4-NQO-EQ_{IF50} und 4-NQO-EQ_{IFKonz}. Im 4-NQO-EQ_{IF50} Verfahren konnten jedoch durch den Dosis-Wirkungsverlauf für die Proben Ehingen und Öpfingen keine Äquivalenzkonzentration bestimmt werden. Auch scheint das 4-NQO-EQ_{IF25} Verfahren ungeeignet zu sein, um die tatsächlichen Äquivalenzkonzentrationen der Proben zu ermitteln, da durch die Dosis-Wirkungs-Beziehung in der Schwarzach (vgl. Abb. 3.32) eine sehr hohe Induktion erst in späteren Konzentrationen auftritt und aufgrund dessen eine unverhältnismäßig geringe Äquivalenzkonzentration zustande kommt. Das Verfahren auf Basis der 4-NQO-EQ_{IFKonz} scheint daher am geeignetsten, um das gentoxische Schädigungspotential der Sedimentextrakte zu erfassen, da es auch den Dosis-Wirkungsverlauf einer gentoxischen Induktion miteinbezieht. Damit ergibt sich die höchste Induktion für den Standort Rottenacker, und die niedrigste für den Zufluss Lauchert.

3.8.1.2 Mikrokerntest *in vivo* mit Erythrocyten aus der Barbe

An den Donaustandorten Sigmaringen, Riedlingen, Rottenacker und Ehingen wurde von den dort gefangenen Barben (*Barbus barbus*, n = 5) Blut entnommen und die Mikrokernrate in den Erythrocyten bestimmt. Sie wurde als Quotient aus der Anzahl der Mikrokern durch die Gesamtzahl der gezählten Erythrocyten berechnet. Der Prozentsatz der Mikrokern (MN [%]; Abb. 3.33) war in Rottenacker am höchsten (0,31 %) und sowohl in Ehingen (0,28 %) als auch in Riedlingen (0,24 %) etwas geringer. Durch Verwendung des χ^2 Tests konnte für diese drei Standorte ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (0,06 %) ermittelt werden. Lediglich bei der Untersuchung der Barben aus Sigmaringen konnte keine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate festgestellt werden (0,14 %). Als Negativkontrolle wurden Erythrocyten aus fünf Barben aus Riedlingen verwendet, die sechs Wochen unter Laborbedingungen gehalten wurden.

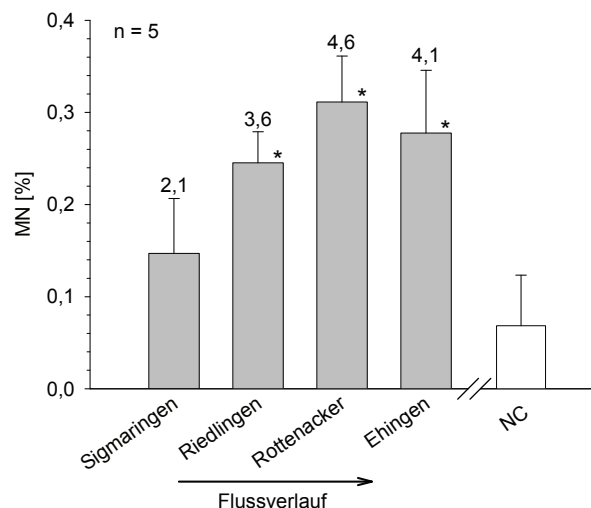


Abb. 3.33: Mikrokernrate (MN [%]) in Erythrocyten aus *Barbus barbus* von vier Donaustandorten. Je Balken wurden von 5 Barben je 2000 Erythrocyten ausgewertet. Die mit * markierten Standorte bewirkten eine signifikante Gentoxizität (χ^2 Test, $p < 0,05$) im Vergleich zu der Negativkontrolle (NC). Für jeden Standort wurde der Induktionsfaktor als Quotient aus den Mikrokernraten der Probe zur Kontrolle berechnet. Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

Der Mikrokerntest an Fischerythrocyten erwies sich bereits in früheren Studien als sensitiver, einfacher und zuverlässiger Biotest für die gentoxische Untersuchung mutagener Modellsubstanzen und komplexer Umweltproben (al-Sabti & Metcalfe 1995, Grisolia & Starling 2001, Kirsch-Volders et

al. 2003, Minissi et al. 1996). Insbesondere die *In vivo*-Untersuchung mit dem Mikrokerntest erwies sich als sehr gut geeignetes Verfahren, um die aktuelle gentoxische Belastungssituation *in situ* darzustellen. So konnten Minissi et al. (1996) bereits einen Zusammenhang zwischen der Mikrokerneln-frequenz bei frei lebenden Barben (*Barbus plebejus*) und der Gewässergüte des belasteten Tiber flussabwärts von Rom (Guzzini & Pagnotta 1990 zitiert aus Minissi 1996) und dem Mignone, einem Fluss innerhalb eines Naturreservates (Angeletti 1985 zitiert aus Minissi 1996), herstellen. Im Vergleich zur eigenen Studie ist jedoch die Anzahl der spontanen Mikrokerne der Negativkontrolle in der Studie von Minissi et al. (1996) um den Faktor 10 geringer. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Arten zurückzuführen. Selbst innerhalb einer Art kann es zu starken Schwankungen bei der Bildung von Mikrokerneln kommen, welche von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Nahrung, Gesundheit, Reproduktionsstatus und genetischem Stamm, aber auch von äußeren Bedingungen, wie z.B. der Temperatur und jahreszeitlichen Schwankungen abhängt; jedoch ist noch nicht genau bekannt, wie sich diese auf die Mikrokernelnbildung auswirken (al-Sabti & Metcalfe 1995). Um diesen Schwankungen vorzubeugen, wurden in dieser Studie weitestgehend Barben mit derselben Größe und demselben Gewicht verwendet, um einen möglichst ähnlichen Reproduktionsstatus und ein ähnliches Alter zu gewährleisten. Das Geschlecht konnte aufgrund der Jahreszeit und des geringen Alters der Barben nicht bestimmt werden.

In Abhängigkeit zur Negativkontrolle lassen sich für alle Probennahmestellen an der Donau Induktionsfaktoren berechnen und somit die eigenen Ergebnisse mit anderen Arbeiten vergleichen (Abb. 3.33). In der Studie von Minissi et al. (1996) wurde für den Tiber (Güteklasse III: kritisch belastet) eine Mikrokernelnrate von 0,032 % und für den unbelasteten Mignone von 0,015 % (Güteklasse I: unbelastet bis gering belastet) ermittelt. Aus den Daten dieser Studie lassen sich ebenfalls die Induktionsfaktoren für die beiden Flüsse berechnen (Mignone: IF = 2,9; Tiber: IF = 6,5). Vergleicht man die eigenen Werte mit denen aus der Studie von Minissi et al. (1996), so wurden in den Barben aus Rottenacker (IF = 4,6) und Ehingen (IF = 4,1) Mikrokerne verhältnismäßig geringer induziert als in den Barben aus dem Tiber, doch deutlich höher als im unbelasteten Mignone. Die Donau in Sigmaringen (IF = 2,1) ist demnach genauso unbelastet wie der Mignone. Aus der Mikrokernelninduktion der Barben-Erythrocyten aus Riedlingen (IF = 3.6) ergibt sich folglich eine geringe bis mittlere Belastung.

3.8.1.3 Vergleich *In vivo*- und *In vitro*-Mikrokernelninduktion

Im Mikrokerntest mit der Zelllinie RTL-W1 (*in vitro* mit Sedimentextrakten) und den Erythrocyten aus der Barbe (*in vivo*), kann nur zwischen den Ergebnissen von den Standorten Sigmaringen, Riedlingen, Rottenacker und Ehingen verglichen werden (Tab. 3.19). In beiden Verfahren induziert Rottenacker gefolgt von Ehingen am stärksten Mikrokerne. Ein Unterschied zwischen *In vitro*- und *In vivo*-Exposition zeigt sich jedoch zwischen den Standorten Riedlingen und Sigmaringen. Dabei ist die Gentoxizität *in vitro* für Sigmaringen höher als *in vivo*, und für Riedlingen entsprechend umgekehrt. Durch eine Rangkorrelationsanalyse zwischen den *In vitro*- und *In vivo*-Ergebnissen ergibt sich eine hohe Übereinstimmung mit einem Koeffizienten von $r_s = 0,8$. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Datenmenge viel zu gering ist, um auf eine statistische Kausalität schließen zu können. Dessen ungeachtet konnte dadurch gezeigt werden, dass die *In vitro*-Biotests mit Sedimentextrakten gut die Situation im Feld widerspiegeln.

Tab. 3.19: Vergleich der Mikrokerninduktion zwischen *In vitro*-Exposition mit RTL-W1-Zellen (Sedimentextrakte) und *In vivo*-Situation mit Erythrocyten aus der Barbe.

	<i>Barbus barbus</i>		RTL-W1	
	IF	Rang	4-NQO-EQ [$\mu\text{g/g}$]	Rang
Sigmaringen	2,1	4	0,93	3
Riedlingen	3,6	3	0,6	4
Rottenacker	4,6	1	3,1	1
Ehingen	4,1	2	1,33	2

IF = Induktionsfaktor; 4-NQO-EQ = 4-Nitroquinolin-N-oxid Äquivalenzkonzentration

3.8.2 Gentoxizität im Comet-Assay

Der Comet-Assay wurde sowohl mit acetonischen Sedimentextrakten (RTL-W1-Zellen) als auch mit nativen Sedimentproben (Embryonen von *Danio rerio*) durchgeführt. In beiden Ansätzen wurde darauf geachtet, dass nur Konzentrationen eingesetzt wurden, die keine akuten cytotoxischen bzw. embryotoxischen (nach 72 h) Effekte induzierten.

3.8.2.1 Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1

Alle Sedimentextrakte wurden in zwei voneinander unabhängigen Replika getestet. Bei der Darstellung des Tail-Moments wiesen nahezu alle Proben eine gentoxische Wirkung mit einer eindeutigen Dosis-Wirkungsbeziehung auf (Abb. 3.34a; detailliert dargestellt in Böttcher (2005)). Für die Extrakte aus Rottenacker, Öpfingen und der Schwarzach wurde in allen Konzentrationen eine signifikant gentoxische Wirkung festgestellt. Für die Probe aus dem Zufluss Lauchert konnte im Vergleich zu allen anderen Proben eine nur geringfügige gentoxische Wirkung beobachtet werden.

Ranganalyse: Zur besseren Vergleichbarkeit der Resultate wurde für beide Testdurchgänge der maximale Induktionsfaktor (IF_{max}) und die LOEC bestimmt sowie der entsprechende Durchschnitt aus beiden Messungen gebildet (Tab. 3.20). Die LOEC-Werte wurden als Alternative zum IF_{max} angegeben, da dieser bei der Ermittlung der Gentoxizität die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes nicht berücksichtigt. Des Weiteren wurden die Ränge für alle Standorte jeweils aus dem IF_{max} und aus der LOEC bestimmt. Bei gleicher LOEC entschied die Höhe des entsprechenden Induktionsfaktors über den Rang. Vergleicht man die beiden Methoden zur Ermittlung des Ranges, so zeigte sich, dass in beiden Methoden den höchsten Rang Rottenacker, den zweitniedrigsten Riedlingen und den niedrigsten die Lauchert einnimmt. Trotz dieser Kongruenz ist die Bestimmung des Ranges mittels der LOEC sehr viel exakter, da sie die Konzentrationsabhängigkeit des gentoxischen Effektes in der Bewertung berücksichtigt und dadurch ein realistischeres Abbild des gentoxischen Potentials liefert. So würde beispielweise das gentoxische Schädigungspotential unter Verwendung des IF_{max} von Sigmaringen ($\text{IF}_{\text{max}} = 18,15$ bei 40 mg SEQ/ml) deutlich höher bewertet werden als jenes von Öpfingen ($\text{IF}_{\text{max}} = 12,8$ bei 20 mg SEQ/ml), obwohl eine signifikante Induktion durch die Probe aus Öpfingen ($\text{IF} = 4$ bei 2,5 mg SEQ/ml) schon deutlich früher vorhanden ist als in Sigmaringen ($\text{IF} = 3,35$ bei 10 mg SEQ/ml).

Tab. 3.20: Maximale Induktionsfaktoren und LOEC-Werte (mg SEQ/ml) mit den entsprechenden Induktionsfaktoren der Donau-Sedimentextrakte im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1. Bei Werten mit < wurde keine niedrigere Verdünnung getestet. Datengrundlage: Böttcher et al. (2007).

	Messung 1			Messung 2			Durchschnitt			Ränge	
	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC
Sigmaringen	9,7	10	6,1	26,6	20	6,9	18,15	15	6,5	2	8
Lauchert	2,1	< 5	2,1	2,1	40	2,1	2,1	22,5	2,1	10	10
Schwarzach	6,8	< 2,5	3,9	17,4	< 2,5	3,7	12,1	< 2,5	3,8	6	3
Riedlingen	5,3	10	3,4	7,5	20	7,5	6,4	15	5,45	9	9
Rottenacker	31,9	< 2,5	18,4	40,0	< 2,5	2,3	35,9	< 2,5	10,35	1	1
Ehingen	15,5	5	2,8	14,7	5	3,5	15,1	5	3,15	3	4
Öpfingen	12,1	< 2,5	3,0	13,6	< 2,5	5,0	12,8	< 2,5	4,0	5	2
Ingolstadt	11,4	< 5	2,3	15,2	10	3,3	13,3	7,5	2,8	4	5
Bad Abbach	4,8	10	2,9	9,0	< 5	3,0	6,9	7,5	2,95	8	6
Jochenstein	11,1	10	2,8	8,4	10	1,8	9,7	10	2,3	7	7

IF_{max} = maximaler Induktionsfaktor; LOEC = Lowest Observed Effect Concentration; IF_{LOEC} = Induktionsfaktor der LOEC

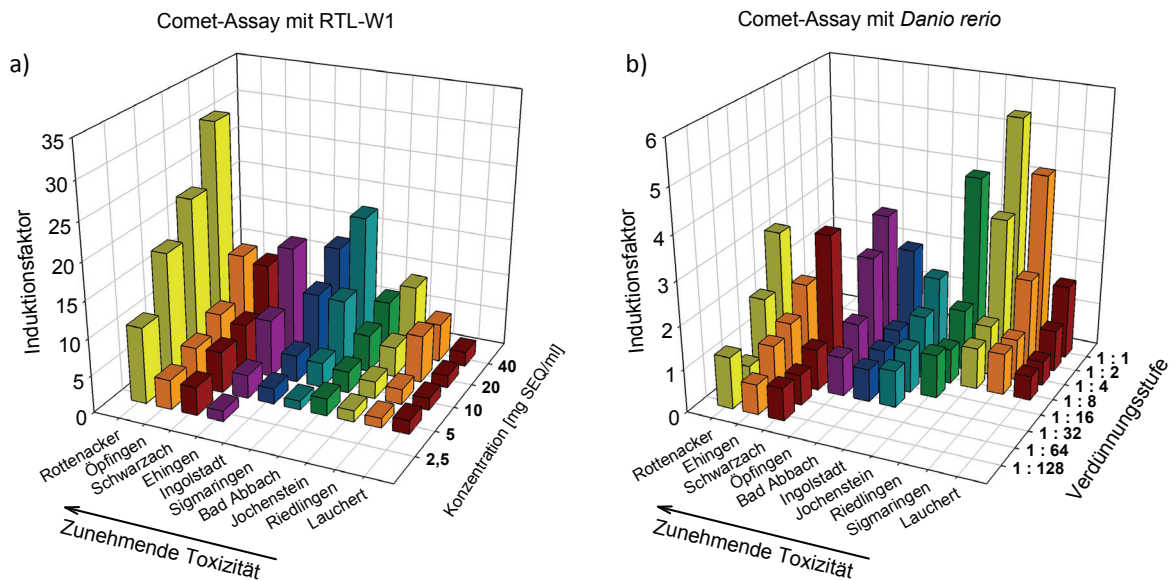


Abb. 3.34: Induktionsfaktoren im Comet-Assay, ermittelt aus je zwei unabhängigen Tests: **a)** Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen und Sedimentextrakten (Böttcher et al. 2007), **b)** Comet-Assay mit *Danio rerio* und nativem Sediment (Seitz et al. 2007). 1:1 Verdünnungsstufe entspricht 600 mg Sediment/ml.

3.8.2.2 Comet-Assay mit Embryonen von *Danio rerio*

Alle Proben wiesen auch hier eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung auf, die sich in der konzentrationsabhängigen Zunahme der Induktionsfaktoren widerspiegelt (Abb. 3.34b). In beiden unabhängig durchgeführten Tests konnte eine hohe Übereinstimmung der Induktionsfaktoren beobachtet werden (detailliert dargestellt in Seitz (2005)). Bei allen Standorten unterschied sich die Induktion in ein bis drei Verdünnungen signifikant von denen der Negativkontrolle. Lediglich die Probe aus der Lauchert erwies sich nur in einem der beiden Durchgänge im unverdünnten Sediment als signifikant gentoxisch (IF = 2,1). Die Proben aus Rottenacker hingegen erwiesen sich bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:32 als signifikant gentoxisch.

Tab. 3.21: Maximale Induktionsfaktoren und LOEC-Werte (mg SEQ/ml) mit den entsprechenden Induktionsfaktoren der Donau-Sedimentextrakte im Comet-Assay mit Embryonen von *Danio rerio*. Datengrundlage: Seitz et al. (2007).

	Messung 1			Messung 2			Durchschnitt			Ränge	
	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC	IF _{LOEC}	IF _{max}	LOEC
Sigmaringen	4,6	300	1,9	3,8	300	2,2	4,2	300	2,05	1	9
Lauchert	2,1	600	2,1	1,3	> 600	n.b.	1,7	(600)*	(2,1)*	10	10
Schwarzach	2,3	37,5	2,3	4,3	37,5	4,3	3,3	37,5	3,3	5	3
Riedlingen	5,4	300	4,2	2,5	300	2,5	3,95	300	3,35	3	8
Rottenacker	1,9	18,75	1,7	4,4	18,75	2,1	3,15	18,75	1,9	6	1
Ehingen	2,2	37,5	2,2	2,1	18,75	2,0	2,15	28,1	2,05	8	2
Öpfingen	2,2	75	2,2	4,5	75	3,0	3,35	75	2,55	4	4
Ingolstadt	2,5	150	2,5	1,6	150	1,6	2,05	150	2,05	8	6
Bad Abbach	3,4	150	3,4	1,8	150	1,8	2,6	150	2,6	7	5
Jochenstein	3,4	300	3,4	5,0	300	5,0	4,2	300	4,2	1	7

IF_{max} = maximaler Induktionsfaktor; LOEC = Lowest Observed Effect Concentration; IF_{LOEC} = Induktionsfaktor der LOEC

* Werte nur aus einem Durchgang ermittelt

Ranganalyse: Wie bereits im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1, wurde auch in dieser Testvariante der IF_{max} und die LOEC bestimmt (Tab. 3.20). Ferner wurden auch für die nativen Donauproben Ränge zur Bewertung durch den IF_{max} und der LOEC ermittelt. Dabei waren die Unterschiede zwischen diesen beiden Bewertungsansätzen noch deutlicher als beim Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen. So würden z.B. die Proben aus Sigmaringen und Jochenstein nach dem IF_{max} deutlich überbewertet werden. Beide weisen zwar den höchsten IF_{max} auf, jedoch bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen. Die Probe aus Rottenacker würde hingegen durch den IF_{max} deutlich unterbewertet, da diese bereits bei einer Konzentration 18,75 mg/ml (entspricht einer 1:32 Verdünnung) einen signifikanten Effekt aufweist (Abb. 3.34b). In der Ranganalyse wurde diese Probe hingegen mit dem höchsten gentoxischen Potential bewertet.

3.8.2.3 Bewertung der gentoxischen Effekte im Comet-Assay

Während bei akuten Toxizitätstests seit langem über die Verwendung von EC₅₀- (EC = Effect Concentration) und LOEC-Werten die konzentrationsabhängige Toxizität gut aggregiert werden und daher auch für direkte Vergleiche unterschiedlicher Proben eingesetzt werden können, besteht im Bereich der spezifischen Wirktests ein großer Entwicklungsbedarf hinsichtlich solcher Aggregationsindices. Derzeit werden z.B. in Gentoxizitätstests (wie dem Comet-Assay, Ames-Test oder Mikrokern-test) häufig Induktionsfaktoren bei einer ausgewählten Konzentration, der maximale Induktionsfaktor oder die LOEC als Maß für die Intensität der Gentoxizität bzw. Mutagenität eingesetzt. Die Bestimmung der LOEC in Kombination mit dem entsprechenden Induktionsfaktor erlaubt im Gegensatz zum maximalen Induktionsfaktor eine konzentrationsabhängige Aussage über die gentoxische Wirkung einer Probe. Der Nachteil der LOEC liegt jedoch darin, dass sie keine Aussage über die Effekthöhe treffen kann. Durch den maximalen Induktionsfaktor hingegen wird zwar die Höhe der Gentoxizität angegeben, aber die Konzentrationsabhängigkeit eines gentoxischen Effektes wird gänzlich vernachlässigt. Um dennoch die eigenen Ergebnisse exakt bewerten zu können, wurde in dieser Studie zunächst eine Ranganalyse auf Basis der LOEC durchgeführt (Tab. 3.20 und 3.21). Diese Analyse erlaubt zwar eine Beurteilung der eigenen Proben, aber der Vergleich mit anderen Studien ist dadurch nicht möglich, da es sich um ein ortsgebundenes Bewertungssystem handelt. Außerdem wird durch eine Ranganalyse ebenfalls die Höhe der gemessenen Effekte nicht wiedergegeben.

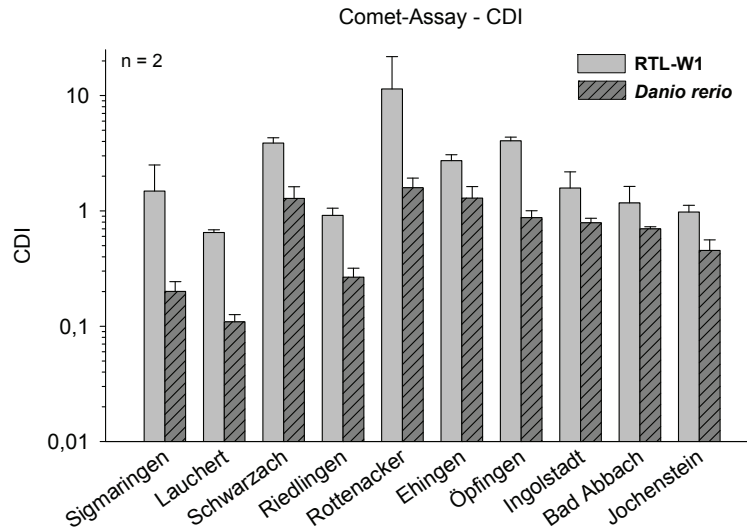


Abb. 3.35: Gentoxizität im Comet-Assay, angegeben als CDI (Concentration Dependent Induction Factor). Der CDI wurde als Summe der einzelnen Quotienten aus Induktionsfaktor und der zugehörigen Sedimentkonzentration aus zwei unabhängigen Durchgängen berechnet. Datengrundlage: Böttcher (2005) und Seitz (2005).

Aufgrund der Defizite der bisher beschriebenen Indices und Bewertungsmethoden zur Darstellung der Gentoxizität wurde von Seitz et al. (2007) ein konzentrationsabhängiger Induktionsfaktor (CDI = Concentration Dependent Induction Factor) vorgeschlagen. Der CDI vereinigt demnach die wichtigsten Informationen (Dosis-Wirkungs-Verlauf und Höhe des Effektes) in einem einzigen Indexwert, und soll so die Grundlage für einen allgemeinen Vergleich der Gentoxizität im Comet-Assay schaffen. Um alle getesteten Konzentrationen – auch die nicht signifikant gentoxischen – und ihre Induktionsfaktoren gleichermaßen zu berücksichtigen, wurde der CDI für jeden Standort nach der folgenden Formel berechnet und in Abbildung 3.35 graphisch dargestellt:

$$CDI = \sum_{i=1}^n \frac{IF_i}{C_i} \quad \begin{array}{l} IF_i = \text{Induktionsfaktor der Konzentration } i \\ C_i = \text{Konzentration } i \text{ (1 - n)} \end{array}$$

Demnach kommt es beim Comet-Assay mit *Danio rerio* zu einer geringfügigen Abweichung der Ränge, wenn man die Ergebnisse der LOEC- und der CDI-Bewertung gegenüberstellt. Lediglich die Proben aus Ingolstadt und Bad Abbach tauschen die Ränge. Die Abweichung dieser beiden Bewertungsverfahren im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen ist hingegen etwas deutlicher. Durch die Verwendung des CDIs verschiebt sich der Rang des Standortes Sigmaringen um zwei Positionen sowie der Rang der Proben aus Jochenstein und Bad Abbach um je eine Position (Tab. 3.22). Aus Abbildung 3.36 wird auch deutlich, dass durch den CDI eine realistischere Darstellung des gentoxischen Potentials der getesteten Proben ermöglicht wird, da er wichtige Informationen aus der Dosis-Wirkungs-Kurve sowie der Höhe der Induktion berücksichtigt. Dies wird insbesondere durch die

Tab. 3.22: Vergleich der Ränge, die sich durch die unterschiedlichen Bewertungsverfahren nach dem CDI und LOEC im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen und *Danio rerio* ergeben. Fette Zahlen zeigen an, wenn der Rang durch die beiden Verfahren verändert wurde.

	RTL-W1		<i>Danio rerio</i>	
	CDI	LOEC	CDI	LOEC
Sigmaringen	6	8	9	9
Lauchert	10	10	10	10
Schwarzach	3	3	3	3
Riedlingen	9	9	8	8
Rottenacker	1	1	1	1
Ehingen	4	4	2	2
Öpfingen	2	2	4	4
Ingolstadt	5	5	5	6
Bad Abbach	7	6	6	5
Jochenstein	8	7	7	7

Probe aus Sigmaringen verdeutlicht, die durch den CDI aufgrund ihres steilen Kurvenverlaufs als deutlich gentoxischer eingestuft wird als durch die Bewertung mit Hilfe der LOEC (Abb. 3.36b).

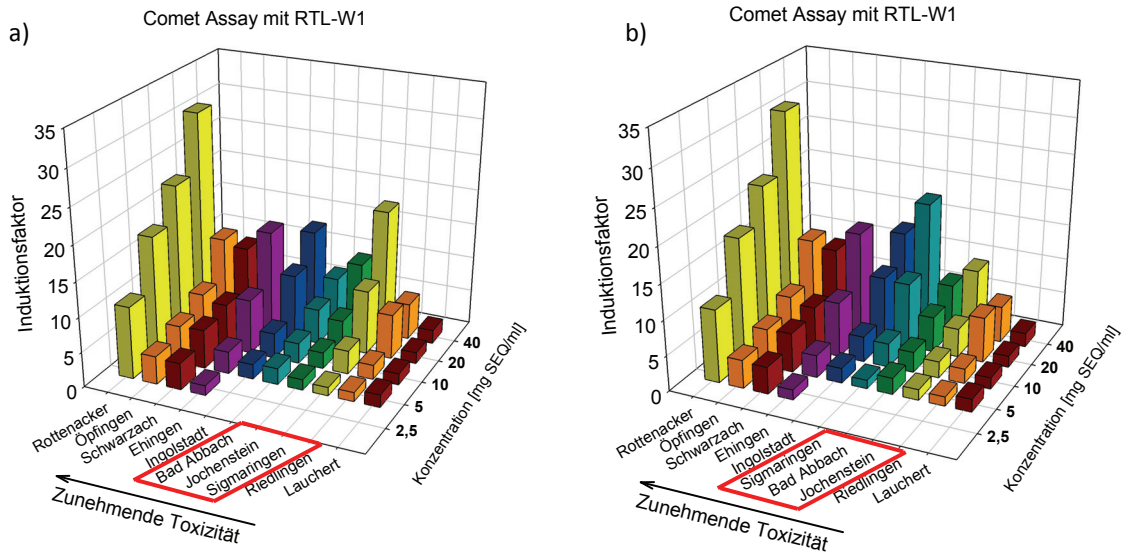


Abb. 3.36: Induktionsfaktoren im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1. Sortierung der Standorte nach ihrer Gentoxizität unter der Berücksichtigung der Ranganalyse auf Basis **a)** der LOEC und **b)** des CDI. Markiert sind die Standorte, bei denen sich die Position im Ranking verändert hat. Datengrundlage: Böttcher (2005).

Bei einer näheren Betrachtung der Kalkulation des CDIs zeigt sich jedoch, dass niedrigere Konzentrationen durch den CDI stärker gewichtet werden als höhere Konzentrationen. Besonders deutlich wird dies, wenn man den CDI für jede einzelne Konzentration ($CDI_{Konz.}$) berechnet und im Vergleich mit dem entsprechenden Induktionsfaktor graphisch darstellt. In Abbildung 3.37 wurde dies exemplarisch für die Standorte Rottenacker und Sigmaringen durchgeführt. Es ist deutlich ersichtlich, dass mit zunehmender Konzentration der $CDI_{Konz.}$ entweder teilweise (Sigmaringen) oder gänzlich (Rottenacker) abfällt.

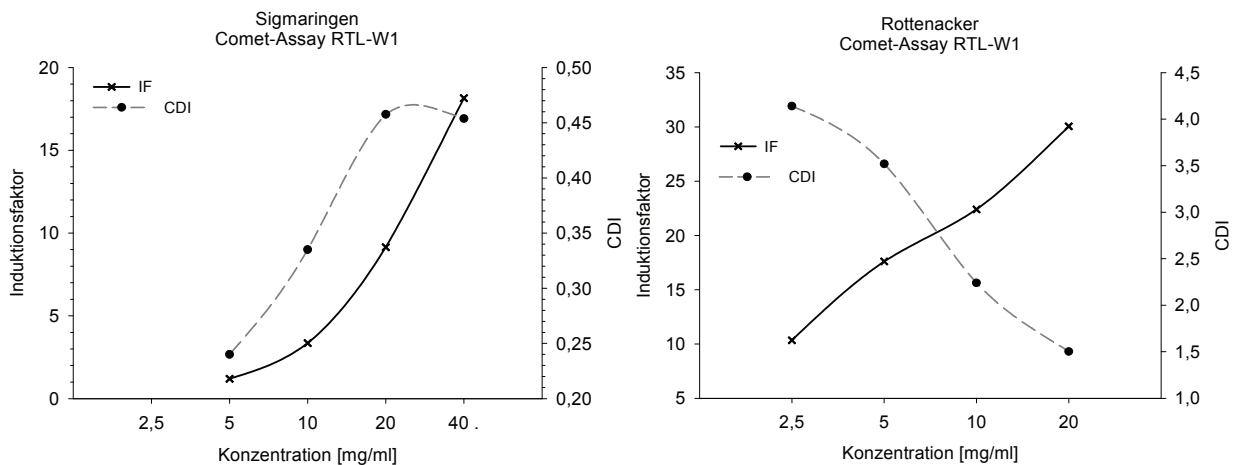


Abb. 3.37: Vergleich des Dosis-Wirkungsverlaufs des CDIs und des Induktionsfaktors (IF) der Proben aus Sigmaringen und Rottenacker.

Noch deutlicher wird die Überbewertung niedriger Konzentrationen durch ein einfaches Beispiel. Hierbei werden drei fiktive Proben verglichen, deren Dosis-Wirkungsabhängiger gentoxischer Effekt in Abbildung 3.38 dargestellt ist. Aus dem Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass die Probe 2 ($CDI = 0,84$) mit zunehmender Konzentration die höchste Induktion entwickelt. Die Probe 3 verfügt zwar in niedrigeren Konzentrationen über höhere Induktionsfaktoren, der Kurvenverlauf

ist jedoch deutlicher flacher, wodurch letztlich der gentoxische Effekt als geringer einzuschätzen ist als für die beiden anderen Proben. Durch den CDI wird jedoch diese Probe 3 (CDI = 1,56) als deutlich gentoxischer bewertet. Die Absicht durch die Einbeziehung der Konzentration in den Induktionsfaktor eine genauere Aussage über das gentoxische Potential einer Probe zu erhalten, verursacht das genaue Gegenteil: Eine Verfälschung des Dosis-Wirkungs-Verlaufs durch Überbewertung gentoxischer Effekte bei niedrigeren Konzentrationen. Jedoch muss bedacht werden, dass gentoxische Effekte in niedrigeren Konzentrationen auch stärker berücksichtigt werden sollten, da diese über eine höhere ökologische Relevanz verfügen.

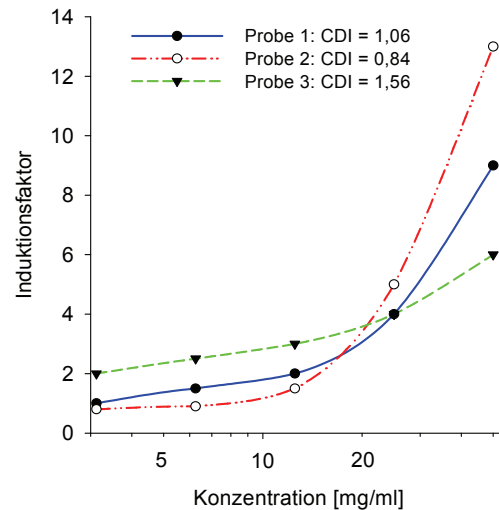


Abb. 3.38: Dosis-Wirkungsabhängiger gentoxischer Effekt von drei fiktiven Proben und deren berechneter CDI.

Ein weiterer Nachteil des CDIs ergibt sich, wenn Proben miteinander verglichen werden sollen, in deren Kalkulation des CDIs eine unterschiedliche Anzahl an Konzentrationen berücksichtigt wurde, da bei der Berechnung des CDI die Summe aus den einzelnen $CDI_{Konz.}$ gebildet wird (je mehr Konzentrationen umso höher der CDI; Seitz et al. (2007)). Es wäre jedoch zu überlegen, ob die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den einzelnen $CDI_{Konz.}$ diesen Nachteil ausgleichen könnte. Diese Vorgehensweise würde auch dazu führen, dass die höhere Gewichtung von niedrigeren Konzentrationen kompensiert würde. Dessen ungeachtet ist der CDI nicht als absolute Angabe der Gentoxizität einer Probe zu verstehen, sondern dient lediglich dem Vergleich verschiedener Proben untereinander, welche jeweils nach einem standardisierten Verfahren im Comet-Assay getestet wurden. Aufgrund der einfachen, vergleichbaren Darstellungsweise überwiegen die Vorteile des CDIs gegenüber den Vorteilen anderer bisher verwendeter Bewertungsverfahren, wie die LOEC- und Induktionsfaktor-basierten Ansätze (Seitz et al. 2007). In weiteren Studien sollte jedoch über die Verwendung einer Substanz nachgedacht werden, die über eine sehr hohe bzw. die höchste gentoxische Wirkung im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 verfügt, um damit die Möglichkeit zu erhalten eine Äquivalenzkonzentration zu ermitteln. Eine solche Bestimmung von Äquivalenzkonzentrationen ist bei anderen Biotests, z.B. der EROD-Induktion mit 2,3,7,8-TCDD-Äquivalenten, schon lange gebräuchlich (Brack et al. 2000, Engwall et al. 1996).

3.8.2.4 Vergleich der beiden eingesetzten Comet-Assay-Varianten

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Comet-Assay in zwei unterschiedlichen Varianten durchgeführt. Im Verfahren mit der Zelllinie RTL-W1 wird durch die Verwendung von Sedimentextrakten die potentiell gentoxische Schädigung untersucht, die von einer Probe ausgehen kann. Mittels der Exposition von Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) gegenüber nativen Sedimentproben wird hingegen das biologisch verfügbare, gentoxische Schädigungspotential von Sedimenten geprüft (Hollert et al. 2003, Kosmehl et al. 2004). Ungeachtet dieser verschiedenen Expositionspfade ergab eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman eine hohe Übereinstimmung dieser beiden Varianten des Comet-Assay mit einem Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,88$ ($p < 0,05$). Betrachtet man jedoch die Regressionsanalyse (Abb. 3.39), ist auch eine deutliche Clusterbildung zu erkennen, sowie dass meist ein hoher Effekt in *Danio rerio* auch mit einem hohen Effekt in den RTL-W1-Zellen

einhergeht. Vergleicht man außerdem die Höhe der gentoxischen Induktion, so ergibt sich, dass das bioverfügbare Schädigungspotential aus dem Test mit *Danio rerio* für die meisten Proben durchschnittlich etwa um einen Faktor 10 niedriger lag als das im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen. Die deutlich niedrigere Induktion durch die nativen Proben ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass hier nur die biologisch verfügbaren Stoffe erfasst werden (Hollert et al. 2003). Jedoch kann aufgrund der hohen Korrelation und der zum Teil beträchtlichen Induktionsfaktoren in selbst sehr hohen Verdünnungsstufen von einem erheblichen gentoxischen Risiko für einige Standorte (Schwarzach, Rottenacker, Ehingen und Öpfingen) ausgegangen werden.

Die Embryonen des Zebrafisches werden bis zum Schlupf wenigstens teilweise durch das Chorion vor lipophilen Schadstoffen geschützt (Braunbeck et al. 2005). Besonders in den höheren Sedimentkonzentrationen war durch die Entwicklungsverzögerung bei den Embryonen im Fischeitest nur eine geringe Schlupfrate gegeben, so dass das biologische Schädigungspotential vermutlich nur unzureichend wiedergegeben wurde. In der vorliegenden Studie wurden die Larven 72 h mit nativen Sedimenten belastet, um so wenigstens den Schlupf eines Großteils der Tiere zu garantieren. Ferner ist der Stoffwechsel der Embryonen nach 72 h weiter entwickelt und ermöglicht somit eine bessere Aufnahme und Metabolisierung vieler Schadstoffe. Im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen hingegen konnte eine Belastung mit lipophilen Substanzen eindeutig gewährleistet werden, weshalb er als Screening-Test geeigneter erscheint. Für eine weitere Untersuchung des tatsächlich bioverfügbaren Schädigungspotentials ist dagegen der Sedimentkontakttest mit anschließendem Comet-Assay vorzuziehen, zumal er eine logische Fortsetzung des Fischeitests darstellt (Seitz et al. 2007).

3.8.3 Korrelation zwischen Gentoxizität/Mutagenität und PAH-Konzentrationen

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe gehören zu den bedeutendsten Schadstoffgruppen innerhalb aquatischer Systeme und sind dafür bekannt, gentoxische und mutagene Effekte in sehr unterschiedlichen Organismen hervorzurufen, vor allem auch in Fischen (Akcha et al. 2004, Chen & White 2004, Farmer et al. 2003, Frenzilli et al. 2004, White et al. 2002). Gentoxizität wird in vielen Studien mittels des Comet-Assay detektiert, da er als sensitives und schonendes Testverfahren bekannt ist und artifizielle, z.B. durch Stress induzierte, DNA-Schäden weitestgehend unberücksichtigt lässt (Nacci et al. 1996, Wirzinger et al. 2007). Ein sehr häufig eingesetztes Verfahren zur *In vitro*- und *In vivo*-Untersuchung mutagener Effekte von Monosubstanzen aber auch komplexen Umweltproben stellt der Mikrokerntest dar (Gravato & Santos 2002a, b, Minissi et al. 1996, Rodriguez-Rea et al. 2003, Roy et al. 2003, Torres de Lemos et al. 2007, Wirzinger et al. 2007). Für beide Testsysteme wurde bereits in verschiedenen Studien eine positive Korrelation zwischen der PAH-Kontamination eines Gewässers und gentoxischer bzw. mutagener Effekte ermittelt (al-Sabti & Metcalfe 1995, Chen & White 2004, Frenzilli et al. 2004, Gravato & Santos 2002a, Kim & Hyun 2006,

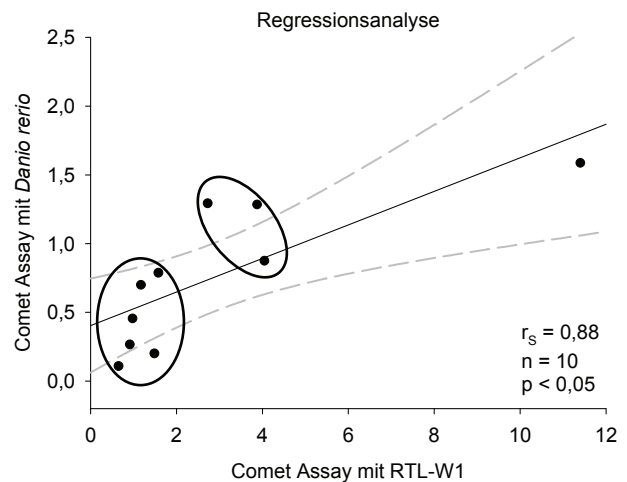


Abb. 3.39: Lineare Regression mit dem 95 % Konfidenzintervall aus den Rängen der beiden Comet-Assay-Varianten: Sedimentextrakte mit RTL-W1-Zellen und nativen Proben mit 72 h alten Embryonen von *Danio rerio*. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Roy et al. 2003, Siu et al. 2004). Aufgrund dessen wurden auch in dieser Arbeit die Ergebnisse aus der PAH-Analyse, dem Comet-Assay und Mikrokerntest mit Hilfe von Korrelationsanalysen (nach Spearman) miteinander verglichen. Demnach wiesen die PAH-Konzentrationen eine niedrige Korrelation mit dem Mikrokerntest ($r_s = 0,48$), eine hohe Korrelation mit dem Comet-Assay mit *Danio rerio* ($r_s = 0,7$; $p < 0,05$) und eine sehr hohe Korrelation mit dem Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 ($r_s = 0,92$; $p < 0,05$) auf.

In einer Studie von Kim und Hyun (2006) konnte nach Exposition mit Benzo[a]pyren für den Comet-Assay eine höhere Sensitivität als für den Mikrokerntest festgestellt werden, und zwar für Blut- und Leberzellen aus dem Karpfen und der Regenbogenforelle. Es ist jedoch bekannt, dass sich die Effekte beim Mikrokerntest sehr deutlich von denen des Comet-Assay unterscheiden (Lasne et al. 1990). Durch den Comet-Assay werden Einzelstrangbrüche der DNA detektiert, wohingegen die Entstehung von Mikrokerneln auch auf Fehlfunktionen des Spindelapparates zurückzuführen ist (al-Sabti & Metcalfe 1995, Kim & Hyun 2006, Kirsch-Volders et al. 2003). Außerdem wurde in den oben genannten Vergleichen mit anderen Arbeiten immer andere Organismen bzw. Zelllinien verwendet als in der eigenen Studie, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen aufgrund spezies- und zellspezifischer Unterschiede nicht möglich ist. Dennoch sollen im Folgenden die Ergebnisse der beiden Testverfahren gegeneinander verglichen werden. So zeigten die eigenen Korrelationsanalysen, dass der Mikrokerntest deutlich geringer mit den gemessenen PAH-Konzentrationen korreliert als beide Comet-Assay-Varianten. Mit anderen Worten: Der Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen ist gegenüber einer PAH-Kontamination weniger sensitiv als der Comet-Assay. Berücksichtigt man jedoch die LOECs aus beiden Gentoxizitätstests, so ergibt sich für den Mikrokerntest in dieser Studie eine insgesamt höhere Empfindlichkeit als für den Comet-Assay (vgl. Tab. 3.18, 3.20 und 3.21). Unterstützt wird dieser Befund durch eine Arbeit von Valentin-Severin et al. (2003), in welcher der Mikrokerntest deutlicher sensitiver gegenüber verschiedenen Schadstoffen (4-NQO, Methylmethansulfonat, N-Nitrosodimethylamin, Benzo[a]pyren und 2-Acetylaminofluoren) reagierte als der Comet-Assay.

Die eigenen Ergebnisse lassen nur die Schlussfolgerung zu, dass trotz einer insgesamt höheren Sensitivität des Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen nur eine geringe Übereinstimmung zwischen PAH-Belastung und Mikrokernelrate vorhanden ist. Des Weiteren kann daher auch vermutet werden, dass Mikrokerneln in RTL-W1-Zellen nicht bzw. nur wenig durch PAHs induziert werden. Dessen ungeachtet muss jedoch davon ausgegangen werden, dass durch die eindeutige Korrelation zwischen den Werten der PAH-Analyse und des Comet-Assay ein gentoxisches Gefährdungspotential von den Sedimentproben der Donau ausgeht und insbesondere auch durch PAHs verursacht wurde.

3.8.4 Beurteilung des gentoxischen und mutagenen Potentials der Donau(-sedimente)

Vergleicht man die *In vitro*-Ergebnisse aus dem Mikrokerntest (RTL-W1) und dem Comet-Assay (RTL-W1 und *Danio rerio*) ergibt sich eine hohe bis sehr hohe Korrelation zwischen diesen beiden Testverfahren zur Feststellung des gentoxischen bzw. mutagenen Potentials der Donau ($r_s = 0,81$ und $0,91$; Abb. 3.40). Des Weiteren lassen sich durch die Kombination der Messergebnisse aus den Biotests mit dem Ergebnis einer Clusteranalyse (Abb. 3.41) bestimmte Hot Spots ausmachen bzw. weniger stark belastete Standorte bestimmen. Demnach ergibt sich für den Standort Rottenacker eine sehr hohe und für die Standorte Schwarzach, Ehingen und Öpfingen eine hohe gentoxische bzw. mutagene Belastung. Eine mittlere Gentoxizität/Mutagenität geht dagegen von den Sedimenten der Standorte Sigmaringen, Ingolstadt, Bad Abbach und Jochenstein aus. Keine oder eine geringfügig

signifikante, gentoxische Wirkung wurde in allen Tests für die Proben des Zuflusses Lauchert und den Standort Riedlingen festgestellt.

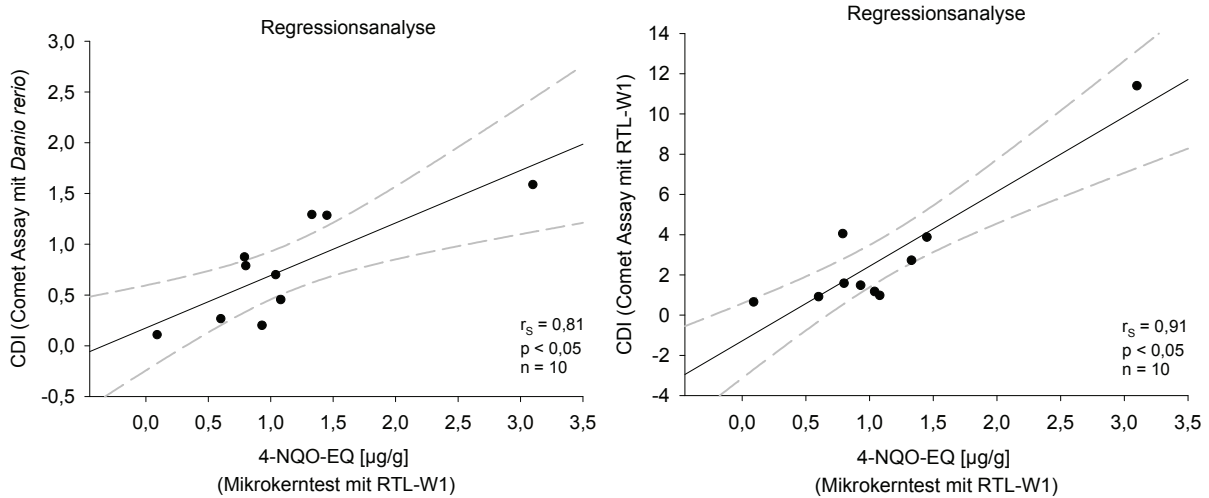


Abb. 3.40: Regressions- und Korrelationsanalysen zwischen Ergebnisse aus dem Mikrokerntest mit RTL-W1-Zellen und dem Comet-Assay sowohl mit *Danio rerio* (links) als auch mit RTL-W1-Zellen (rechts). Die gestrichelten Linien zeigen das 95 % Konfidenzintervall an. Datengrundlage: Seitz et al. (2007) und Böttcher et al. (2007). r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Berücksichtigt man in der Bewertung die Resultate aus der *In vivo*-Untersuchung mit Barben (Mikrokerntest mit Erythrocyten), werden die *In vitro*-Ergebnisse für die Standorte Rottenacker, Ehingen und Riedlingen bestätigt. Eine andere Beurteilung der Belastungssituation ergibt sich beim *In vivo*- und *In vitro*-Vergleich für den Standort Sigmaringen: Hier konnte kein signifikanter Anstieg der Mikrokernrate in Erythrocyten von Barben aus Sigmaringen festgestellt werden. Daher kann an diesem Standort für diese Fischart nicht von einer gentoxischen Belastung ausgegangen werden. Da allerdings je Standort nur 5 Fische untersucht wurden, ist die hier erhobene Datenmenge zu gering, um mittels des Mikrokerntests mit Barben-Erythrocyten eine eindeutige Einschätzung der Belastungssituation in der Donau treffen zu können.

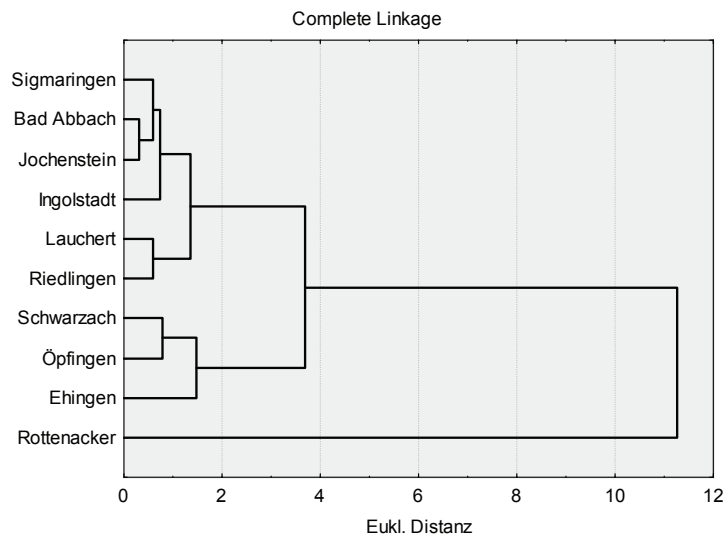


Abb. 3.41: Clusteranalyse aus den Resultaten des Mikrokerntests und Comet-Assay, dargestellt als Baumdiagramm für 3 Fälle. Als Distanzmaß wurde die euklidische Entfernung eingesetzt, die Bildung der Cluster erfolgte nach der Complete Linkage Methode.

Insgesamt ergibt sich jedoch eine verhältnismäßig gute Übertragbarkeit der *In vitro*-Ergebnisse auf die Situation im Freiland. Bezieht man im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes alle zur Verfügung stehenden Informationen in eine Gesamtbeurteilung der Gentoxizität mit ein, so ergibt sich für einige Abschnitte der Donau, insbesondere für den Zufluss Schwarzach und die Donaustandorte Rottenacker, Ehingen und Öpfingen, eine hohe gentoxische Belastung. Diese Belastung ist auch im Zusammenhang mit den hohen PAH-Konzentrationen zu interpretieren, die vor allem mit den Testergebnissen aus dem Comet-Assay gut korrelieren. Es konnte zwar noch kein eindeutiger Beweis für die Beeinträchtigung einer gesamten Fischpopulation durch gentoxische Substanzen erbracht werden (Dieckmann et al. 2004a, b), es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine chronische Exposition von Gameten mit einer niedrigeren DNA-Reparaturkapazität gegenüber gentoxisch wirksamen Substanzen zu einer verminderten Vitalität der Gameten führt, und sich damit auch auf die gesamte Population auswirkt (Anderson & Wild 1994, White et al. 1999, Yauk et al. 2000). Des Weiteren konnte durch eine Studie von Pinkney et al. (2004) ein direkter Zusammenhang zwischen PAH-Exposition und der Bildung von Haut- und Lebertumoren in Fischen gezeigt werden, die letztlich auch zu einer Schwächung der Population führen kann. Aufgrund dieser Studien und der eigenen Ergebnisse kann eine Gefährdung der Fischpopulationen in der Donau durch eine gentoxische Belastung nicht explizit ausgeschlossen werden.

3.9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zusammenfassung: In dieser Teilstudie wurde die Leber von Barben (*Barbus barbus*) aus der Donau histopathologisch untersucht, um mögliche Störungen aufgrund von Stressfaktoren, wie z.B. chemische Belastungen, feststellen zu können, die sich nachteilig auf die ultrastrukturelle Organisation von Hepatocyten auswirken. Als Referenz wurden Barben aus der Donau (Riedlingen) und dem Rhein gefangen, die vor der Fixierung der Leber zwei Monate unter Laborbedingungen gehalten wurden.

In der Ultrastruktur der Hepatocyten konnten durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen kaum Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und Freilandfischen aus Riedlingen festgestellt werden. Jedoch konnte häufig eine Deformation des Zellkerns beobachtet werden, was auf einen Übergang zwischen adaptiver Antwort und Degeneration durch Schadstoffe hinweist. Die ultrastrukturellen Veränderungen der Hepatocyten von Barben aus Ehingen und Rottenacker manifestierten sich in fast allen Zellstrukturen und waren sehr viel stärker ausgeprägt. Insbesondere die deutliche Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Leberzellen von Barben aus Ehingen wird allgemein als Vergiftungssymptom beschrieben und gilt als cytologischer Marker für die Induktion von Detoxifikationsprozessen in Fischen. Ferner wurden vermehrt Makrophagen und nekrotische Zellen beobachtet.

Auch wenn sich der Großteil der beobachteten Veränderungen nicht auf eine Belastung mit bestimmten Schadstoffen zurückführen lässt, ist in jedem Fall von suboptimalen Bedingungen für die Fische an diesen Standorten auszugehen. Desweiteren lässt sich die Bedeutung der zum Teil tiefgreifenden Störungen in der ultrastrukturellen Organisation der Leberzellen auf Veränderung für das Individuum, möglicherweise sogar für die Population extrapolieren.

Die ultrastrukturelle Analyse von Hepatocyten stellt eine geeignete Methode dar, um cytologische Veränderungen aufgrund subletaler Konzentrationen von Fremdstoffen festzustellen, die im Tierversuch weder zu erhöhten Mortalitätsraten noch zu makroskopisch erkennbaren Schäden führen. Daher wurden aus der Donau von drei verschiedenen Standorten vier bis sechs Barben gefangen. Nach der Perfusion wurde die Leber entnommen und mittels der Elektronenmikroskopie die Ultrastruktur betrachtet.

3.9.1 Gewicht und Länge der Versuchstiere

Vor der Perfusion wurden das Gewicht und die Länge der Barben (*Barbus barbus*) bestimmt (Tab. 3.23). Die Länge wurde vom Maul bis zur Schwanzflosse gemessen und lag zwischen 8 und 18,5 cm. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 5,2 und 45,2 g. Der deutliche Unterschied dieser Parameter beruht im Wesentlichen auf der geringen Größe der Fische aus der Donau bei Ehingen, da an diesem Standort zum Zeitpunkt der Elektrofischung keine größeren Exemplare gefangen werden konnten. Als Kontrolltiere wurden Barben aus der Donau bei Riedlingen oder aus dem Rhein bei Karlsruhe verwendet, die über einen Zeitraum von mehr als zwei Monaten in Trinkwasser, jedoch sonst unter identischen Bedingungen im Labor gehalten wurden.

Tab. 3.23: Morphometrische Daten der elektronenmikroskopisch untersuchten Barben (*Barbus barbus*) zum Zeitpunkt der Elektrofischung (Gewicht [g] und Länge [cm]; Datengrundlage: Grund (2005)).

Fisch		1		2		3		4		5		6		
	Datum	[g]	[cm]	[g]	[cm]	[g]	[cm]	[g]	[cm]	[g]	[cm]	[g]	[cm]	
KF	Rhein	29.08.04	26,8	16,5	29,5	17,4	28,2	16,7	37,5	17,0	53,6	18,0	45,2	18,5
	Riedlingen	22.09.04	40,7	16,8	33,3	15,5	30,9	15,5	32,9	15,0	29,8	15,1	26,0	14,7
FF	Riedlingen	22.09.04	18,4	13,0	-	11,8	12,1	11,2	16,1	11,7	18,8	13,0	13,5	12,2
	Rottenacker	09.10.04	25,8	13,7	40,4	16,7	32,7	15,9	18,1	12,4	17,4	11,8	12,2	11,3
	Ehingen	09.10.04	13,5	11,5	13,5	11,0	10,2	10,0	5,2	8,0	-	-	-	-

KF = Kontrollfische (Laborhaltung); FF = Freilandfische

3.9.2 Bewertung und Interpretation der ultrastrukturellen Befunde

Der Angriffspunkt einer Chemikalie in einem Organismus ist auf der Ebene der Moleküle zu suchen und manifestiert sich in der Struktur von Zellen und Organellen (Braunbeck 1989, Segner & Braunbeck 1998). Insbesondere die Leber als zentrales Organ des Stoffwechsels aber auch der Akkumulation, Transformation und Exkretion aufgenommener Schadstoffe stellt ein verlässliches Monitoringsystem für Veränderungen in der Umwelt der Organismen dar (Arnold et al. 1996, Braunbeck & Völkl 1993, Braunbeck & Storch 1990). Durch den Vergleich von Freilandfischen mit im Labor gehaltenen Kontrollfischen sollte bewertet werden, ob und in welcher Form sich das in den Biotests ermittelte ökotoxikologische Schädigungspotential auf zellulärer Ebene auswirkt. Bei der Bewertung solcher Veränderungen ist jedoch zu beachten, dass neben anthropogen verursachten Schädigungen auch andere Parameter Einfluss auf die Ultrastruktur nehmen können, dazu gehören z.B. Futter (Hansen et al. 2004, Storch et al. 1984), Temperatur (Braunbeck 1989, Storch et al. 1984) oder endogene Faktoren wie der Jahreszyklus (Alvarez et al. 2006, Sáez et al. 1984, Segner & Braunbeck 1990). Des Weiteren ist zu beachten, dass auch innerhalb einer Art alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede auftreten (Segner & Braunbeck 1990). Aufgrund der großen Vielfalt exogener Einflussfaktoren können die in dieser Studie beobachteten Leberveränderungen meist nur als allgemeiner Ausdruck adaptativer Prozesse auf verschiedene Stressoren interpretiert werden und nicht explizit eine Schadstoffbelastung nachweisen. Da es sich bei der Akkumulation und

dem Metabolismus von Schadstoffen meist jedoch um Prozesse handelt, die nur so lange stattfinden können wie die betroffenen Zellsysteme in ihrer Kapazität nicht überlastet sind (Moore 1985), können die ultrastrukturellen Befunde durchaus dem Nachweis eines allgemeinen Belastungszustands in der Donau dienen.

Bei dem Vergleich zwischen den Kontrolltieren und den Freilandfischen aus der Donau konnten zum Teil erhebliche Unterschiede in der ultrastrukturellen Organisation der Hepatocyten festgestellt werden. Die Ergebnisse der ultrastrukturellen Befunde sind in Tab. 3.24 vergleichend gegenübergestellt und werden nachfolgend im Einzelnen mit entsprechendem Bildmaterial beschrieben.

Tab. 3.24: Übersicht der ultrastrukturellen Veränderungen der Hepatocyten von Kontroll- und Freilandfischen (Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollfischen sind grau hinterlegt). Tabelle verändert nach Grund (2005).

Ultrastrukturelle Organisation	Kontrollfische		Freilandfische		
	Rhein	Riedlingen	Riedlingen	Rottenacker	Ehingen
Hepatocyte					
Größenzunahme	+/-	+/-	+/-	+	+
Aufhebung der Zellkompartimentierung	-	-	+	+++	++
Zellkern					
Größenzunahme	+/-	+/-	+	+	+/-
Deformation der Kernhülle	+/-	+/-	+++	++	+/-
Abnahme des Heterochromatinanteils	+/-	+/-	+/-	++	+/-
Periphere Verlagerung des Heterochromatins	+/-	+/-	++	+/-	++
Nucleolus					
Größenzunahme	+	+/-	+	+	-
Mehrzähliges Vorkommen	+/-	+/-	+++	+++	+/-
Mitochondrien					
Proliferation	+/-	+/-	+	+++	++
Heterogenität in Form/Größe	+/-	+	++	+++	++
Heterogene Verteilung in der Zelle	+/-	+/-	+	+++	+++
Intramitochondriale Granula	+/-	+/-	+	++	++
Assoziation mit rauem endoplasmatischem Reticulum	++	++	+	-	-
Peroxisomen					
Proliferation	-	+	-	+++	+
Größenzunahme	+	+/-	+/-	++	+/-
Heterogenität in der Form	+/-	+/-	+/-	+	+/-
Assoziation mit Mitochondrien	+/-	+	+	++	+/-
Clusterbildung	+/-	+/-	+/-	+++	+/-
Raues endoplasmatisches Reticulum (rER)					
Proliferation	+/-	+/-	+/-	+++	++
Stapelbildung	+	+/-	+/-	++	++
Wirbelbildung	+/-	+/-	+/-	+/-	++
Fenestrierung	+/-	+	+/-	+	++
„Aufblähung“	+/-	+/-	+/-	+++	+
Vakuolisierung/Vesikulierung	+/-	+/-	+/-	+++	++

Ultrastrukturelle Organisation	Kontrollfische		Freilandfische		
	Rhein	Riedlingen	Riedlingen	Rottenacker	Ehingen
Glattes endoplasmatisches Reticulum (sER)					
Proliferation	+/-	+/-	+/-	+/-	+++
Golgi-Apparat					
Häufigkeit	+	+	+	++	++
Vesikelanzahl/Aktivität	+/-	+	+	++	+++
Lysosomale Elemente					
Proliferation	+/-	+/-	+/-	+++	++
Größenzunahme	+/-	+/-	+/-	+++	++
Heterogene Einschlüsse	+/-	+/-	+/-	++	++
Myelinwirbel	+/-	+/-	+/-	++	+
Lipid					
Proliferation	+	+/-	+/-	++	+/-
Assoziation mit Mitochondrien	+/-	+/-	+++	+	++
Akkumulation in Gruppen	+	+/-	++	++	+/-
Glykogen					
Menge	+++	+++	+++	+	++
Anordnung in Feldern	+++	+++	+++	+	++
Heterogenität der Dichte	+/-	+	+/-	++	++
Sonstiges					
Makrophagen	+/-	+/-	+	+++	+++

Bewertungssystem: +/- unauffällig; + mäßig ausgeprägt; ++ stark ausgeprägt; +++ sehr stark ausgeprägt; - gegenteilig ausgeprägt

Ultrastruktur der Leber aus den Kontrollfischen: Es waren nur geringfügige Unterschiede zwischen den Kontrollfischen, die ursprünglich aus dem Rhein bzw. der Donau gefangen worden waren, festzustellen. Das Erscheinungsbild der Leber dieser Fische zeigte eine auffallende Homogenität zwischen den einzelnen Hepatocyten (Abb. 3.42a). Die großen, polygonalen Leberzellen waren häufig charakterisiert durch sehr große, granuläre Glykogendepots in der Zellperipherie. Lipidtropfen als Speichermaterial traten nur in geringer Zahl am Zellrand auf. Die Zellorganellen waren in geringer Menge um den zentralen, rundlich-ovalen Zellkern angeordnet. Im unauffällig geformten Zellkern war neben einigen willkürlich verteilten Zonen von Heterochromatin auch meist ein zentral gelegener prominenter Nucleolus zu erkennen (Abb. 3.43a). Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) war meist nur schwach entwickelt und in nicht-fenestrierten rER-Zisternen um den Zellkern, die Mitochondrien und Peroxisomen angeordnet (Abb. 3.43b). Peroxisomen waren teilweise leicht vergrößert und traten bei Rheinfischen nur vereinzelt in Kernnähe auf. Bei den Fischen aus der Donau konnte eine leicht erhöhte Zahl der Peroxisomen beobachtet werden. In Kernnähe lagen weiterhin stets 1-2 Golgi-Apparate, die zumeist aus bis zu vier schmalen, kurzen Zisternen bestanden und von wenigen kleinen Vesikeln umgeben waren. Lysosomale Elemente und Makrophagen konnten nur in sehr geringer Zahl oder überhaupt nicht beobachtet werden. Die hier beschriebene Ultrastruktur der Hepatocyten der Kontrolltiere stimmt im Wesentlichen mit dem generellen Erscheinungsbild der Leber der meisten Cyprinidenarten überein (Braunbeck 1989).

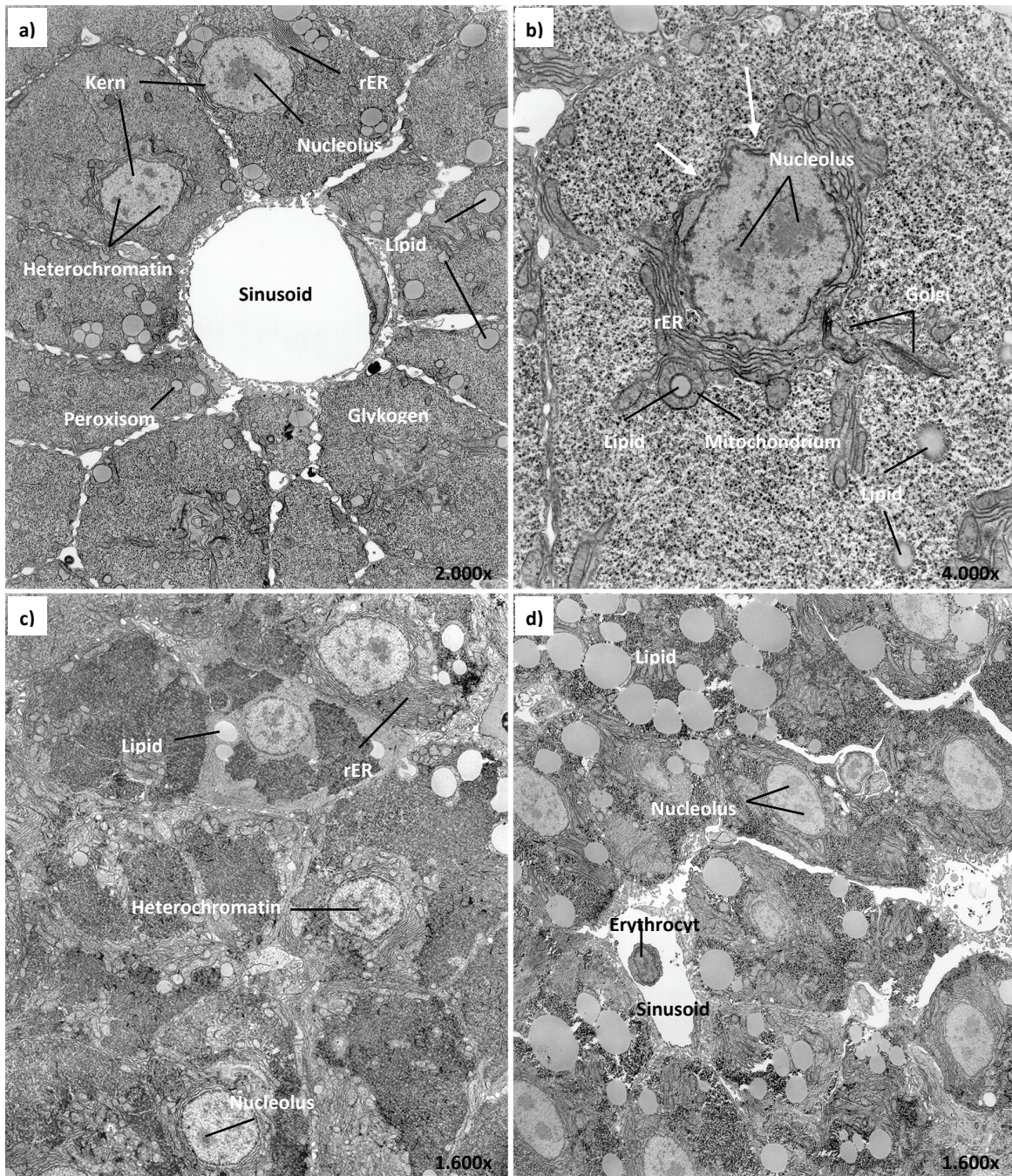


Abb. 3.42: Ultrastruktur der Hepatocyten aus Kontrollfischen aus dem Rhein und Freilandfischen aus der Donau bei Riedlingen, Rottenacker und Ehingen. Bilder aus Grund (2005) und Grund et al. (2007).

- a) **Kontrolle:** Elektronenmikroskopische Aufnahme mehrerer Hepatocyten zur übersichtlichen Darstellung der intrazellulären Kompartimentierung und der Organellenarmut. Die Leberzellen sind entlang eines Sinusoids angeordnet.
- b) **Riedlingen:** Die Zellkerne deutliche Deformationen in Form von Lappung und Einfaltungen der Kernmembran (Pfeile). Das Heterochromatin ist in die Peripherie der Kerne verlagert. An Lipidtropfen sind häufig Mitochondrien eng angelagert.
- c) **Ehingen:** Eine intrazelluläre Kompartimentierung ist nicht zu erkennen. Das Erscheinungsbild der einzelnen Hepatocyten variiert beträchtlich. Der Organellenbestand war ist stark erhöht und über das gesamte Cytoplasma verteilt.
- d) **Rottenacker:** Der Organellenbestand ist stark erhöht und nicht mehr auf den perinuklearen Bereich beschränkt. In den Zellkernen sind häufig zwei Nucleoli, aber sehr wenig Heterochromatin zu erkennen. Während der Glykogengehalt reduziert ist, können Lipidtropfen verschiedener Größe in auffällig großer Zahl in fast allen Zellbereichen gefunden werden. Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) ist meist stark entwickelt.

Ultrastruktur der Freilandfische aus Riedlingen: In der Leber der Barben aus Riedlingen war im Vergleich zu den Kontrolltieren eine weniger regelmäßige Anordnung der Zellkomponenten zu beobachten. So war der Zellkern deutlich unterschiedlich zur Kontrolle geformt. Die Kernmembran wies meist verschiedene Deformationen (Ausbuchtungen, Einfaltungen und/oder Lappungen; Abb. 3.42b) auf. Dies kann als ein Versuch der Zelle gewertet werden, die Oberfläche zwischen Karyoplasma und Cytoplasma zu vergrößern und somit den Austausch intrazellulären Materials zwischen den beiden Zellkompartimenten zu erleichtern (Zahn & Braunbeck 1995). Solche Veränderungen wurden auch in der Leber von Regenbogenforellen nach Belastung mit den Pestiziden Endosulfan, Atrazin und Linuron beobachtet und stellen nach Braunbeck (1994a) deutliche pathologische Veränderungen dar, die einen Übergang von adaptiver Antwort zu Degeneration markieren. Im Kernlumen waren häufig zwei Nucleoli zu erkennen, was nach Braunbeck (1994a) als unspezifische Reaktion auf eine potentielle Schadstoffbelastung anzusehen ist (Abb. 3.43d).

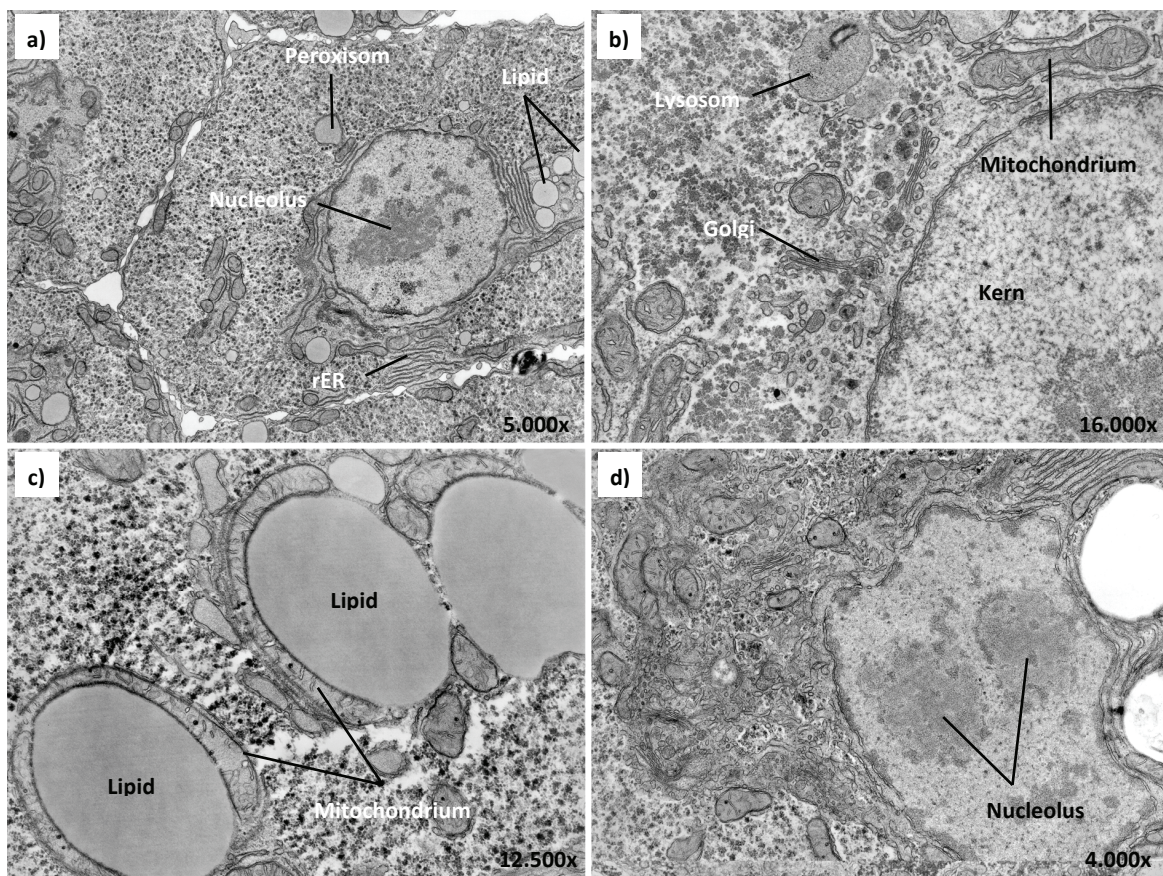


Abb. 3.43: Ultrastruktur der Hepatocyten aus Kontrollfischen aus dem Rhein und Freilandfischen aus der Donau bei Riedlingen. Bilder aus Grund (2005) und Grund et al. (2007).

- a) Kontrolle:** Kennzeichnend für die Hepatocyten sind große Glykogenareale, die gleichmäßig in der Peripherie des Cytoplasmas verteilt sind. Die Zellorganellen konzentrieren sich in geringer Zahl um einen zentralen Kern mit einem prominenten Nucleolus.
- b) Kontrolle:** In Kernnähe positionieren sich zwei Golgi-Komplexe aus zwei bis drei kurzen, nicht fenestrierten Zisternen. In ihrem näheren Umfeld sind wenige kleine Vesikel und Lysosomen mit elektronendichtem Inhalt zu erkennen. Mitochondrien und Peroxisomen sind stets von Zisternen des rauen endoplasmatischen Reticulum umgeben.
- c) Riedlingen:** Viele Mitochondrien sind stark vergrößert und eng den Lipidtropfen angelagert.
- d) Riedlingen:** In der Nähe der meist deformierten Zellkerne sind Golgi-Felder mit wenigen kleinen Vesikeln anzutreffen. Im Zellkern sind zwei Nucleoli zu sehen.

Weiterhin konnte eine Verlagerung des Heterochromatins auf die peripheren Bereiche des Nucleus beobachtet werden. Derartige Kernveränderungen sind aus Versuchen an Hepatocyten mit Substanzen wie Malachitgrün, 3,4-Dichloranilin oder Linuron bekannt (Hoffmann et al. 1995, Zahn & Braunbeck 1995) und können als Zeichen einer fortschreitenden Inaktivierung des Zellkerns gedeutet (Zahn & Braunbeck 1995) bzw. als Frühstadien von Nekrosen angesehen werden (Schoor & Couch 1979). Eine weitere Auffälligkeit war das vermehrte Auftreten vergrößerter Mitochondrien, die dann den Lipidtropfen eng angelagert waren oder diese gar ringförmig umschlossen (Abb. 3.43c). Diese enge Beziehung zwischen Mitochondrien und Lipidtropfen stellt möglicherweise eine unspezifische Reaktion auf Stress dar, die der raschen Mobilisierung von Energiereserven dienen könnte. Die Mitochondrien wiesen im Allgemeinen eine stärkere Heterogenität hinsichtlich ihrer Form und Größe auf und waren vereinzelt auch in den peripheren Bereichen der Zelle zu finden, was ebenfalls als eine unspezifische Stressreaktion gedeutet werden kann. Da die Perfusion der Fische aus der Donau bei Riedlingen nicht vor Ort, sondern erst nach dem Transport nach Heidelberg durchgeführt werden konnte, können die ultrastrukturellen Veränderungen nicht alle explizit auf eine chemische Belastung zurückgeführt werden, sondern stellen eventuell teilweise eine Reaktion auf eine Stresssituation dar.

Ultrastruktur der Freilandfische aus Rottenacker: Die Hepatocyten dieser Fische wiesen zahlreiche Anomalien in nahezu allen Zellbestandteilen auf (Abb. 3.42d). Die Anzahl der Organellen war deutlich erhöht und beliebig über das Cytoplasma verteilt. Die ovalen bis länglichen Zellkerne waren meist zum Rand verschoben und etwas vergrößert. Häufig konnten starke Deformationen des Kernumrisses beobachtet werden, sehr oft waren auch zwei Nucleoli vorhanden (Abb. 3.44b). Im Gegensatz zu den Freilandfischen aus Riedlingen war der Heterochromatingehalt im Zellkern stark reduziert, was auf eine erhöhte Kernaktivität hinweist. In Kombination mit der signifikanten Erhöhung des rER-Anteils (Abb. 3.44d) sowie einer Zunahme der Dictyosomen und der sekretorischen Aktivität der Golgi-Apparate deutet dies auf Veränderungen im Lipoprotein- und Proteinsyntheseapparat hin, die als generelle Symptome für einen Anstieg der Biosyntheserate in der Leber bewertet werden (Buckley et al. 1984).

Weiterhin war eine starke Vesikulierung und Dilatation der rER-Zisternen auffällig. In verschiedenen Studien wurden solche Veränderungen durch umweltrelevante Monosubstanzen wie 4-Nitrophenol (Zahn & Braunbeck 1995), 2,4-Dichlophenol (Zahn & Braunbeck 1993), aber auch durch kontaminierte Sedimentextrakte (Engwall et al. 1996) induziert. Nach Braunbeck (1998) wird die verstärkte Dilatation als degenerativer Effekt gewertet, der auf eine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese hinweist. Dabei werden aufgrund gestörter Synthesevorgänge Zwischenprodukte in den Zisternen akkumuliert oder aber Endprodukte durch eine unzureichende Funktion der Dictyosomen nicht schnell genug abtransportiert.

In den Glycogenfeldern waren zahlreiche kleinere Myelinkörper zu erkennen, wobei Glycogen als Speichermaterial zugunsten großer Lipidtropfen stark zurück trat, was als Teil einer unspezifischen Stressreaktion gewertet werden kann und einen erhöhten Energiebedarf der Zellen widerspiegelt (Braunbeck 1989). Die Lipidtropfen zeigten eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich ihrer Größe und waren vor allem in der Zellperipherie in kleineren Gruppierungen zu finden. Ein erhöhter Lipidgehalt im Cytoplasma weist auf eine gestörte Lipoproteinsynthese oder einen anormalen Transport von Lipid hin (Phillips et al. 1987). Die in sehr großer Zahl und Größe auftretenden Peroxisomen waren häufig in clusterartigen Gruppen angeordnet (Abb. 3.44c). Da Peroxisomen neben der Entgiftung von Wasserstoffperoxid auch am Lipidstoffwechsel beteiligt sind, könnte deren Proliferation und Größenzunahme als sekundäre Antwort der Hepatocyten auf den

Fettabbau betrachtet werden (Zahn & Braunbeck 1995, Braunbeck 1998). Die enge Zusammenlagerung der Peroxisomen zu großen Clustern ist möglicherweise Ausdruck einer engen metabolischen und enzymatischen Kooperation.

Hinsichtlich der Mitochondrien war ebenfalls eine starke Proliferation, diffuse Verteilung und abnorme Verformungen zu erkennen. Diese Veränderungen der Mitochondrien weist auf einen erhöhten zellulären Energiebedarf in Form von ATP hin, der durch die Vergrößerung der aktiven Membranoberfläche kompensiert wird (Zahn & Braunbeck 1995). Die Umgestaltung der Mitochondrien zu atypischen Formen wurde bei Belastungen mit höheren Konzentrationen verschiedener Schadstoffe wie Atrazin und Lindan, aber auch bei Goldorfen im Zuge einer Adaptation an erniedrigte Temperaturen (Braunbeck 1989, Braunbeck et al. 1987) beobachtet. Dieser Effekt kann daher als unspezifischer physiologischer Anpassungsprozess der Zelle an einen gestiegenen Sauerstoffbedarf infolge eines erhöhten Zellstoffwechsels gewertet werden (Braunbeck & Völkl 1993). Eine Anlagerung von Mitochondrien an Lipidtropfen wurde nur vereinzelt beobachtet.

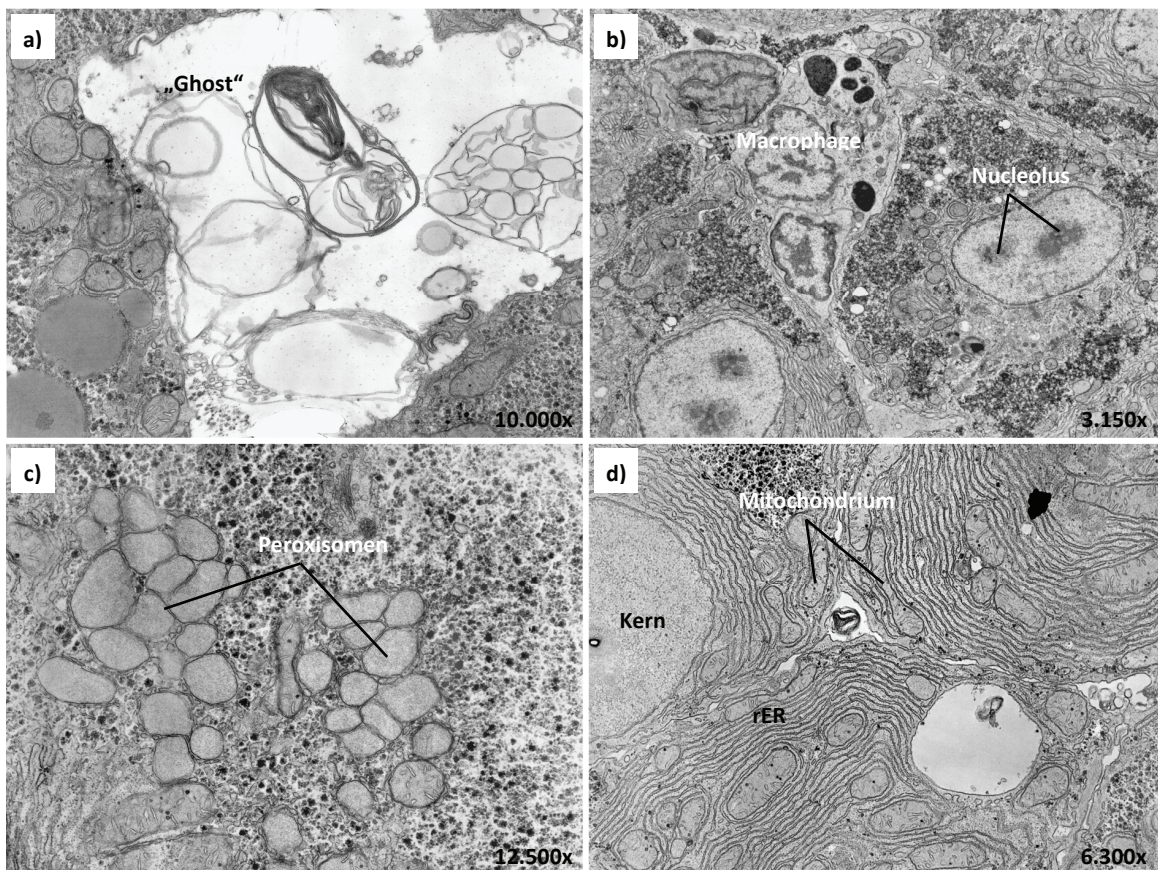


Abb. 3.44: Ultrastruktur der Hepatocyten von Freilandfischen aus der Donau bei Rottenacker. Bilder aus Grund (2005) und Grund et al. (2007).

- a) Rottenacker:** In den interzellularen Zwischenräumen sind vermehrt Membranreste und vesikuläre Zellfragmente abgestorbener Hepatocyten („Ghost“) zu finden.
- b) Rottenacker:** Der Organellenbestand ist stark erhöht und nicht mehr auf den perinuklearen Bereich beschränkt. In den Zellkernen sind häufig zwei Nucleoli, aber sehr wenig Heterochromatin zu erkennen. Während der Glykogengehalt reduziert ist, können Lipidtropfen verschiedener Größe in auffällig großer Zahl in fast allen Zellbereichen gefunden werden. Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) ist meist stark entwickelt.
- c) Rottenacker:** Peroxisomen treten in erhöhter Anzahl und Größe auf und neigen sehr stark zur Clusterbildung.
- d) Rottenacker:** In mehreren Zellen ist eine stark Proliferation des rER zu erkennen, so dass weite Bereiche des Cytoplasmas mit parallel angeordneten rER-Zisternen gefüllt sind. Im Cytoplasma sind zudem häufig große Lysosomen mit abgestoßenen Zellresten zu finden.

Die Lysosomen konnten in sehr unterschiedlicher Größe beobachtet werden und traten häufig in Clustern zusammen. Dieser Effekt wurde wiederholt auf Fremdstoff-induzierten Stress, z.B. durch Schwermetallbelastungen, zurückgeführt (Segner & Braunbeck 1990, Braunbeck et al. 1990). Da jedoch eine Lysosomenproliferation durchaus auch bei anderen Stresssituationen, wie etwa erhöhter Wassertemperatur oder Hunger, auftritt (Storch et al. 1984, Braunbeck et al. 1987), kann die Zunahme von Lysosomen als eine unspezifische Reaktion der Leber auf Stress betrachtet werden, die auf einer generellen Stimulation des Zellstoffwechsels beruht (Braunbeck et al. 1990, Segner & Braunbeck 1990). In randständigen Lysosomen waren häufig vesikuläre Fragmente unbekannter Herkunft und Membranwirbel zu erkennen. Dieses Merkmal tritt häufig nach einer Dauerausposition gegenüber subletalen Konzentrationen toxischer Xenobiotika auf (Hawkes 1980, Hinton et al. 1987).

Außerdem konnte eine deutliche Invasion von Makrophagen in das Leberparenchym beobachtet werden, die oft entlang der intrazellulären Gallencanaliculi und über den perisinusoiden Raum erfolgte (Abb. 3.44b). Die Makrophagen waren häufig extrem groß (bis Hepatocytengröße) und enthielten neben größeren Lysosomen verschiedene Abbaustadien phagozytierter Zellen und Zellorganellen, wie z.B. abgebaute Zellkerne mit stark kondensiertem Chromatingehalt. Ferner waren in den extrazellulären Zwischenräumen membranartige und vesikuläre Zellbruchstücke („Ghosts“) in großer Zahl zu finden (Abb. 3.44a). Die Auflösung der intrazellulären Kompartimentierung, die starke Heterogenität im Leberparenchym sowie in den einzelnen Hepatocyten und die Einwanderung von Makrophagen in den extrazellulären Raum können als unspezifische Reaktion auf eine Belastung des Organismus (Zellstress) angesehen werden (Burkhardt-Holm et al. 1990).

Ultrastruktur der Freilandfische aus Ehingen: Die Fische aus Ehingen wiesen sehr ähnliche ultrastrukturelle Veränderungen der Hepatocyten auf wie die Fische aus Rottenacker, und sind daher auch ähnlich zu interpretieren. Sie unterschieden sich jedoch in einigen Merkmalen. Der Zellkern war meist leicht zum Rand verschoben und enthielt nur in geringer Menge Heterochromatin, welches in der Peripherie konzentriert war. Der Nucleolus war häufig klein und etwas exzentrisch gelagert. Deformationen der Kernmembran wurden nur selten beobachtet.

Auffällig war auch eine signifikante Zunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) in Form eines stark verzweigten und anastomosierenden Netzwerkes aus unregelmäßig geformten Tubuli, die zwischen den Glycogenrosetten regelmäßig über größere Bereiche der Reservestoffareale verteilt waren. Dieses Merkmal wird allgemein als Vergiftungssymptom beschrieben und gilt als cytologischer Marker für die Induktion von Detoxifikationsprozessen in Fischen (Braunbeck et al. 1989, Hinton et al. 1987) und Säugern (Phillips et al. 1987). Es wird als eindeutiger Nachweis einer toxischen Wirkung von Xenobiotika gewertet. Die Veränderung des rER ähnelte in weiten Teilen den Störungen in den Leberzellen der Barben aus Rottenacker, jedoch kam es in einigen Zellen zu einer Konzentration weniger rER-Zisternen um den Zellkern. Stellenweise bildeten die rER-Zisternen konzentrische Wirbel aus und/oder waren zu größeren Stapeln am Zellrand angeordnet (Abb. 3.45d). Die rER-Proliferation kann im Zusammenhang mit dem Auftreten des sER als Maßnahme zur Vergrößerung der aktiven Membranoberfläche zur Proteinbiosynthese verstanden werden (Braunbeck 1998).

Die Mitochondrien wiesen zwar im Vergleich zu den Fischen aus Rottenacker seltener Deformationen auf, es konnten aber häufig lang gestreckte, stark vergrößerte Formen gefunden werden. Lipidtropfen lagen, falls vorhanden, in sehr geringer Zahl ausschließlich in der Zellperipherie vor und standen häufig in enger Beziehung zu Mitochondrien, was wie bereits bei den Hepatocyten der Barben aus Rottenacker als Symptom für einen erhöhten Energiebedarf zu werten ist.

Die auffälligste Veränderung war das häufige Auftreten von Melanocyten, die als kompakte, eiförmige Gebilde zu erkennen waren und in größerer Zahl in den extrazellulären Zwischenräumen und in den Recessus hepatices der Leber vorkamen (Abb. 3.45c). Zellkerne und andere Zellorganellen wurden in den Melanocyten nicht gefunden. Bustamante et al. (1993) vermuteten, dass Melaninpigmente freie Radikale abfangen, schlossen aber auch eine katalytische Funktion zur Bildung dieser freien Radikale nicht aus. Häufig waren auch stark verkleinerte, nekrotische Zellen mit aufgelöstem Zellinhalt zwischen den Hepatocytan zu erkennen (Abb. 3.45b).

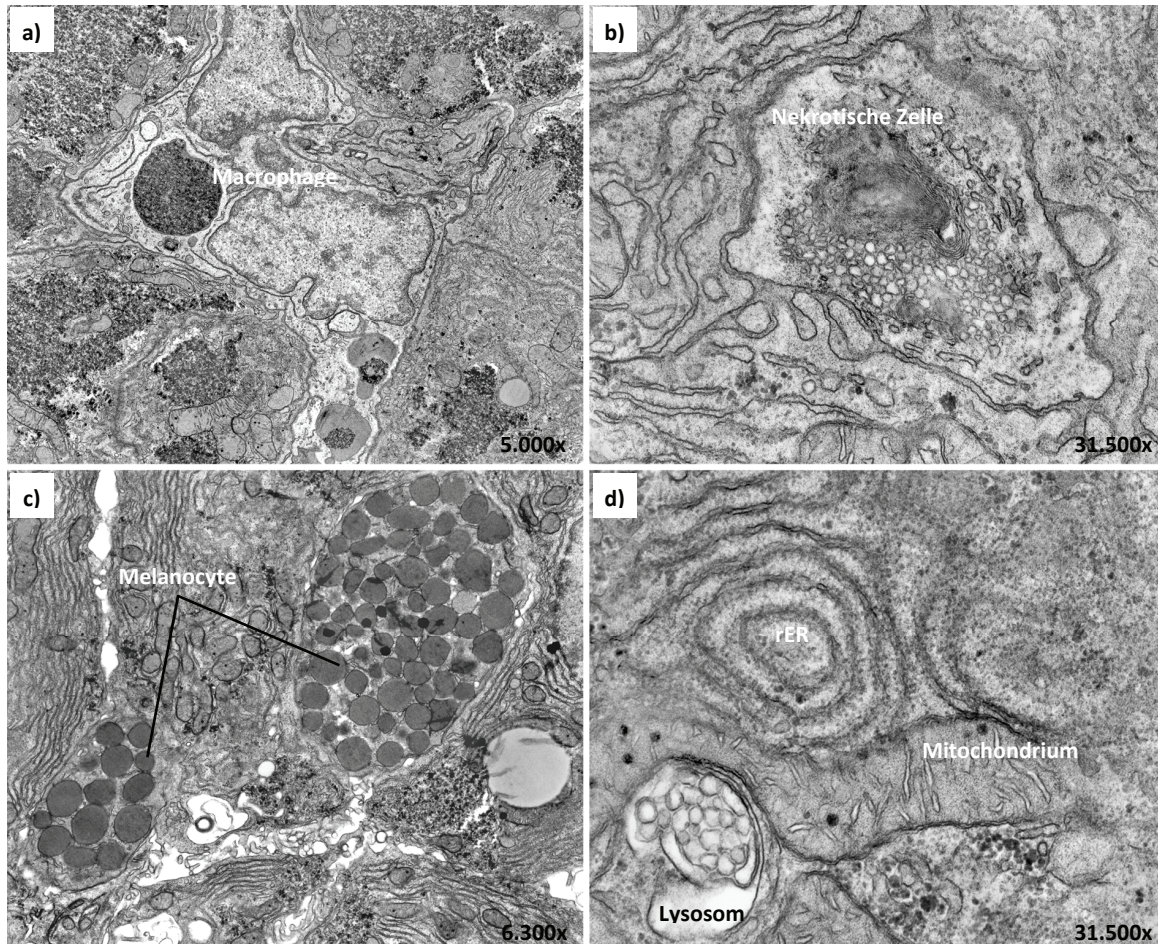


Abb. 3.45: Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber von Barben (*Barbus barbatus*) aus der Donau bei Ehingen. Bilder aus Grund (2005) und Grund et al. (2007).

- a) Vermehrte Invasion von Makrophagen in den extrazellulären Raum. Meist in der Nähe der Gallengänge mit phagozytierten Resten ganzer Hepatocytan im Lumen.
- b) Nekrotische Zelle mit stark vesikuliertem Inhalt.
- c) Pigmentzellen mit zahlreichen Melanin-Granula im extrazellulären Raum.
- d) Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) bildet konzentrische Wirbel. Lysosomen mit vesikelartigen Einschlüssen sind in großer Zahl über das gesamte Cytoplasma verteilt.

3.9.3 Gesamtbeurteilung der ultrastrukturellen Veränderungen

Bei allen untersuchten Freilandfischen konnten deutliche Veränderungen in der ultrastrukturellen Organisation der Hepatocytan im Vergleich zu den Kontrollfischen festgestellt werden. Während sich die Veränderungen bei den Fischen aus Riedlingen vor allem auf die Form und Struktur des Zellkerns beschränkten, wurden in der Leber der Freilandfische aus der Donau bei Rottenacker und Ehingen erhebliche Veränderungen in fast allen zellulären Strukturen beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse kann dort auf einen schlechten Zustand des Lebensraums für die Fische aus der

Donau geschlossen werden. Vergleicht man die Veränderungen der Leber aus den Barben mit den *In vitro*-Testergebnissen, so zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung (leichte Effekte in Riedlingen und erhebliche Veränderungen bzw. hohe Effekte für die Standorte Rottenacker und Ehingen), weshalb auch die Vermutung nahe liegt, dass eine erhöhte Schadstoffbelastung für die ultrastrukturellen Störungen der Leber verantwortlich ist. Diese Vermutung wird durch die beobachtete Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) in den Hepatocyten der Freilandfische aus Ehingen unterstützt. Die Proliferation des sER gilt als cytologischer Marker für die Induktion von Detoxifikationsprozessen (Braunbeck 1989, Hinton et al. 1987). In den Sedimentproben aus der Donau wurden vor allem sehr hohe PAH-Konzentrationen (für Rottenacker liegen keine Daten vor) gemessen. PAHs verursachen in der Leber verschiedener Fischarten erhebliche strukturelle Veränderungen, wie z.B. Nekrosen oder gar die Induktion von Lebertumoren (Lyons et al. 2004, Ribeiro et al. 2005). Aber auch andere prioritäre Schadstoffe sind für solche erheblichen histologischen Störungen in der Leber von Fischen verantwortlich, wie z.B. PCBs und PCDD/Fs (Grinwis et al. 2001, Mikaelian et al. 2002). Eine deutliche Proliferation des sER wurde jedoch nur in Leberzellen der Barben aus Ehingen beobachtet, was explizit auf eine Schadstoffbelastung hindeutet. Der Großteil der anderen beobachteten Veränderungen ist dagegen als adaptative Reaktion auf veränderte, suboptimale Lebensbedingungen zu verstehen und gestattet keine Aussage über die Art der Stressoren. Dessen ungeachtet ermöglicht die Untersuchungen der Hepatocyten durchaus einen Einblick in die der Schädigung zugrunde liegenden Mechanismen, und lässt damit eine Extrapolation auf die Bedeutung der Veränderung für das Individuum, möglicherweise sogar für die Population zu (Braunbeck 1989). Aufgrund der zum Teil tiefgreifenden Veränderungen in den Leberzellen der untersuchten Freilandfische aus der Donau bei Rottenacker und Ehingen, ist eine Beeinträchtigung der Gesundheit der Individuen nicht auszuschließen. In weiteren Studien sollten histopathologische Untersuchungen auch auf die stark mit PAHs kontaminierten Sedimenten des Zuflusses Schwarzach und des Öpfinger Stausees ausgedehnt werden.

3.10 Gesamtbewertung des ökotoxikologischen Belastungspotentials der Donau im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes

Im folgenden Abschnitt sollen, zum Zweck einer möglichst umfassenden ökotoxikologischen Charakterisierung der Donau, alle bisherigen Ergebnisse aus den chemischen Analysen, den *In vitro*-Biotests sowie den ermittelten *In vivo*- und *In situ*-Parametern zusammengeführt und vergleichend bewertet werden. Ziel soll es sein mögliche Ursachen zu ermitteln, die Aufschluss über den beobachteten Fischrückgang geben könnten. Des Weiteren sollen durch diese Studie Belastungsschwerpunkte an der Donau ausgemacht werden, um Gründe für das bereits festgestellte ökotoxikologische Schädigungspotential zu ermitteln und möglicherweise Quellen einer Kontamination zu identifizieren. Zunächst werden daher alle Standorte unter Berücksichtigung aller gewonnenen Daten einzeln charakterisiert. Zur übersichtlichen Darstellung sind alle Testergebnisse aus den biologischen Analyseverfahren in der Tab. 3.25 zusammengefasst. Mit Hilfe verschiedener statistischer Methoden sollen dann die Belastungsschwerpunkte identifiziert und die Standorte gegeneinander bewertet bzw. klassifiziert werden.

3.10.1 Standortbezogene Bewertung der Donau

- **Sigmaringen:** In den hydrochemisch-physikalischen Untersuchungen erwies sich Sigmaringen als vergleichsweise unbelasteter Standort (Güteklasse II). Die leicht erhöhten Nitritkonzentrationen wiesen zwar auf eine potentielle Eutrophierung hin, waren aber noch mit der Zielvorgabe der LAWA (Güteklasse II) vereinbar. Die Analyse der organischen Schadstoffe ergab im direkten Vergleich mit allen anderen Proben einen mittleren Schadstoffgehalt. Nach der ATV-Klassifizierung (ARGE-Elbe; Ahlf et al. 2002) ergibt sich für die PAH-Konzentrationen die Güteklasse II. Auf der Grundlage verschiedener Makrozoobenthos-Analysen, war die Belastung mit biologisch leicht abbau-baren Substanzen als mäßig einzustufen (Güteklasse II). Defizite in der Zusammensetzung des Makrozoobenthos, die auf ein gestörtes Ökosystem hindeuten, wurden an diesem Standort nicht festgestellt (Grund 2005, Seitz 2005). Im Neutralrottest mit der Zelllinie RTL-W1 bewirkten die Sedimentextrakte eine mittlere Cytotoxizität. Einen ebenfalls mäßigen Effekt verursachten die Proben in den drei Testverfahren zur Dioxin-ähnlichen Wirkksamkeit sowie im Comet-Assay und im Mikrokerntest, beide mit der Zelllinie RTL-W1. Keine bzw. geringe toxische Effekte konnten für diesen Standort mit dem Bakterienkontakttest und dem Fischeitertest in beiden Expositionspfaden (Extrakt und natives Sediment) nachgewiesen werden. Die zweitniedrigste gentoxische Belastung wurde im Comet-Assay mit *Danio rerio* für die nativen Sedimente festgestellt. Des Weiteren wurde eine signifikante Mutagenität im Ames-Test mit dem Stamm TA98 erst durch eine Bioaktivierung festgestellt, wodurch dieser Standort im Vergleich mit den anderen Proben jedoch das höchste mutagene Potential erreichte. Insgesamt ergibt sich dadurch ein sehr heterogenes Belastungsprofil für diesen Standort, das jedoch insgesamt auf eine mäßige bis leicht erhöhte Belastung schließen lässt. Dessen ungeachtet kann aber aufgrund der Ergebnisse bei den Tests mit nativen Proben, bei denen keine oder nur eine geringe Toxizität festgestellt wurde, davon ausgegangen werden, dass die am Sediment gebundenen Schadstoffe nur wenig bioverfügbar sind. Bezüglich der Ergebnisse aus dem Ames-Test bedürfen die Schadstoffe erst einer Bioaktivierung, um ihr toxisches Potential zu entfalten.

Tab. 3.25: Zusammenfassung aller in dieser Studie gemessenen *In vitro*- und *In vivo*-Parameter.

Testmethode	Expositions- pfad	Organismus Zelllinie	Messparameter	Sigmaringen	Lauchert	Schwarzach	Riedlingen	Rottenacker	Ehingen	Öpfingen	Ingolstadt	Bad Abbach	Jochenstein
Bakterienkontakttest	Nativ	<i>Arthrobacter</i>	EC ₇₅ [mg/ml]	260	87,5	54	74	< 21	122	27	157	178	170
	Extrakt	<i>globiformis</i>	EC ₂₅ [mg/ml]	k.E.	k.E.	128	k.E.	-	50	140	165	198	k.E.
Ames-Test	Extrakt	TA98 +S9	LOEC [mg/ml]	31,25	250	k.E.	62,5	-	62,5	31,25	k.E.	k.E.	k.E.
	Extrakt	TA98 -S9	LOEC [mg/ml]	k.E.	500	k.E.	15,6	-	k.E.	15,6	k.E.	k.E.	k.E.
Neutralrottest	Extrakt	RTL-W1	NR ₅₀ [mg/ml]	36	173	20	182	4,8	20	20	35	26	46
Comet-Assay	Nativ	<i>Danio rerio</i>	CDI	0,2	0,11	1,28	0,27	1,59	1,29	0,88	0,79	0,7	0,46
	Extrakt	RTL-W1	CDI	1,49	0,65	3,88	0,91	11,4	2,73	4,05	1,58	1,17	0,98
DR-CALUX-Assay	Extrakt	H4IIE	Bio-TEQ [pg/g]	1006	633	5303	42	7583	2281	10162	4136	4343	1006
	Extrakt	RTL-W1	Bio-TEQ [pg/g]	2344	756	5049	41	4448	2553	5109	1449	1494	618
GPC.2D-Assay	Extrakt	GPC.2D.Luc	Bio-TEQ [pg/g]	24,1	8,5	32,5	3,6	33,7	8,9	12,2	88,8	28,6	23,3
	Extrakt	RTL-W1	4-NQO-EQ	0,93	0,09	1,45	0,6	3,1	1,33	0,79	0,8	1,04	1,08
Mikrokerntest	<i>In situ</i>	Barben Erythr.	IF	2,1	-	-	3,6	4,6	4,1	-	-	-	-
	Nativ	<i>Danio rerio</i>	EC ₅₀ [mg/ml]	> 600	> 600	53	545	17,5	45,5	25	89	97,5	213,5
Fischartest	Extrakt		EC ₅₀ [mg/ml]	> 200	> 200	70	> 200	50	27	75	149	128	169

k.E. = kein Effekt

niedrigster Effekt

zweit-niedrigster Effekt

höchster Effekt

zweit-höchster Effekt

-
- **Lauchert:** Dieser Zufluss, der bei Sigmaringen-Dorf in die Donau mündet, wurde explizit als Referenzstandort ausgewählt, da er auch noch über einen ausreichend guten Fischbestand verfügt (persönliche Mitteilung durch Dr. K. Wurm). Der gute Zustand der Lauchert wurde auch durch nahezu alle Tests und Analysen dieser Studie bestätigt. Im Neutralrottest, Comet-Assay, Mikrokerntest und dem Fischeitest wurde für die Sedimentprobe aus der Lauchert stets eine sehr geringe bzw. keine ökotoxikologische Belastung nachgewiesen. Lediglich im Bakterienkontakttest mit nativen Sedimenten ergab sich eine mittlere toxische Belastung. Auch die chemischen Analysen sowohl der organischen Schadstoffe als auch der Schwermetalle ergab sehr niedrige Schadstoffkonzentrationen, die mit der Güteklasse II (nach ATV für PAHs) bzw. der Gewässergüteklasse I (nach LAWA) vereinbar sind. Bezüglich des Makrozoobenthos-Bestandes erreichte die Lauchert den niedrigsten Saprobienindex (1,7; Grund 2005, Seitz 2005) aller untersuchten Standorte, was auf eine geringe Belastung mit biologisch abbaubaren Substanzen hindeutet. Demzufolge ist dieser Zufluss der Güteklasse I-II zuzuordnen. Damit erfüllte die Lauchert sowohl bezüglich der chemischen als auch der biologischen Wassergüte die Zielvorgaben der LAWA und auch der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL 2000).
 - **Schwarzach:** Die Schwarzach ist der zweite Zufluss, der für die Beprobungsstrategie in dieser Studie ausgewählt wurde, da sie bereits in früheren Untersuchungen als kritisch belastet galt (Wurm 2001). Mit der ökotoxikologischen Untersuchung der Schwarzach sollte geprüft werden, ob und in welcher Form von diesem Zufluss eine Gefährdung für die Fischbestände der Donau ausgeht. Die Resultate der hydrologischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen deuteten auf einen erhöhten Stickstoffeintrag hin. Der Belastungszustand hinsichtlich des Stickstoffgehaltes war gemäß der Güteklassifikation als kritisch (II - III) einzustufen und erfüllte somit nicht die Zielvorgabe der LAWA bzw. das Qualitätsziel der EU-WRRL. Durch die Makrozoobenthos-Erhebung wurde unter anderem auch der Saprobienindex ermittelt, der jedoch nur eine mäßige Verunreinigung der Schwarzach mit biologisch abbaubaren Substanzen nachwies. Dagegen deuten die Ergebnisse des Diversitätsindex nach Shannon-Weaver und der Evenness auf ein gestörtes Ökosystem und eine starke Degradation der Makrozoobenthos-Biozönose hin, die sich in der geringen Artenvielfalt dieses Standorts widerspiegeln (vgl. Grund 2005 und Seitz 2005). Durch die chemische Analyse konnte für die Schwarzach eine extrem hohe Belastung mit PAHs (Σ 16 PAHs = 26,3 mg/kg) festgestellt werden, sie muss daher gemäß der ATV-Klassifizierung der Güteklasse V zugeordnet werden. In den Tests zur Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit (DR-CALUX- und EROD-Assay) konnten über 50 % des hohen Effektes auf diese PAH-Kontamination zurückgeführt werden (vgl. Abs. 3.6.2). Auch in nahezu allen anderen Biotestverfahren wurde für die Sedimentproben aus der Schwarzach mit die höchste ökotoxikologische Belastung festgestellt. Lediglich im Ames-Test konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Dies ist jedoch vermutlich auf eine im Bakterienkontakttest beobachtete hohe akute Toxizität zurückzuführen, die die mutagene Wirkung maskierte. Die Schwarzach ist ein verhältnismäßig kleiner Zufluss, und der Einfluss auf die Gewässergüte der Donau ist aufgrund der geringen Abflussrate als eher gering einzuschätzen. Jedoch wird die Schwarzach von verschiedenen Fischarten als Winterquartier genutzt (persönliche Mitteilung durch Dr. K. Wurm), weshalb im Zusammenhang mit der extrem hohen PAH-Belastung der Sedimente ein Einfluss auf die Fischpopulation nicht auszuschließen ist.
 - **Riedlingen:** Die Gewässermorphologie am begradigten Fluss mit befestigten Ufern war als naturfern einzustufen. Sie bot wenig heterogene Lebensräume und kaum Schutz vor der

- erhöhten Fließgeschwindigkeit. Möglicherweise erklärt dies die geringe Artenzahl des Makrozoobenthos sowie den mäßigen Saprobienindex (2,1, Güteklasse II). Dies dürfte sich auch indirekt nachteilig auf die Fischpopulation auswirken, da das Makrozoobenthos als Nahrungsgrundlage für Fische dient und die naturferne Gewässermorphologie Fischen kaum Unterstands- und Versteckmöglichkeiten bietet. Die chemische Analyse ergab eine sehr geringe Belastung mit Schadstoffen, was jedoch auf ein sehr grobes Sediment zurückzuführen ist, an das nur wenige organische Verbindungen absorbieren können (TOC = 0,8 %). Demzufolge ist es auch nicht überraschend, dass die Sedimentproben aus Riedlingen keine oder nur geringe Effekte in allen *In vitro*-Biotestverfahren aufwiesen. So konnte beispielsweise in keinem der drei eingesetzten Tests zur Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit ein erhöhter Effekt durch AhR-Agonisten beobachtet werden. Die bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Leber von Barben beobachteten leichten Veränderungen in der ultrastrukturellen Organisation deuten auf einen geringen Belastungszustand der Donau hin, könnten aber auch auf einer durch den Transport bedingten Stresssituation beruhen. In den Erythrocyten dieser Fischart konnte zwar eine signifikant erhöhte Induktion an Mikrokernen nachgewiesen werden, die jedoch im Vergleich mit anderen Untersuchungen nur auf eine geringe bis mäßige gentoxische Belastung schließen lässt.
- **Rottenacker:** In nahezu allen aufgenommenen *In vitro*, *In vivo*- und *In situ*-Parametern erwies sich der Standort Rottenacker mit am stärksten belastet. Insbesondere die höchste gentoxische Induktion in allen hierfür eingesetzten Biotests (Comet-Assay und Mikrokernstest) mit den unterschiedlichen Organismen bzw. Zellkulturen und den verschiedenen Expositionsszenarien (extrahierte und native Sedimente) weisen auf eine erhebliche gentoxische Belastung dieses Standortes hin. Die genauen Ursachen, die für dieses hohe ökotoxikologische Schädigungspotential verantwortlich sind, bleiben jedoch ungeklärt, da alle erfassten prioritären organischen Verbindungen unauffällige Konzentrationen zeigten. Hierbei bleibt aber zu beachten, dass für diesen Standort keine PAH-Daten zur Verfügung standen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass im EROD- und DR-CALUX-Assay nur ein geringer Anteil (1 - 3 %) der AhR-vermittelten Aktivität den prioritären PCBs und PCDD/Fs zugeordnet werden konnte, und daher ein Großteil der Induktion auf nicht-prioritäre und weniger persistente Schadstoffe zurückzuführen ist. In Anbetracht eines TOC-Gehaltes von ca. 10 % erscheint es daher wahrscheinlich, dass in den Sedimenten von Rottenacker ein erhebliches ökotoxikologisches Schädigungspotential vorliegt, das vermutlich maßgeblich durch nicht-prioritäre Schadstoffe verursacht wird. Des Weiteren wurden an diesem Standort die höchsten Schwermetallkonzentrationen gemessen, die jedoch mit der Güteklasse I oder I-II vereinbar sind (LAWA 1998). Lediglich der erhöhte Zink-Gehalt lässt auf eine kritische Belastung schließen. Auch durch die ultrastrukturelle Untersuchung von Hepatocyten aus der Barbe konnten deutliche Veränderungen festgestellt werden, die zumindest teilweise auf eine hohe Schadstoffbelastung zurückzuführen sein könnten. Aufgrund dieser Resultate, ist an diesem Donauabschnitt von einer vergleichsweise hohen Schadstoffbelastung auszugehen. Durch die Makrozoobenthosstudie und die hydrologischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen wurde war für diesen Standort der schlechteste Saprobienindex mit 2,2 und eine leichte Eutrophierung ermittelt (entspricht einer mäßigen Belastung, β -mesosaprob). Die Ergebnisse der *In vitro*-Tests sowie der *In situ*-Untersuchungen an der Barbe werden dadurch aber nur unzureichend widerspiegelt.

-
- **Ehingen:** In früheren Untersuchungen wurde die Donau bei Ehingen stets als ein Belastungsschwerpunkt identifiziert. Seit dem Neubau der kommunalen Kläranlagen, aber auch durch den Ausbau der betriebseigenen Kläranlage der Zellstofffabrik im Jahr 1989, wurden die Emissionen soweit gesenkt, dass keine Auswirkungen auf die hydrobiologischen und hydrochemischen Parameter anzunehmen waren. Diese positive Entwicklung zeichnete sich auch in dieser Studie hinsichtlich der biologischen und chemischen Gewässergüte ab, die auf eine mäßige Belastung (Güteklasse II) schließen lässt. Wie bereits für den Standort Rottenacker, ergibt sich auch für Ehingen eine Diskrepanz zwischen den ermittelten Güteklassen und den Resultaten der ökotoxikologischen Untersuchungen, die sich vor allem in einem sehr hohen bakterientoxischen, cytotoxischen und teratogenen Schädigungspotential der Sedimentextrakte äußerten. Für Biotests, bei denen native Sedimente verwendet wurden, ergaben sich hingegen mittlere bis hohe Effekte. Wie bereits für die Sedimentproben aus Sigmaringen festgestellt wurde, lässt dies auf eine geringe Bioverfügbarkeit von Schadstoffen schließen. Lediglich im Comet-Assay mit *Danio rerio* konnte eine hohe gentoxische Belastung für die nativen Sedimente ermittelt werden. Auch kann aufgrund der Ergebnisse im Ames-Test vermutet werden, dass die sedimentbürtigen Schadstoffe erst einer Bioaktivierung bedürfen, um mutagen wirksam zu sein. Durch die *In vitro*-Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität von AhR-Agonisten konnte im Vergleich zu den anderen Standorten nur eine mäßige bis mittlere Dioxin-ähnliche Wirksamkeit festgestellt werden, die auch mit einer verhältnismäßig geringen PAH-Belastung einhergeht (Güteklasse II, nach ATV; Ahlf et al. 2002). Hierbei ist jedoch wiederum zu beachten, dass der größte Teil der Induktion im Biotest nicht durch die chemische Analyse erklärt werden konnte. Des Weiteren zeigten die histopathologischen Untersuchungen an der Leber erhebliche Veränderung in der Ultrastruktur der Hepatocyten, was auf eine hohe Schadstoffbelastung zurückgeführt werden könnte. Insgesamt ergibt sich für die Donau bei Ehingen eine heterogene Belastungssituation, die vermutlich auch auf die Einleitung der Kläranlagenabwässer aus der Papierfabrik zurückgeführt werden könnte.
 - **Öpfingen:** Der Öpfinger Stausee fiel in der Vergangenheit unter anderem durch eine starke Sedimentationstendenz sowie hoch belastete Altsedimente, z.B. aus der Papierfabrik Ehingen, auf (Hölzinger 1977, Wurm 2001). Auch in dieser Studie wurde eine hohe Belastung mit verschiedenen organischen Schadstoffen beobachtet. Insbesondere die PAHs erreichten mit einer Konzentration von 5,3 mg/kg den zweithöchsten gemessenen Wert in dieser Studie; demnach wurde dieser Probenstandort nach der ATV-Klassifizierung der Güteklasse III zugeordnet. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der eingesetzten Biotestbatterie wider, vor allem im EROD- und DR-CALUX-Assay, in denen die höchsten durch AhR-Agonisten induzierten Effekte gemessen wurden. Bezüglich des gentoxischen bzw. mutagenen Schädigungspotentials ergibt sich eine sehr heterogene Belastungssituation. Durch die Exposition gegenüber Sedimentextrakten konnte zwar im Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen die zweithöchste Induktion nachgewiesen werden, im Mikrokerntest mit der gleichen Zelllinie wurde jedoch nur eine geringe bis mittlere Gentoxizität festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass Substanzen, die ihre gentoxische Wirkung dadurch entfalten indem sie direkt den Spindelapparat einer Zelle schädigen, weniger präsent sind. Im Ames-Test wurde sowohl mit als auch ohne S9-Aktivierung eine signifikante Mutagenität beobachtet, wobei ohne S9-Supplementierung ein etwas höherer Effekt erzielt wurde. Aufgrund der Ergebnisse aus den bioanalytischen und chemischen Untersuchungen muss für den Öpfinger Stausee von einer insgesamt sehr

hohen ökotoxikologischen Belastung ausgegangen werden. Das nicht alle Biotests einen sehr hohen Effekt aufwiesen, ist vermutlich auf die verschiedenen spezifischen Wirkungsmechanismen der beteiligten Schadstoffe zurückzuführen.

- **Die bayrischen Standorte:** Die drei bayrischen Standorte **Ingolstadt, Bad Abbach** und **Jochenstein** wiesen in fast allen Biotestverfahren eine geringe bis mittlere Toxizität auf, die tendenziell mit dem Flussverlauf in Richtung Jochenstein abnahm, was auf einen Verdünnungseffekt durch die verschiedenen Zuflüsse – vorwiegend aus den Alpen – zurückgeführt werden könnte. So wurde beispielsweise im Ames-Test bei keinem der drei Standorte eine signifikante Mutagenität nachgewiesen. Die größte Dioxin-ähnliche Wirksamkeit im GPC.2D-Assay wurde für das Sedimentextrakt aus Ingolstadt ermittelt.

Ein Fischrückgang ist für die bayrische Donau nicht beschrieben. Der Grund für die Miteinbeziehung dieser drei Standorte in diese Studie war, festzustellen, ob eventuell die Donau in Bayern ein ähnlich hohes oder gar höheres ökotoxikologisches Schädigungspotential aufweist als die obere Donau in Baden-Württemberg. Wäre dies der Fall gewesen, müsste man davon ausgehen, dass kein Zusammenhang zwischen dem beschriebenen Fischrückgang und der für einige Standorte der oberen Donau festgestellten hohen ökotoxikologischen Belastung hergestellt werden könnte. Des Weiteren sollte jedoch nicht vernachlässigt werden, dass auch andere Ursachen, wie z.B. die mangelnde hydromorphologische Gestaltung der Donau, für den Rückgang der Fischereierträge verantwortlich gemacht werden könnten.

Aus der Beschreibung aller untersuchten Standorte ergibt sich insgesamt eine sehr heterogene ökotoxikologische Belastungssituation an der Donau und an den beiden Zuflüssen Lauchert und Schwarzach, die jedoch durchaus die Identifizierung einzelner „Hot Spots“ bzw. gering belasteter Probennahmestellen zulässt. So konnte für die Sedimente aus der Lauchert, Riedlingen und Jochenstein meist kein oder nur ein geringer Effekt festgestellt werden. Dagegen wurde für die Schwarzach sowie für die Donaustandorte Rottenacker, Ehingen und den Öpfinger Stausee eine hohe bis sehr hohe ökotoxikologische Belastung nachgewiesen, die zumindest teilweise durch eine Kontamination der Sedimente aus der Schwarzach und Öpfingen mit prioritären PAHs erklärt werden könnte. Des Weiteren ergab sich für Sigmaringen aber auch Ehingen ein sehr inhomogenes Belastungsmuster bezüglich aller biologischen und chemischen Daten. Für diese beiden Standorte konnte jedoch festgestellt werden, dass eine deutlich geringere Belastung von den nativen Sedimentproben ausging als von den acetonischen Extrakten, was auf eine relative geringe Bioverfügbarkeit der Schadstoffe schließen lässt. Insbesondere durch die aufgenommenen *In vivo*- und *In situ*-Parameter (Mikrokern-test mit Barben-Erythrocyten und ultrastrukturelle Organisation von Hepatocyten) konnten die Ergebnisse der übrigen biologischen Testverfahren hinsichtlich ihrer ökologischen Relevanz überprüft und bestätigt werden. Die Makrozoobenthos-Untersuchungen hingegen zeigten zwar zumindest teilweise eine Verschmutzung mit leicht abbaubaren Schadstoffen und eine Störung des natürlichen Gleichgewichts der Biozönose an, doch wiesen die verschiedenen Indizes (Saprobien-, Ernährungstypen-, Diversität- und Evenness-Index; vgl. Grund (2005) und Seitz (2005)) nicht explizit auf eine Belastung mit Schadstoffen hin, sondern spiegelten zu einem großen Teil eine Störung der Gewässermorphologie wider.

Dessen ungeachtet erlauben es die gemessenen Parameter aus den verschiedenen Biotests und chemischen Analysen die unterschiedlichen Standorte im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes unter (öko)toxikologischen Gesichtspunkten zu charakterisieren (Chapman & Hollert 2006), um mögliche Ursachen für den Fischrückgang in der oberen Donau zu identifizieren. Auch lassen die

einzelnen Testsysteme Rückschlüsse darauf zu, welche Art der Belastung vorliegt. So kann festgestellt werden, ob die Schadstoffe bioverfügbar oder so fest an das Sediment gebunden sind, dass sie nur durch ein multiples Extraktionsverfahren nachgewiesen werden können. Dabei muss indes berücksichtigt werden, dass auch durch Hochwasserereignisse eine Vielzahl verschiedener Schadstoffe remobilisiert werden und dadurch ihr ökotoxikologisches Schädigungspotential entfalten können (Hollert et al. 2000). Extrakte liefern daher eine Aussage über die *potentiell verfügbaren* Schadstoffe (Hollert & Braunbeck 2001, Seiler et al. 2006). Des Weiteren kann durch die spezifischen *In vitro*-Tests festgestellt werden, ob z.B. eine gentoxische, teratogene oder akut toxische Belastung über spezielle Wirkungsmechanismen vorliegt. Außerdem können durch histopathologische Methoden ultrastrukturelle Veränderungen der Leber, aber auch anderer Organe von Fischen, untersucht werden. Es können dadurch weitere Hinweise gesammelt werden, die darüber Aufschluss geben, ob sich das ökotoxikologische Schädigungspotential auf die ultrastrukturelle Organisation von Zellen auswirkt, und damit auch eine Störung der Fischpopulation nicht auszuschließen ist.

So liefern die einzelnen Bausteine dieser Weight-of-Evidence-Studie eine Reihe von Indizien, die auf eine Störung der Fischpopulation durch Schadstoffe hindeuten, wobei die Aussagekraft unterschiedlicher Expositionsszenarien bzw. Testsysteme unterschiedlich gewichtet werden sollte. So kommt beispielsweise dem Expositionspfad mit nativen Sedimenten eine erhöhte ökologische Relevanz zu (Ahlf et al. 2002, Feiler et al. 2005, Hollert et al. 2003). Außerdem müssen bestimmte toxikologische Endpunkte, z.B. Gentoxizität oder Mutagenität, stärker berücksichtigt werden als beispielsweise ein bakterientoxischer Effekt. Eine Beeinträchtigung einer Fischpopulation durch eine chronische Exposition der Gameten mit gentoxischen bzw. mutagenen Substanzen ist nämlich nicht auszuschließen (Populationsrelevanz; Anderson & Wild 1994, White et al. 1999, Yauk et al. 2000), auch wenn ein eindeutiger Beweis dafür noch aussteht (Dieckmann et al. 2004a, b). Insgesamt stellen alle in dieser Weight-of-Evidence-Studie verwendeten Tests bzw. ihrer Kombination ein sehr gut geeignetes Konzept dar, um nachzuweisen, dass an der Donau eine erhebliche ökotoxikologische Belastungssituation vorliegt, die sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Fischpopulationen nimmt. Außerdem konnten durch den Weight-of-Evidence-Ansatz verschiedene Belastungsschwerpunkte identifiziert werden, an denen nach möglichen Quellen einer Verschmutzung gesucht werden kann. So ist z.B. nicht auszuschließen, dass durch die Abwässer der Papierfabrik in Ehingen noch eine Vielzahl von Schadstoffen in die Donau gelangen, die durch Klärung des Wassers nicht eliminiert werden können, die aber zu deren Kontamination beitragen, wie die Untersuchungen der Standorte unterhalb dieser Kläranlage zeigen (Ehingen und Öpfinger Stausee; Garcia-Reyero et al. 2001, Klopman & Chakravarti 2002, Murk et al. 2002, Schrenk-Bergt & Steinberg 1998, Sole et al. 1999). In diesem Zusammenhang müssen nochmals die erheblichen Veränderungen in der Leber von Barben aus Ehingen hervorgehoben werden.

Über die Ursachen der sehr hohen PAH-Konzentrationen in der Schwarzach und den damit einhergehenden Effekten in den Biotests können nur Vermutungen aufgestellt werden. Als mögliche Quelle kommt z.B. ein metallverarbeitender Betrieb in Betracht. Ob dieser jedoch den einzigen Verursacher darstellt, bleibt fraglich. Noch schwieriger stellt sich die Situation in Rottenacker dar, wo nach gegenwärtigem Kenntnisstand keine Industriebetriebe vorhanden sind, die für die sehr starken Effekte in nahezu allen Biotests verantwortlich gemacht werden könnten. Eine andere Quelle stellt hier möglicherweise die intensive Landwirtschaft dar.

3.10.2 Statistische Bewertung der Belastung der Donau

Clusteranalyse: Unterstützt wird die Unterteilung der Standorte in unbelastet, gering, mittel, hoch und sehr hoch belastet durch eine Clusteranalyse (Abb. 3.45). Dabei konnten vier verschiedene Cluster (A-D) identifiziert werden, die Standorte mit ähnlichem Belastungsmuster zusammenfassen. Cluster B beinhaltet die gering kontaminierten bzw. unbelasteten Sedimente aus der Lauchert, Riedlingen und Jochenstein. Die anderen Cluster fassen Probenahmestellen mit einem höheren Belastungspotential zusammen. Der Standort Ehingen wurde trotz sehr hoher gen- und bakterien-toxischer Effekte mit Sigmaringen in einen Cluster gruppiert, was auf eine ähnlich hohe ökotoxikologische Belastung dieser Probenstandorte schließen lässt. Die beiden bayrischen Standorte Ingolstadt und Bad Abbach bilden aufgrund ihrer mittleren toxischen Belastung den Cluster C. In den Biotests, aber auch teilweise in den chemischen Analysen, wiesen die drei Sedimentproben aus der Schwarzach, Rottenacker und Öpfingen die höchsten Werte auf, weshalb sie durch die Clusteranalyse in eine Gruppe zusammengefasst wurden. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in der Clusteranalyse nur die Ergebnisse aus den verschiedenen *In vitro*-Biotestverfahren berücksichtigt wurden, was den Schluss zulässt, dass die Ergebnisse aus diesen Biotests sehr gut die chemische Belastung in der Donau widerspiegeln, da in den meisten Fällen eine gute Korrelation zwischen Testspezifischem Effekt und chemischer Belastung festgestellt wurde.

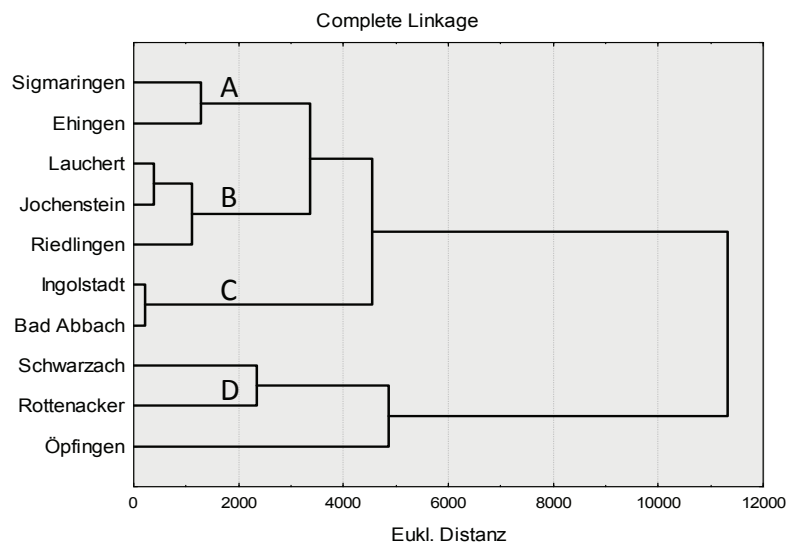


Abb. 3.45: Clusteranalyse (Complete Linkage, Euklidische Distanz) der Befunde aus den bioanalytischen Testverfahren.

Rangsummen-basierte Klassifikation: Abbildung 3.46 gibt exemplarisch eine Übersicht über die Belastungsklassen für die Proben aus der Lauchert und Öpfingen, die mit Hilfe eines Rangsummen-basierten Klassifikationsverfahren berechnet wurden (vgl. Abs. 2.6.6 und Hollert et al. 2002b). Durch die Resultate der biologischen und der chemischen Analyse ist zu erkennen, dass die Sedimente aus der Lauchert ein niedrigeres Schädigungspotential aufweisen als die Probe aus dem Öpfinger Stausee. Diese Form der Darstellung erlaubt einen direkten Vergleich der ökotoxikologischen Belastung der Probenstandorte untereinander. Außerdem können die verschiedenen Parameter direkt in eine Klasse überführt werden.

Die Einteilung in fünf Klassen erfolgte in Anlehnung an die Einstufung des ökologischen Zustands nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL 2000). Demnach ergibt sich nach der Transformation der Daten in Prozentwerte, der anschließenden Aggregation in Belastungsklassen und der

Darstellung der ermittelten Klassen als Boxplots für die Standorte Sigmaringen, Lauchert, Riedlingen, Ehingen und Jochenstein die Klasse 1, für Ingolstadt und Bad Abbach die Klasse 2, für Öpfingen und die Schwarzach die Klasse 3 sowie für den Probenstandort Rottenacker die Klasse 5 (gebildet aus dem Median aller Klassen der jeweiligen Parameter eines Standortes; vgl. Abb. 3.46 und 3.47). Diese Form der Aggregation der Messwerte führt jedoch dazu, dass z.B. die Proben aus Ehingen und Riedlingen trotz sehr unterschiedlicher Ergebnisse in den Biotests der Klasse 1 zugeordnet werden. Dies ist vermutlich auf die sehr niedrigen Schwermetallkonzentrationen in der Sedimentprobe aus Ehingen zurückzuführen. Hierbei bleibt die Tatsache unberücksichtigt, dass nach der Klassifikation der LAWA auch die Schwermetallkonzentrationen im Sediment von Riedlingen immer noch der Güteklasse 1 entsprechen (vgl. Tab. 3.9) und nicht, wie in der Rangsummen-basierten Klassifikation,

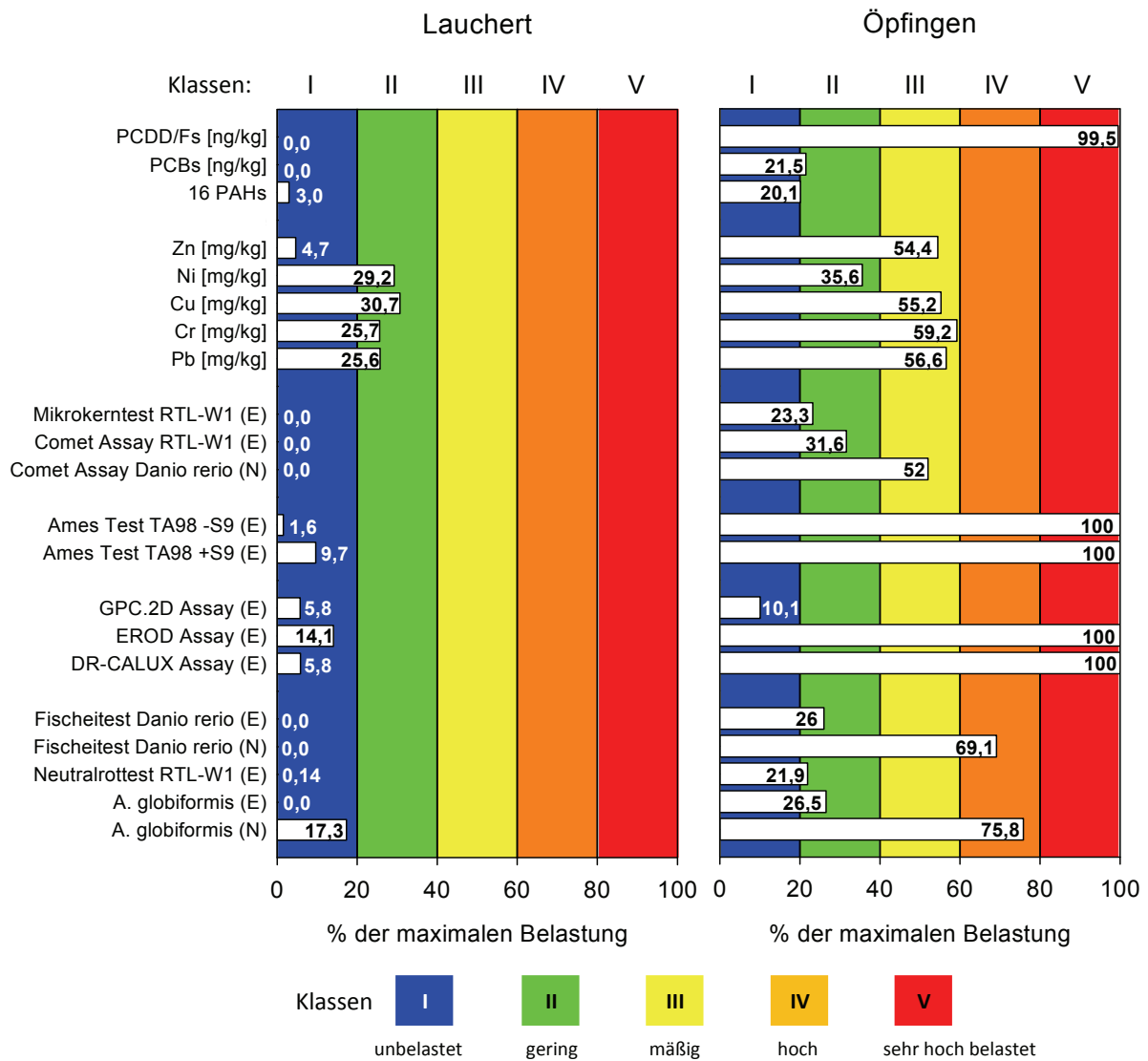


Abb. 3.46: Rangsummen-basierten Analyse, exemplarisch dargestellt für die Proben aus der Lauchert und dem Öpfinger Stausee. Dieser Stausee war in der Vergangenheit insbesondere durch eine Sedimentationstendenz sowie eine hohe Belastung mit Altsedimenten aufgefallen, die sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie widerspiegeln. Die Lauchert ist hingegen als Referenzstandort zu betrachten, der durch seine geringen Schadstoffgehalt und die niedrigen Effekte in nahezu allen Biotests aufgefallen war. Die Prozentsätze in der Grafik wurden mit einem Rangsummen-basierten System berechnet, wobei alle Parameter proportional zwischen 0 % für den geringsten und 100 % für den höchsten Effekt skaliert wurden (Hollert et al. 2002b). Dies ermöglicht, die ökotoxikologische Belastung jedes Standortes in 5 Klassen darzustellen. N = natives Sediment; E = Sedimentextrakt.

die Klasse 2 einnehmen. Das bedeutet, dass durch die Rangsummen-basierte Klassifikation allgemeingültige Grenzwerte und Güteklassen für chemische Verbindungen vernachlässigt werden und es damit zu einer Verfälschung in der Klassifikation kommen kann. Im Fall von Ehingen würde dadurch das mittels der Biotests festgestellte hohe ökotoxikologische Schädigungspotential unterbewertet werden, da für die endgültige Klasse der Median aus allen zur Verfügung stehenden (chemischen und biologischen) Werten berechnet wird. An dieser Stelle zeigt sich auch eine andere Schwäche dieser Form der Klassifizierung, denn es werden nur Daten integriert, die in der jeweiligen Studie insgesamt gemessen wurden, d.h. es handelt sich um ein ortsabhängiges Klassifikationssystem (Babut et al. 2007, Heise et al. 2000). Für die Schwermetalle bedeutet dies, dass trotz sehr niedriger Konzentrationen in allen Proben durch die ortsabhängige Rangsummen-basierten Klassifikation einzelne Standorte zu schlecht bewertet werden. Der umgekehrte Fall ist ebenfalls möglich, d.h. einzelne Standorte werden einer zu 'guten' Klasse zugeordnet. Daraus ergibt sich, dass die ortsabhängige Rangsummen-basierten Klassifikation eine ungeeignete Methode darstellt, um die Belastungssituation eines Flusses in Form von Klassen darzustellen, da eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien nicht möglich ist und eventuell nicht die gesamte Bandbreite eines Effektes abgebildet wird.

Für die verschiedenen Biotests und ihre Parameter liegen zwar keine Grenzwerte vor, dennoch erscheint auch hier eine ortsabhängige Unterteilung in Klassen ungenügend, da es auch im Fall der Biotest durchaus denkbar ist, dass in einer einzelnen Studie durchgehend niedrige bzw. hohe Effekte für einen oder mehrere Parameter festgestellt werden und es dadurch wiederum zu einer Unter- bzw. Überbewertung kommen kann. Der Nachteil der ortsabhängigen Bewertung könnte durch die Integration verschiedener Datensätze aus anderen Studien ausgeglichen werden, was in Abschnitt 4 geprüft werden sollte.

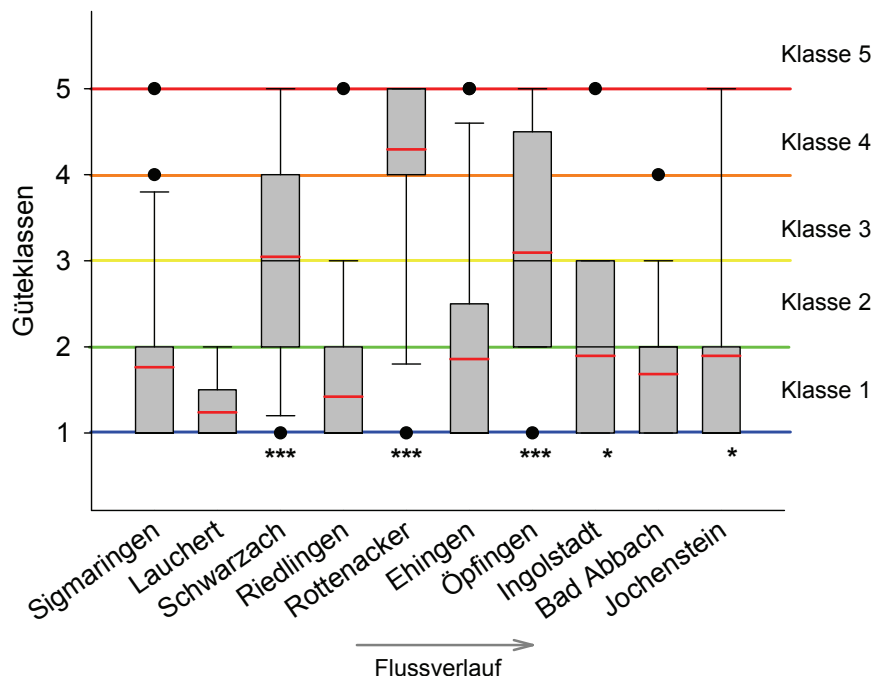


Abb. 3.47: Güteklassifizierung mittels der Rangsummen-basierten Analyse sämtlicher biologischer und chemischer Daten, dargestellt als Boxplots (die rote, gestrichelte Linie in der Box stellt den Mittelwert dar; Punkte markieren das 95 % Konfidenzintervall). Signifikante Unterschiede der Probenstandorte gegenüber der Probe aus dem Zufluss Lauchert wurde mit Hilfe des Rangsummentests nach Mann-Whitney ermittelt (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.10.3 Der Fischrückgang in der Donau und die Europäische Wasserrahmenrichtlinie

Der erste Schritt zu einer gemeinsamen europäischen Wasserpolitik wurde in den 70er Jahren mit der „Richtlinie über gefährliche Stoffe (76/464/EWG)“ unternommen, in der sich die Mitgliedsstaaten das Ziel setzten, die Einleitung von giftigen und biologisch schwer abbaubaren Chemikalien in die Gewässer zu reduzieren. Für Fischgewässer wurde außerdem eine eigene Richtlinie (78/659/EWG) erlassen mit dem Ziel, Verunreinigungen durch bestimmte Schadstoffe wie Nitrat, Phosphat oder Pflanzenschutzmittel zu beschränken. Zu Beginn der 90er Jahre entwickelte die EU-Kommission die Idee einer ökologisch orientierten Gewässerschutzrichtlinie zur Verbesserung der ökologischen Gewässerbeschaffenheit (BMU 2005, Hollert et al. 2007, Irmer 2000). Am Ende des Jahres 2000 wurde diese Idee als Richtlinie 2000/60/EG umgesetzt, mit vollständigem Namen „Richtlinie des Rates zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik“, kurz Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Mit diesem Instrument verfolgt die EU anspruchsvolle Ziele, insbesondere bezüglich der Erreichung eines weitgehend ökologisch ausgerichteten 'guten Zustandes' der Gewässer. Sie werden unter anderem wie folgt formuliert:

- Die Gewässer sind (Grundwasser und Oberflächengewässer einschließlich Ästuare und Küstengewässer) in ihrer Gesamtheit zu schützen. Bis 2015 ist eine weitere Verschlechterung zu vermeiden sowie der Schutz und die Verbesserung des Zustands der aquatischen Ökosysteme zu erreichen.
- Bei der Reduzierung der Schadstoffbelastung der Gewässer ist ein kombinierter Ansatz aus Emissionskontrolle, Gewässerqualitätsstandards und Verbot insbesondere prioritär gefährlicher Stoffe zu verfolgen.
- Des Weiteren soll ein einheitliches Flussgebietsmanagement auf der Basis von Bewirtschaftungsplänen und Maßnahmenprogrammen erarbeitet und die Bildung von Flussgebietseinheiten beziehungsweise Teileinzugsgebieten vorangetrieben werden, die über Territorial- und bestehende Verwaltungsgrenzen hinweg bewirtschaftet werden können.

Außerdem sieht die EU-WRRL die Einordnung der Gewässer nach ihrer ökologischen Qualität in fünf Zustandsklassen vor, wobei Bioindikatoren (Fische, Makrozoobenthos, Wasserpflanzen) und allgemeine chemische und hydromorphologische Parameter berücksichtigt werden sollen (BMU 2005, Graw & Borchardt 1999). Hollert et al. (2007) sehen jedoch insbesondere für Gewässer mit unzureichender chemischer Qualität Nachholbedarf bei der Bestandsaufnahme und im Monitoring. So wurde zwar in der Tochterdirektive aus dem Jahr 2006 gefordert, dass die Konzentrationen von 33 prioritären Schadstoffen bzw. Stoffgruppen in Sedimenten und Biota nicht ansteigen dürfen, doch steht in vielen Fällen das entsprechende Wissen bzw. die Methodik noch nicht zur Verfügung, um diese Stoffe in der Umwelt zu reduzieren oder gar zu eliminieren (Hollert et al. 2007). Des Weiteren birgt nach Hollert et al. (2007) die starke Ausrichtung der WRRL auf das Monitoring von prioritären Schadstoffen die Gefahr, dass mögliche ökologische Konsequenzen, die von nicht-prioritären Schadstoffen ausgehen (Brack et al. 2005, Hollert et al. 2002a, b, Keiter et al. 2007a), nur unzureichend berücksichtigt werden. Deshalb sollen akute und Mechanismus-spezifische Biotestverfahren stärker für eine Identifizierung eines Schädigungspotentials eingesetzt werden, um Nachteile eines rein chemischen Monitorings auszugleichen (Chapman & Hollert 2006, Hollert et al. 2007). So können beispielsweise mittels eines Weight-of-Evidence-Konzeptes die Nachteile einzelner Testmethoden (chemische Analyse, Sedimenttoxizitätstest, Gewebeanalysen, pathologische Untersuchungen und biozönotische Untersuchungen) durch die logische Verknüpfung dieser Ansätze ausgeglichen werden (Johnston et al. 2002). Des Weiteren kann z.B. die Relevanz der Laborbefunde auf die Situation im

Freiland überprüft werden (Burton & Nordstrom 2004, Chapman & Hollert 2006, Johnston et al. 2002), um so eine möglichst umfassende Aussage über die Belastungssituation treffen zu können.

In der vorliegenden Weight-of-Evidence-Studie zum Fischrückgang in der oberen Donau war auch ein Projekt zur umfassenden Aufnahme und Bewertung des Makrozoobenthos als Freiland-Parameter angegliedert. Dabei wurde zwar eine geringe Belastung mit leicht abbaubaren Schadstoffen und teilweise eine geringe Artenzahl beobachtet, jedoch wurde durch die sehr umfangreichen bioanalytischen und chemischen Verfahren für einige Standorte der Donau ein erhebliches ökotoxikologisches Risiko festgestellt. In Anbetracht des sehr deutlichen Fischrückgangs seit Beginn der 80er Jahren muss davon ausgegangen werden, dass die Untersuchung des Makrozoobenthos-Bestandes die Belastungssituation in der Donau nur unzureichend abbildet. Das bedeutet, obwohl die ökologische Ausrichtung der WRRL zu ihren Stärken zählt, kann dies auch dazu führen, dass etwa partikelgebundenen Schadstoffe und die historische Kontamination aus Alt-Sedimenten als Verschmutzungsursache für Oberflächengewässer vernachlässigt werden und dadurch die tatsächliche Belastungssituation nicht ausreichend dargestellt wird (Heise & Förstner 2006, Hollert et al. 2007). Außerdem muss aufgrund des beobachteten Fischrückgangs und der PAH-Kontamination einiger Standorte sowie des hohen ökotoxikologischen Belastungspotentials, das sich auch in den gemessenen *In situ*-Parametern widerspiegelt, davon ausgegangen werden, dass die obere Donau den von der EU-WRRL geforderten ökologisch guten Zustand zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erreicht (Netzband 2007). Insbesondere da in der EU-WRRL die Zusammensetzung, Abundanz und Altersstruktur der Fischgemeinschaft als Qualitätsnorm berücksichtigt wird. So wird auch nach der EU-WRRL der Zustand eines Gewässers als mäßig eingestuft, wenn die Altersstruktur der Fischgemeinschaften größere Anzeichen anthropogener Störungen zeigt, so dass ein mäßiger Teil der tpspezifischen Arten fehlt oder sehr selten ist (EU-WRRL 2000). Daraus leitet sich auch ein dringender Handlungsbedarf ab, um der Forderung der Europäischen Union gerecht zu werden, die Gewässer in ihrer Gesamtheit zu schützen und bis 2015 geeignete Maßnahmen zu treffen, um eine weitere Verschlechterung zu vermeiden sowie den Schutz und die Verbesserung des Zustands des aquatischen Ökosystems Donau – insbesondere der dortigen Fischgemeinschaft – herzustellen.

4. Klassifizierung von Sedimenten unter Verwendung eines Fuzzy-Logik-Expertensystems

Die Fuzzy-Logik führt weg von der gewöhnlichen Mengenlehre mit ihrer ja/nein bzw. 0/1-wertigen Mengenzugehörigkeit zu einem graduellen Zugehörigkeitsbegriff. Sie bietet daher im Gegensatz zu den meisten anderen Klassifizierungsmethoden die Möglichkeit, die jeweilige prozentuale Zugehörigkeit eines Messwertes zu verschiedenen Klassen zu berücksichtigen. Dadurch bleiben bei der notwendigen Aggregation von verschiedenen Untersuchungsmethoden die ursprünglichen Informationen aus den Biotestergebnissen länger für die Klassifizierung erhalten.

In dieser Studie wurden akute (Cytotoxizitätstest) und die Mechanismus-spezifische Toxizität von Sedimenten mit verschiedenen Biotestverfahren (Comet-Assay, EROD-Assay und Fischeitest) ermittelt und unter Verwendung eines Fuzzy-Logik-Expertensystems die Sedimentproben klassifiziert. Die eingesetzten Biotestverfahren variieren jedoch stark in ihrer Sensitivität für verschiedene chemische Substanzen und damit auch bezüglich ihrer Reaktionen auf Umweltproben. Deshalb bedarf es zur Bildung von Grenzwerten (Toxizitätsstufen: nicht-toxisch, moderat-toxisch, toxisch) eines Verfahrens, das die unterschiedliche Sensitivität der Biotests gegenüber komplexen Umweltproben berücksichtigt. Hierfür wurden vier verschiedene mathematische Verfahren vergleichend bewertet (Normalverteilung, Normalisierung, Boxplot- und empirisches Verfahren), um letztlich das System zu ermitteln, welches das Reaktionsspektrum der Biotests am besten abbildet und somit die Basis für eine Klassifizierung in der Fuzzy-Logik darstellen kann.

Des Weiteren wurde zur Bildung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs für die Fuzzy-Logik die Variabilität der Biotests herangezogen. Hierfür wurden die testspezifischen Positiv- und/oder Negativkontrollen verwendet und mittels verschiedener mathematischer und statistischer Verfahren der graduelle Zugehörigkeitsbereich der Klassen bestimmt.

Um der ökologischen Relevanz der verschiedenen gemessenen Endpunkte in der Klassifizierung Rechnung zu tragen, wurden die Toxizitätsstufen der Testverfahren entsprechend ihrem biologischen Organisationsniveau angepasst. Dadurch konnte ein Expertengestütztes ortsunabhängiges Klassifikationsmodell entwickelt werden, das die inhärenten epistemischen und linguistischen Unsicherheiten von ökotoxikologischen Biotestverfahren (Reaktionsspektrum und Variabilität der Biotests sowie deren ökologische Relevanz) berücksichtigt.

Die Fuzzy-Logik bietet im Gegensatz zu den meisten anderen Klassifizierungsmethoden die Möglichkeit, Expertenwissen in Form einer Regelbasis in die Bewertung von Umweltproben mit einzubeziehen (Adriaenssens et al. 2004, Ahlf & Heise 2005, Heise et al. 2000, Hollert et al. 2002b, Tran et al. 2002). Unter Expertenwissen ist unter anderem die Gewichtung von verschiedenen Testsystemen oder unterschiedlichen Expositionsszenarien zu verstehen. So verfügt beispielsweise die Belastung mit nativen Sedimenten über eine höhere ökologische Relevanz als jene mit acetonischen Extrakten, da mit nativen Sedimenten die biologisch verfügbare Schadstofffraktion überprüft werden kann (Hollert et al. 2003). Des Weiteren ist mit der Fuzzy-Logik eine sehr viel genauere Zuordnung eines Messergebnisses in die entsprechende Klasse möglich. Als Beispiel sei eine Sedimentprobe gewählt die im Bakterienkontakttest durch ihre Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von 41 % in die Klasse III eingeteilt wird. Die Toxizität dieses Sediment ist allerdings einem Sediment mit 39 % Hemmung ähnlicher als einem Sediment mit 59 % Hemmung, wobei ersteres durch die scharfen Klassengrenzen der Klasse II zugeordnet würde, während letzteres in Klasse III fallen würde. Die Fuzzy-Logik führt nun weg von dieser 0/1-wertigen Mengen- bzw. Klassenzugehörigkeit zu einem graduellen Zugehörigkeitsbegriff. Sie bietet daher im Gegensatz zu den meisten anderen Klassifizierungsmethoden die Möglichkeit, die jeweilige prozentuale Zugehörigkeit eines Messwertes zu den Klassen zu berücksichtigen, wodurch die ursprünglichen Informationen aus den Biotestergebnissen länger für die Klassifizierung erhalten bleiben (Duft et al. 2003, Heise et al. 2000). Außerdem verfügt die Fuzzy-Logik dadurch über den Vorteil, bei der notwendigen Aggregation von verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Bildung von Klassen, substantielle Informationen in einem weitaus geringeren Maße zu verlieren als beispielsweise mit einer Rangsummen-basierten Klassifikation (Brüggemann & Halfon 1997).

Die hier vorgestellte Fuzzy-Logik-Klassifizierung stellt eine konzeptionelle Weiterentwicklung des bereits von Heise et al. (2000) und Hollert et al. (2002b) vorgestellten Systems zur Bewertung von Sedimenten dar. In dieser Studie wurden zunächst verschiedene mathematische Verfahren geprüft, um biologische Wirkdaten aus vier verschiedenen ökotoxikologischen Testverfahren und zwei unterschiedlichen Expositionsszenarien in Toxizitätsstufen zu überführen (Abs. 4.1.1). Des Weiteren wurde die Variabilität der Biotests untersucht, um den graduellen Zugehörigkeitsbereich zu bestimmen (Abs. 4.1.2). Die daraus gewonnenen Daten und Erkenntnisse wurden genutzt, um Zugehörigkeitsfunktionen zu erstellen (Abs. 4.1.3). Diese Ergebnisse wurden dann wiederum in eine Fuzzy-Logik-Regelbasis implementiert (Abs. 4.2) und auf Messergebnisse aus Sedimentuntersuchungen von Proben aus dem Rhein und der Donau angewendet (Abs. 4.3). Nachträglich wurde außerdem die ökologische Relevanz der eingesetzten Testsysteme berücksichtigt und in die Fuzzy-Logik-Klassifizierung integriert (Abs. 4.4).

4.1 Toxizitätsstufen und Variabilität der Biotests

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus ökotoxikologischen Testverfahren ist folgendes zu berücksichtigen: Die Testsysteme variieren stark in ihrer Sensitivität für verschiedene Substanzen, und damit auch bezüglich ihrer Reaktionen auf Umweltproben, bei denen in den meisten Fällen von einem Gemisch aus verschiedenen Schadstoffen ausgegangen werden kann (Ahlf & Heise 2005). Mess- oder auch Hemmwerte, die in Bezug auf eine Kontrolle ermittelt wurden, können daher nicht über alle Tests hinweg in gleicher Weise interpretiert werden. Deshalb sollten die zur Verfügung stehenden Daten aus den spezifischen Biotests über Boxplots zunächst graphisch dargestellt werden, um so ihr Reaktionsspektrum abzubilden. Darüber hinaus ermöglicht diese Form der Darstellung,

neben drei anderen Verfahren (Empirisches Verfahren, Normalisierung, Normalverteilung; vgl. Abs. 2.6.4.2), die Festlegung der Toxizitätsstufen (= linguistische Variablen: nicht-toxisch, moderat-toxisch, toxisch), die dann als Grundlage für die Regelbasis der Fuzzy-Logik verwendet werden sollen.

Eine der generellen Schwächen der ökotoxikologischen Klassifikation ist ihre Abhängigkeit vom jeweiligen Datensatz (Duft et al. 2003, Heise et al. 2000). Werden in einer Klassifizierung nur die Daten einzelner Proben eines Flussgebietes verwendet, kann es zu Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit auf andere Systeme kommen, da es sich *a priori* um eine ortsabhängige Klassifikation handelt (Heise et al. 2000, Tran et al. 2002). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch Daten aus anderen Studien für die eigene Fuzzy-Logik-basierte Klassifikation verwendet, um ein möglichst ortsunabhängiges Klassifikationssystem zu erhalten. Da jedoch nicht zu allen Biotestsystemen, die in dieser Studie eingesetzt wurden, genügend Daten aus anderen Studien zur Verfügung standen, wurden nur die folgenden Testverfahren für die Klassifikation verwendet: Comet-Assay (Böttcher et al. 2007, Keiter et al. 2006, Kosmehl et al. 2004), Cytotoxizitätstest (Grund et al. 2007, Hollert et al. 2000, Keiter et al. 2006), EROD-Assay (Grund 2005, Hinger 2003, Keiter et al. 2007a, Wölz 2004) und Fischeitest (Hollert 2001, Hollert et al. 2001, 2003, König 2002, Rudolf 2000, Schwartz 2005, Seitz et al. 2007, Ulrich et al. 2002). Während mit den ersten drei *In vitro*-Testverfahren lediglich acetonische Extrakte getestet wurden, konnten im Fischeitest auch native Sedimente auf ihr ökotoxikologisches Schädigungspotential untersucht werden. Ein weiteres Auswahlkriterium war die geringe Korrelation zwischen den ausgewählten Testsystemen (Tab. 4.1), wodurch gewährleistet ist, dass möglichst unterschiedliche Informationen zum ökotoxikologischen Schädigungspotential der Proben in die Klassifizierung miteinbezogen wurden.

Tab. 4.1: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ($n = 28$; $p < 0,05$) zwischen den Ergebnissen der verwendeten Biotestverfahren.

	Neutralrottest	EROD-Assay	Fischeitest (Nativ)	Fischeitest (Extrakt)
Comet-Assay	0,435	0,372	0,623	0,160
Neutralrottest	-	0,515	0,283	0,066
EROD-Assay	-	-	0,255	-0,246
Fischeitest (Nativ)	-	-	-	-0,163

4.1.1 Vergleich der Verfahren zur Bestimmung der Toxizitätsstufen

Zur Ermittlung der Toxizitätsstufen wurden vier verschiedene Verfahren verwendet, um die Datensätze sowohl graphisch abzubilden als auch mathematisch in die drei gewünschten Stufen zu unterteilen. Im folgenden Abschnitt sollen diese vier verschiedenen Verfahren vergleichend auf ihre Eignung geprüft werden, biologische Wirkdaten zu unterteilen, um so Grenzwerte zu bilden, die dann die Grundlage für die Regelbasis der Fuzzy-Logik darstellen. Dies soll exemplarisch an den Messwerten des Cytotoxizitätstest dargestellt werden.

Bei der **Normalisierung** werden, wie auch bei der Rangsummen-basierten Klassifikation, die Daten zunächst nach ihrer Höhe geordnet und in einen vergleichbaren Wertebereich überführt, üblicherweise zwischen 0 und 1 (Abb. 4.1a). Für alle Werte dazwischen wird entsprechend ihrer Größe ein Wert zwischen 0 und 1 berechnet. Dies ermöglicht dann die Unterteilung in drei Intervalle, die dann wiederum die Toxizitätsstufen darstellen. In diesem Fall wurde der Wertebereich in drei gleich große Abschnitte unterteilt, wobei das Reaktionsspektrum des Testverfahrens unberücksichtigt bleibt. Im Falle des Neutralrottests würde diese Form zur Bildung von Grenzwerten dazu führen, dass 61,25 % der Werte als toxisch, 22,5 % als moderat-toxisch und 16,25 % als nicht-toxisch

eingestuft würden. Die Auftragung der Daten als **kumulative Normalverteilung** ist zwar trotz eines nicht-normal-verteilten Datensatzes möglich, führt jedoch zu einem vergleichbaren Ergebnis wie bei der Normalisierung der Datensätze: Das Reaktionsspektrum der Testverfahren bleibt unberücksichtigt, da die Werte nicht normalverteilt sind (Abb. 4.1b). Das bedeutet, die Verwendung dieser Methode würde eine Normalverteilung der Messwerte voraussetzen.

Bei der Bildung von **Boxplots** werden die Daten zunächst nach ihrer Höhe sortiert, wobei die Box die mittleren 50 % aller erfassten Daten repräsentiert. Diese Box stellt im Falle der Toxizitätsstufen den moderat-toxischen Bereich dar und die oberen bzw. unteren 25 % repräsentieren den nicht-toxischen respektive den toxischen Bereich (Abb. 4.1c). Das **empirische Verfahren** entspricht dem Prinzip des Boxplot-Verfahrens mit dem Unterschied, dass es hinsichtlich der Zahl der Messwerte zu einer gleichmäßigen Verteilung der Werte durch die Bildung von drei gleichgroßen Intervallen (je Intervall 33,33 % aller Messwerte) kommt (Abb. 4.1d), wobei auch gleichzeitig das Wirk- bzw. Reaktionsspektrums des Testsystems berücksichtigt wird. Außerdem besteht die Möglichkeit, mehr als nur drei Toxizitätsstufen für die Fuzzy-Logik zu formulieren.

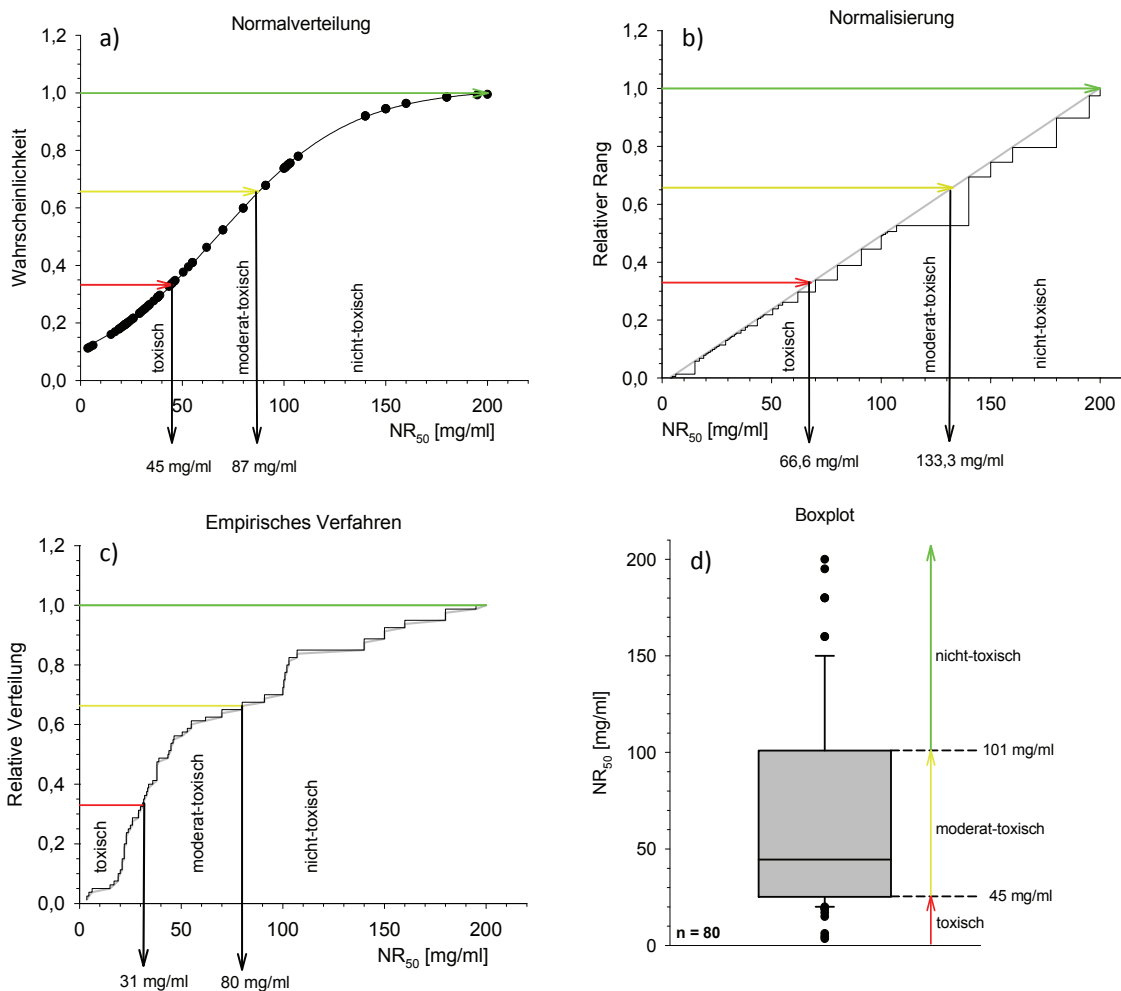


Abb. 4.1: Bildung der Toxizitätsstufen mittels der Darstellung der Daten aus dem Cytotoxizitätstest über die a) Normalverteilung, b) die Normalisierung, c) das empirische Verfahren und d) Boxplot-Verfahren. n = 80.

Da Biotests in ihrer Sensitivität für verschiedene chemische Substanzen und Umweltproben stark variieren, sind für die Bildung von Toxizitätsstufen prinzipiell mathematische Verfahren zu bevorzugen, die diese Sensitivität miteinbeziehen (Ahlf & Heise 2005). Unter Berücksichtigung der bisherigen Untersuchungsergebnisse sind daher das Boxplot- und das empirische Verfahren zu

bevorzugen. Die sich aus den beiden Verfahren ergebenden Grenzwerte zwischen den Toxizitätsstufen (Tab. 4.2) werden als Basis für die Klassifizierung in der Fuzzy-Logik verwendet und vergleichend gegenübergestellt. Die Normalverteilung und Normalisierung der Datensätze werden daher in den folgenden Abschnitten nicht weiter berücksichtigt.

Sonderfall Comet-Assay: Wie in Abschnitt 3.8.2.3 zur Bewertung der gentoxischen Wirkung im Comet-Assay hinreichend diskutiert, besteht ein hoher Bedarf an Aggregationsindices, die sowohl die Höhe als auch die Konzentrationsabhängigkeit dieser Effekte wiedergeben. Der durch Seitz et al. (2007) vorgeschlagene CDI beinhaltet zwar die Information aus beiden Parametern, er wird jedoch aus der Summe der einzelnen $CDI_{Konz.}$ (Quotient aus Induktionsfaktor und entsprechender Konzentration) gebildet, und lässt daher nur den Vergleich zwischen Proben zu, für die eine gleiche Anzahl an Konzentrationen getestet wurde. Dadurch würde die Auswahl an Daten, die für eine ortsunabhängige Klassifikation notwendig sind, stark eingeschränkt werden. Für die Klassifikation wurde daher der Mittelwert aus den $CDI_{Konz.}$ berechnet, was auch einen Vergleich zwischen Proben zulässt, bei denen eine unterschiedliche Anzahl an Konzentrationen getestet wurde (CDI_{MW} = Mittelwert des Concentration-Dependent Induction Factor).

Tab. 4.2: Grenzwerte der drei Toxizitätsstufen in den verschiedenen Biotests, die auf der Basis des Boxplot- (BP) und dem empirischen Verfahren (EV) gebildet wurden.

		nicht-toxisch	moderat-toxisch	toxisch
Comet-Assay [CDI_{MW}]	BP	< 0,21	0,21 - 0,65	> 0,65
	EV	< 0,24	0,24 - 0,5	> 0,5
Cytotoxizitätstest [mg/ml]	BP	> 101	101 - 25	< 25
	EV	> 80	80 - 31	< 31
EROD-Assay [pg/g]	BP	< 560	560 - 1500	> 1500
	EV	< 620	620 - 1250	> 1250
Fischeitstest (Extrakt) [mg/ml]	BP	> 28	28 - 10	< 10
	EV	> 21	21 - 11	< 11
Fischeitstest (Nativ) [mg/ml]	BP	> 180	180 - 54	< 54
	EV	> 130	130 - 65	< 65

CDI_{MW} = Mittelwert des Concentration Depent Induction Factor (vgl. Abs. 3.8.2.3)

4.1.2 Variabilität der *In vitro*-Testsysteme

Die Fuzzy-Logik bietet durch einen graduellen Zugehörigkeitsbereich die Möglichkeit, Werte den entsprechenden Klassen genauer zuzuordnen. Die graduellen Übergänge zwischen den Klassen sollen über die Schwankungsbreite/Variabilität der Kontrollen (Positiv- und/oder Negativkontrolle) der entsprechenden Testsysteme definiert werden. Da, wie bereits erwähnt, die Mess- oder auch Hemmwerte aus Biotestverfahren meist in Bezug auf eine Kontrolle durchgeführt werden, können diese Tests nicht in gleicher Weise interpretiert werden. Im Folgenden soll daher die Variabilität aller für die Klassifikation verwendeten Biotests durch verschiedene mathematische und statistische Verfahren ermittelt werden.

Cytotoxizitätstest: Beim Neutralrottest wird über die Neutralrotretention der Lysosomen die Vitalität der Zellen gemessen. Um die Validität des Testsystems zu überprüfen, werden je Testansatz zwei Negativkontrollen mitgeführt. Für die erste Negativkontrolle werden 100 % Vitalität angenommen, wobei die zweite Kontrolle nicht mehr als ± 20 % von der ersten Kontrolle abweichen darf. Dadurch kann die Variabilität des Testsystems sowohl über die Positiv- als auch über die Negativkontrolle bestimmt werden (vgl. Abs. 2.3.5). Mittels einer Häufigkeitsverteilung konnte festgestellt

werden, dass $\frac{2}{3}$ der Werte der Positivkontrolle eine Vitalität zwischen 6 und 12 % (Abb. 4.2c) und in der zweiten Negativkontrolle ebenfalls ca. $\frac{2}{3}$ aller Daten eine Vitalität zwischen 92 und 116 % gegenüber der ersten Negativkontrolle aufwiesen (Abb. 4.2a). Trägt man die Daten dann als kumulative Normalverteilung auf, ergibt sich sowohl für die Negativ- (Abb. 4.2b) als auch für die Positivkontrolle (Abb. 4.2d) eine Variabilität von ca. 20 % ($\alpha < 0,05$).

Damit stellt sich das Problem, auf welchen Konzentrationswert sich die 20 %-ige Variabilität beziehen soll, um den Zugehörigkeitsbereich in der Fuzzy-Logik zu definieren. Dazu wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: Der höchste zur Verfügung stehende Wert und der Median aller Daten. Bei der Verwendung des höchsten gemessenen Wertes (200 mg/ml) kann es jedoch dazu kommen, dass der Zugehörigkeitsbereich verhältnismäßig groß wird, und es damit möglicherweise zu Überschneidungen zwischen dem nicht-toxischen und dem toxischen Bereich kommt. Des Weiteren kann der Höchstwert einen einzelnen Extremwert darstellen, wodurch wiederum der graduelle Zugehörigkeitsbereich einen zu großen Wertebereich einnehmen könnte, und es dadurch zu einer Verfälschung in der Klassifikation kommt. Der Median aus den Messwerten als Bezugspunkt zur Berechnung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs hingegen berücksichtigt, im Vergleich zum Höchstwert, die Sensitivität des Testsystems und vermeidet ferner einen zu großen Einfluss von Extremwerten auf die Klassifikation. Beide Verfahren sollen vergleichend auf ihre Eignung zur Bestimmung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs getestet werden (auch in allen übrigen Biotests). Der Median aller Cytotoxizitätswerte in dieser Studie beträgt 44,5 mg SEQ/ml, wodurch sich ein gradueller Zugehörigkeitsbereich von 8,9 mg SEQ/ml ergibt. Der höchste gemessene Wert lag bei 200 mg SEQ/ml was einem Zugehörigkeitsbereich von 40 mg SEQ/ml entspricht.

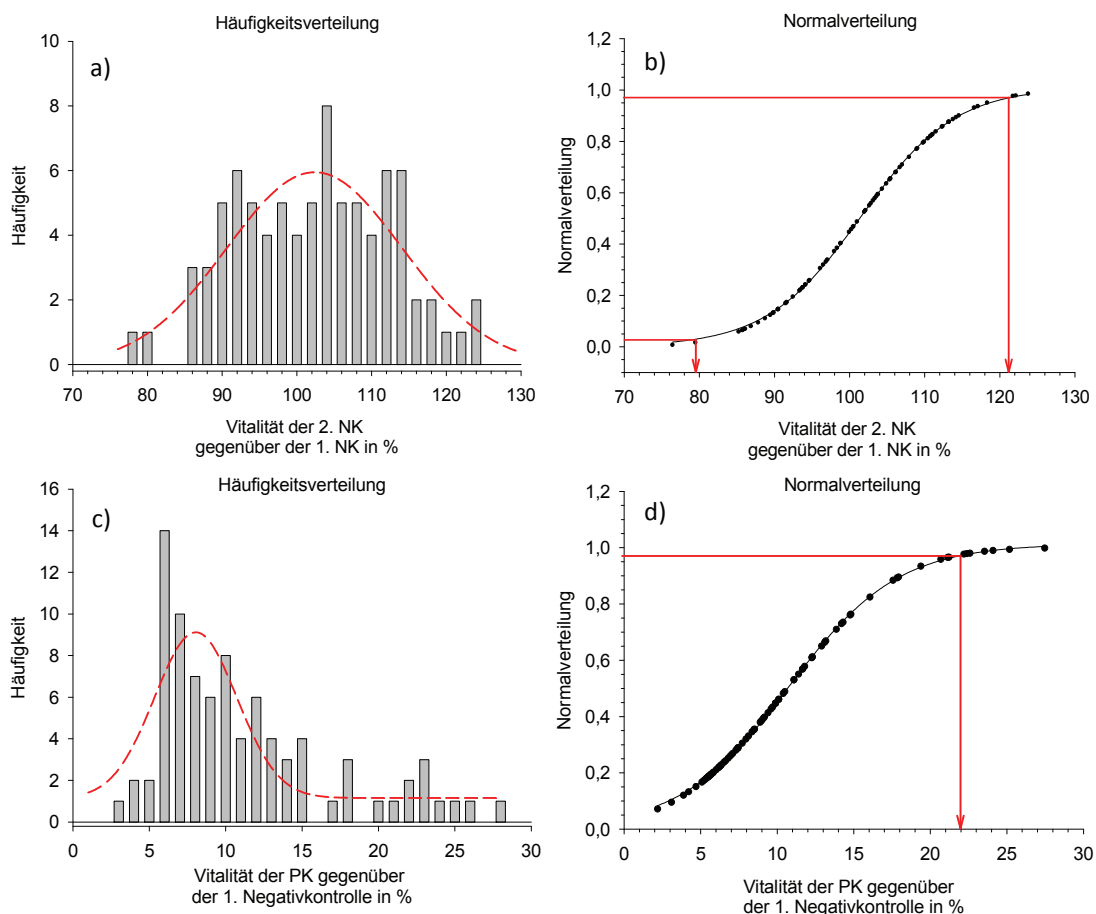


Abb. 4.2: Häufigkeits- und Normalverteilung der Negativ- (NK) bzw. Positivkontrollen (PK) des Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie RTL-W1 zur Bestimmung der Variabilität diese Testsystems. n = 81

Comet-Assay: Da beim Comet-Assay zur Erzeugung der Positivkontrolle UV-Licht eingesetzt wird, kann der CDI für die Positivkontrolle nicht berechnet werden. Auch für die Negativkontrolle ist die Berechnung nicht möglich, da für die Ermittlung des CDIs eine Konzentrationsangabe notwendig ist, die hier *per se* nicht vorhanden ist. Daher muss beim Comet-Assay, wie auch bereits beim Cytotoxizitätstest, eine prozentuale Schwankungsbreite ermittelt werden. Dies soll über das gemessene Tail-Moment erreicht werden (vgl. Abs. 2.3.7.1). Aufgrund des Verschleißes der UV-Leuchte und der Schwankung in der Stromversorgung ist die Verwendung der Positivkontrolle auch hier wenig geeignet, um die Variabilität des biologischen Systems zu ermitteln. Deshalb wurde hierfür lediglich die Variabilität des Tail-Moments der Negativkontrolle verwendet.

Zur Berechnung einer prozentualen Schwankungsbreite wurde für dieses Testsystem der Varianzkoeffizient verwendet. Er ist definiert als die relative Standardabweichung. Diese entspricht der Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert multipliziert mit 100 % (Bärlocher 1999). Durch die Verwendung der doppelten Standardabweichung (2s) ergibt sich für die Berechnung des Varianzkoeffizienten eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0,05$ (Abb. 4.3). Daraus errechnet sich für die Negativkontrolle des Comet-Assays eine Variabilität von 50 %. Wie bereits beim Cytotoxizitätstest, soll zur Berechnung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs der Median und der maximale Wert aller Daten verwendet werden ($CDI_{Median} = 0,32$ und $CDI_{Max} = 3,74$). Daraus ergibt sich ein Zugehörigkeitsbereich von $CDI_{Median} = 0,16$ bzw. $CDI_{Max} = 1,87$.

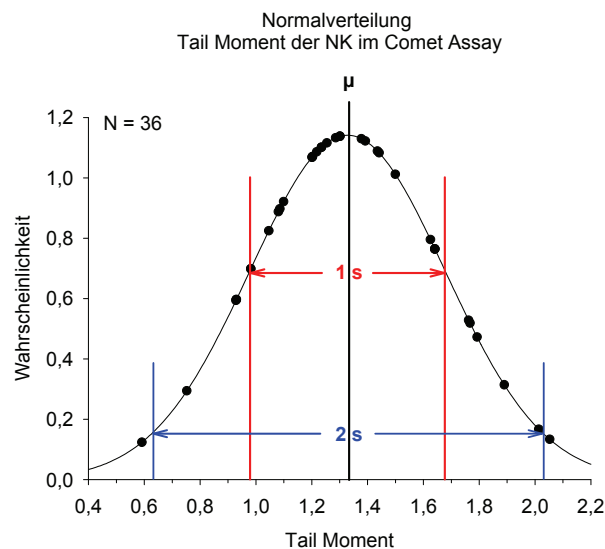


Abb. 4.3: Normalverteilung des Tail-Moments der Negativkontrolle (NK) im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1. μ = Mittelwert; s = Standardabweichung; $n = 36$.

EROD-Assay: Im EROD-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 wurde zur Feststellung der Variabilität des Testsystems die Positivkontrolle (2,3,7,8-TCDD) verwendet. Die Positivkontrolle dient auch zur Berechnung des BioTEQ-Wertes der verschiedenen Proben und ist als die Äquivalenzkonzentration zu 2,3,7,8-TCDD definiert. Die Höhe der EROD-Induktion durch TCDD kann erheblich schwanken. Diese Schwankung hat jedoch keinen direkten Einfluss auf die Berechnung des BioTEQs, da die Induktion der Probe im selben Verhältnis variiert wie die Positivkontrolle (Brack et al. 2000, Seiler 2004). Um dennoch die Variabilität des Testsystems zu ermitteln, wurde bei 59 verschiedenen Positivkontrollen zunächst der Dosis-Wirkungsverlauf dargestellt, und damit der EC_{50} -Wert von 2,3,7,8-TCDD bestimmt. Durch die Verwendung des 95 % Konfidenzintervall entlang des Graphen konnte auch ein minimal und ein maximal möglicher EC_{50} ermittelt werden, wodurch letztlich die Variabilität des Test-

systems mit $\alpha < 0,05$ festgestellt werden konnte (Abb. 4.4). Hierfür wurden die EC_{50} -Werte normalisiert, um die Variabilität in Prozent angeben zu können. Aus dem arithmetischen Mittel aller so berechneten prozentualen Schwankungen ergab sich für den EROD-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 eine Variabilität von ca. 35 %. In dem zur Verfügung stehendem Datensatz liegt der höchste gemessene BioTEQ-Wert einer Probe bei 5109 $\mu\text{g/g}$ und der Median bei 837 $\mu\text{g/g}$. Daraus ergibt sich ein gradueller Zugehörigkeitsbereich für die Fuzzy-Logik von 1788 $\mu\text{g/g}$ bzw. 293 $\mu\text{g/g}$.

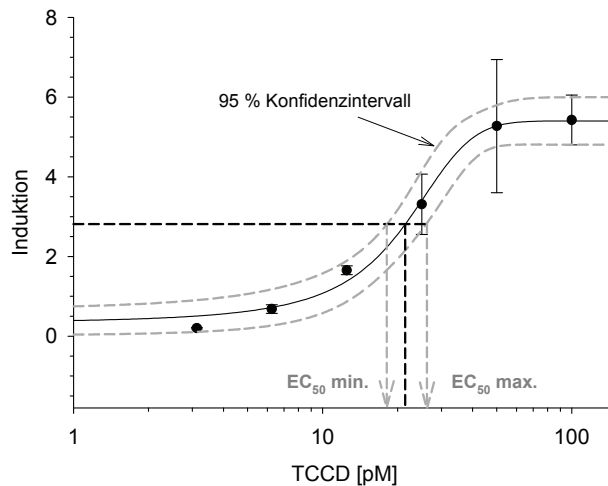


Abb. 4.4: Dosis-Wirkungsverlauf einer exemplarisch ausgewählten Positivkontrolle (TCDD) im EROD Assay mit der Zelllinie RTL-W1 und dem 95 % Konfidenzintervall.

Fisheitest: Im Fisheitest wurde zur Berechnung der Variabilität des Testsystems die Positivkontrolle herangezogen. Hierfür wurden aus 41 Einzeldaten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Berücksichtigt man die doppelte Standardabweichung ($\alpha < 0,05$) erhält man im Fisheitest eine Variabilität von 35 %. Die Berechnung des Varianzkoeffizienten ist hier nicht nötig, da die Mortalität bereits eine Prozentangabe beinhaltet. Dabei ergab sich beim Fisheitest mit Extrakten für einen Median von 17 mg/ml ein Zugehörigkeitsbereich von 6 mg/ml und beim Höchstwert von 169 mg/ml ein Zugehörigkeitsbereich von 51 mg/ml . Im Testansatz mit nativen Proben hingegen resultierten folgende Zugehörigkeitsbereiche: 33 mg/ml bei einem Median von 93,3 mg/ml bzw. 190 mg/ml bei einem maximalen Wert von 545 mg/ml .

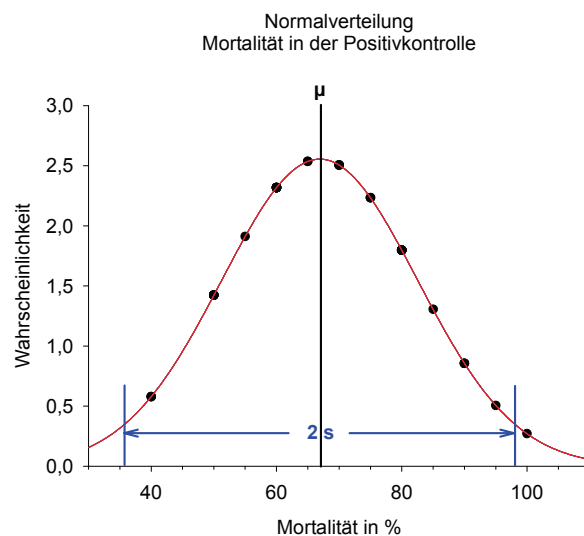


Abb. 4.5: Normalverteilung der Positivkontrollen im Fisheitest mit *Danio rerio* ($n = 41$). μ = Mittelwert; s = Standardabweichung.

4.1.3 Zugehörigkeitsfunktionen in der Fuzzy-Logik

Unter Berücksichtigung der erarbeiteten Grenzwerte zwischen den einzelnen Toxizitätsstufen (Abs. 4.1.1) und der Festlegung der graduellen Zugehörigkeitsbereiche mittels der Variabilität der verschiedenen Biotests (Abs. 4.1.2), konnten Zugehörigkeitsfunktionen für die Fuzzy-Logik entwickelt werden. In Abbildung 4.6 sind die graduellen und absoluten Zugehörigkeitsbereiche exemplarisch für den Cytotoxizitätstest dargestellt (vgl. auch Abs. 2.6.4.3). Dabei ist zu erkennen, dass die graduellen Bereiche deutlich kleiner sind, wenn sich die prozentuale Variabilität auf den Median aller Cytotoxizitätswerte bezieht (Abb. 4.6c und 4.6d).

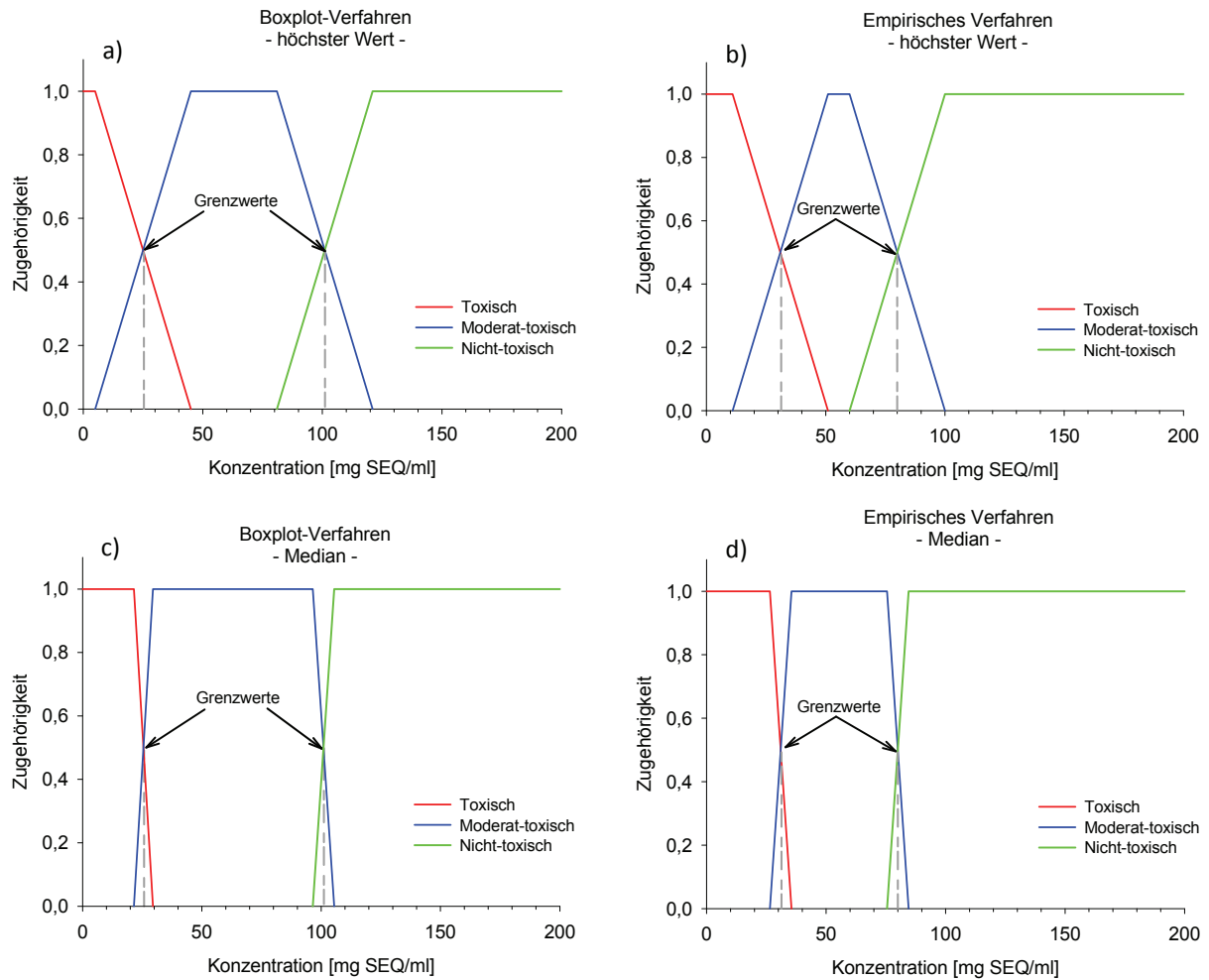


Abb. 4.6: Zugehörigkeitsfunktionen im Cytotoxizitätstest. Die Grenzwerte wurden über das Boxplot- (a und c) und das empirische Verfahren (b und d) ermittelt. Die graduellen Zugehörigkeitsbereiche wurden über die Variabilität des Testsystems (20 %) bestimmt und unter Berücksichtigung des Medians (44,5 mg SEQ/ml; c und d) bzw. höchsten Wertes (200 mg SEQ/ml; a und b) aller zur Verfügung stehender Daten berechnet.

Im Cytotoxizitätstest ist die Variabilität des Testsystems mit 20 % vergleichsweise gering. Im Comet-Assay hingegen beträgt die Variabilität 50 %. Dadurch kommt es bei der Berechnung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs unter Verwendung des höchsten gemessenen Wertes zu einer Überschneidung zwischen den graduellen Bereichen des nicht-toxischen und des toxischen Wertintervalls (Abb. 4.7). Darüber hinaus wird dabei der graduelle Zugehörigkeitsbereich (1,87) sehr viel größer als das moderat-toxische Intervall (vgl. Tab. 4.2). Um dennoch die Zugehörigkeitsfunktionen zu bilden, wurde wie folgt verfahren: Für das Intervall des moderat-toxischen Bereichs, wurde zunächst der Mittelwert (0,43 für das Boxplot-Verfahren bzw. 0,37 für das empirische Verfahren) aus

den beiden Grenzwerten berechnet (vgl. Tab. 4.2). Von diesem Wert wurde der entsprechende graduelle Zugehörigkeitsbereich gebildet, wobei nur der Mittelwert über eine Zugehörigkeit von 1 zu dieser Toxizitätsstufe verfügt. Die Intervalle für den nicht-toxischen und toxischen Bereich wurden wie üblich bestimmt. In allen anderen Testsystemen wurde gegebenenfalls genauso vorgegangen, um die Zugehörigkeitsfunktion zu erstellen.

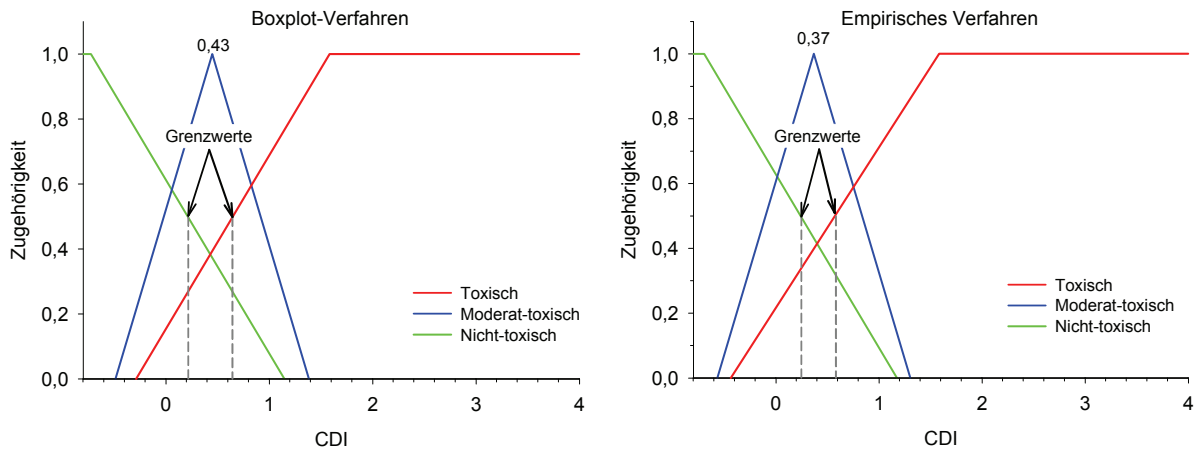


Abb. 4.7: Zugehörigkeitsfunktionen im Comet Assay. Die Grenzwerte wurden über das Boxplot- und das empirische Verfahren ermittelt. Die graduellen Zugehörigkeitsbereiche wurden über die Variabilität des Testsystems (50 %) bestimmt und unter Berücksichtigung höchsten Wertes (CDI = 3,54) aller zur Verfügung stehender Daten berechnet. Zur Berechnung des Zugehörigkeitsbereichs des moderat-toxischen Intervalls wurde jeweils der Mittelwert (0,43 und 0,37) aus den beiden Grenzwerten herangezogen.

4.2 Regelbasis der Fuzzy-Logik

Eine der Stärken der Fuzzy-Logik ist die Implementierung von Expertenwissen in Form einer Regelbasis (Ahlf & Heise 2005, Heise et al. 2000, Hollert et al. 2002b, Shepard 2005) mit WENN-DANN-Entscheidungen. Hierbei kann beispielsweise festgelegt werden, ob und in welcher Form die Ergebnisse der verschiedenen Biotests Einfluss auf die Bildung der Klassen nehmen. Des Weiteren ist die Komplexität der Regelbasis direkt von der Zahl der eingesetzten Biotests (5 Testsysteme mit 3 Toxizitätsstufen bedeuten insgesamt 3^5 Kombinationsmöglichkeiten) und der Gewichtung einzelner Testsysteme abhängig. In Abbildung 4.8 werden so beispielsweise im Fall 2 alle Tests zunächst gleich gewichtet, und obwohl im Fischeitest mit nativen Sedimenten ein toxisches Ergebnis ermittelt wurde (alle anderen nicht-toxisch), wird diese Probe immer noch der Klasse 1 zugeordnet. Jedoch wird bei einem Expositionspfad mit nativen Sedimenten von einer höheren ökologischen Relevanz ausgegangen (Hollert et al. 2003), und daher führt im Fall 1 das toxische Ergebnis aus dem Fischeitest dazu, dass die Probe nur noch der Klasse 2 zugeordnet wird. Diese Form der Gewichtung der einzelnen Biotests, unter Berücksichtigung ihrer ökologischen Relevanz, würde aber zu einer Steigerung der Komplexität der Regelbasis führen. In dieser Studie wurden daher die fünf verwendeten Tests zunächst gleich gewichtet, auch wenn beim Fischeitest mit nativen Sedimenten von einer höheren ökologischen Relevanz ausgegangen werden muss (Hollert et al. 2003), und daher eine höhere Gewichtung der Ergebnisse die logische Konsequenz wäre. In Abschnitt 4.4 wird eine andere Möglichkeit diskutiert, wie die ökologische Relevanz der Biotests in einer Fuzzy-Logik-Klassifizierung berücksichtigt werden kann, ohne die Regelbasis in ihrer Komplexität zu steigern.

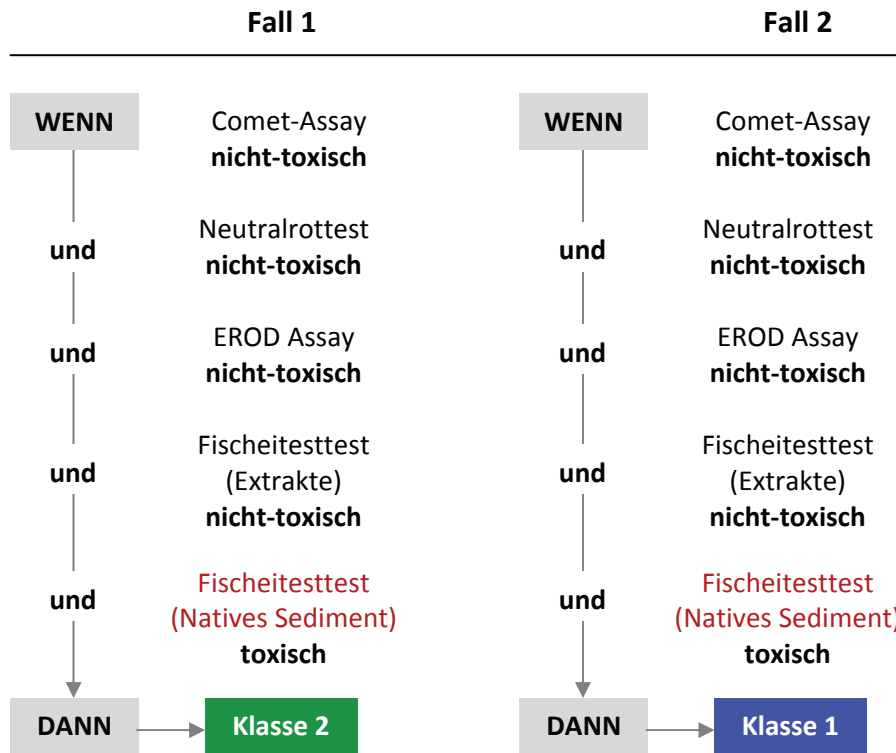


Abb. 4.8: Erläuterung des WENN-DANN-Entscheidungsschemas für die Fuzzy-Logik-Regelbasis, mit (Fall 1) und ohne (Fall 2) Gewichtung des Fischeitests mit nativen Sedimenten (rote Schrift).

Tab. 4.3: Zwei mögliche Modelle die zur Bildung der Klassen führen, unter der Voraussetzung das alle Testverfahren gleich gewichtet sind.

Modell 1	Toxizitätsstufen			Modell 2	Toxizitätsstufen		
	nicht-toxisch	moderat-toxisch	toxisch		nicht-toxisch	moderat-toxisch	toxisch
Klasse 1	5	-	-	Klasse 1	5	-	-
	4	1	-		4	1	-
Klasse 2	4	-	1	Klasse 2	4	-	1
	3	1	1		3	1	1
	3	2	-		3	2	-
Klasse 3	2	3	-	Klasse 3	2	3	-
	3	-	2		3	-	2
	2	-	3		2	-	3
	1	3	1		1	3	1
	2	2	1		2	2	1
	2	1	2		2	1	2
	1	2	2		1	2	2
	1	4	-		1	4	-
Klasse 4	-	4	1	Klasse 4	-	4	1
	-	5	-		-	5	-
	-	3	2		-	3	2
Klasse 5	1	1	3	Klasse 5	1	1	3
	-	2	3		-	2	3
	1	-	4		1	-	4
Klasse 5	-	1	4	Klasse 5	-	1	4
	-	-	5		-	-	5

Des Weiteren muss entschieden werden, welche Kombinationen von toxisch, moderat-toxisch und nicht-toxisch den entsprechenden Klassen zugeordnet werden sollen. In Tabelle 4.3 sind für fünf Biotestverfahren die möglichen Kombinationen der Toxizitätsstufen aufgeführt, die zu den entsprechenden Klassen in der Fuzzy-Logik führen. In dieser Studie wurden hierfür zwei mögliche Modelle gegenübergestellt. Im zweiten Modell werden sowohl der Klasse 1 als auch der Klasse 5 jeweils eine weitere Kombination von drei verschiedenen Toxizitätsstufen zugeordnet, die im Modell 1 noch der Klasse 2 bzw. 4 zugeordnet sind. Dadurch sollte festgestellt werden, ob und in welcher Form eine solche Verschiebung bestimmter Kombinationen zu einer anderen Klasse Einfluss auf die gesamte Klassifikation ausübt. Die Ergebnisse hierzu werden in Abschnitt 4.3 dargestellt (Tab. 4.4). Die Anzahl der Klassen in dieser Studie orientierte sich an der Einstufung der ökologischen Zustandsklassen nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL 2000).

4.3 Ergebnisse der Klassifizierung mittels der Fuzzy-Logik

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse aus der Fuzzy-Logik-Klassifizierung für Sedimente aus der Donau und dem Rhein dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass im Modell 2 im Vergleich zum Modell 1 einige Proben der jeweils nächst schlechteren Klasse zugeordnet wurden. Des Weiteren zeigte sich, dass bei der Bildung der Toxizitätsstufen durch das empirische Verfahren, im Gegensatz zum Boxplot-Verfahren, mehr Standorte auch den Klassen unter- und oberhalb der Klasse 3 zugeordnet wurden. Dies beruht auf der unterschiedlichen Aufteilung der Datensätze. Beim Boxplot-Verfahren werden 50 % der Messwerte als moderat-toxisch eingestuft im empirischen Verfahren nur 33 %. Durch das Boxplot-Verfahren wird der größte Teil der Standorte der Klasse 3 zugeordnet (64 % und 57 % der Standorte gehören zur Klasse 3), im empirischen Verfahren hingegen verteilen sich die Klassen gleichmäßiger, und zwar in beiden Klassifizierungsmodellen. Eine noch deutlichere Verschiebung der Standorte in andere Klassen wurde durch die Verwendung des Medians zur Bestimmung des graduellen Zugehörigkeitsbereichs erreicht, was sich auch in der Häufigkeitsverteilung der Klassen widerspiegelt (Abb. 4.9).

Tab. 4.4: Ergebnisse der Fuzzy-Logik-Klassifizierung unter Verwendung des Boxplot- und empirischen Verfahrens zur Bildung der Toxizitätsstufen. Desweiteren wurde unterschieden, nach welcher Methode (Median bzw. den höchsten zur Verfügung stehenden Messwert (HW)) der graduelle Zugehörigkeitsbereich in der Fuzzy-Logik bestimmt wurde. Die Modelle 1 und 2 repräsentieren zwei verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Toxizitätsstufen zur Bildung der Klassen (vgl. Tab. 4.3).

		Modell 1				Modell 2			
		Boxplot		Empirisches Verfahren		Boxplot		Empirisches Verfahren	
		HW	Median	HW	Median	HW	Median	HW	Median
Donau	Sigmaringen	3	3	3	3	3	3	3	3
	Lauchert	2	2	2	1	2	2	2	1
	Schwarzach	4	4	4	4	5	5	5	5
	Riedlingen	1	1	1	1	1	1	1	1
	Rottenacker	4	4	4	4	5	5	5	5
	Ehingen	4	4	4	4	4	4	4	5
	Öpfingen	4	4	4	4	4	5	5	5
	Ingolstadt	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bad Abbach	3	3	3	3	3	3	3	3
	Jochenstein	2	2	2	1	2	2	2	1

Klassifizierung

		Modell 1				Modell 2			
		Boxplot		Empirisches Verfahren		Boxplot		Empirisches Verfahren	
		HW	Median	HW	Median	HW	Median	HW	Median
Rhein	HRRK1	2	2	2	2	2	2	2	2
	HRRK2	3	3	3	3	3	3	3	3
	HRRS1	3	3	3	3	3	3	3	3
	HRRS2	3	3	3	2	3	3	3	2
	ORMW1	3	3	3	2	3	3	3	2
	ORMW2	3	2	3	2	3	2	3	2
	ORBW1	3	3	3	3	3	3	3	3
	ORBW2	3	3	3	4	3	3	3	4
	ORSW1	3	3	3	2	3	3	3	2
	ORSW2	3	3	3	3	3	3	3	3
	ORIF1	3	3	3	4	3	3	3	4
	ORIF2	3	3	3	3	3	3	3	3
	ORIW1	3	3	4	4	3	3	4	4
	ORIW2	3	2	3	2	3	2	3	2
	ORAA1	3	3	4	3	3	3	4	3
	ORAA2	3	3	4	4	3	3	4	4
	ORWB1	2	2	2	2	2	2	2	2
	ORWB2	2	2	3	2	2	2	3	2

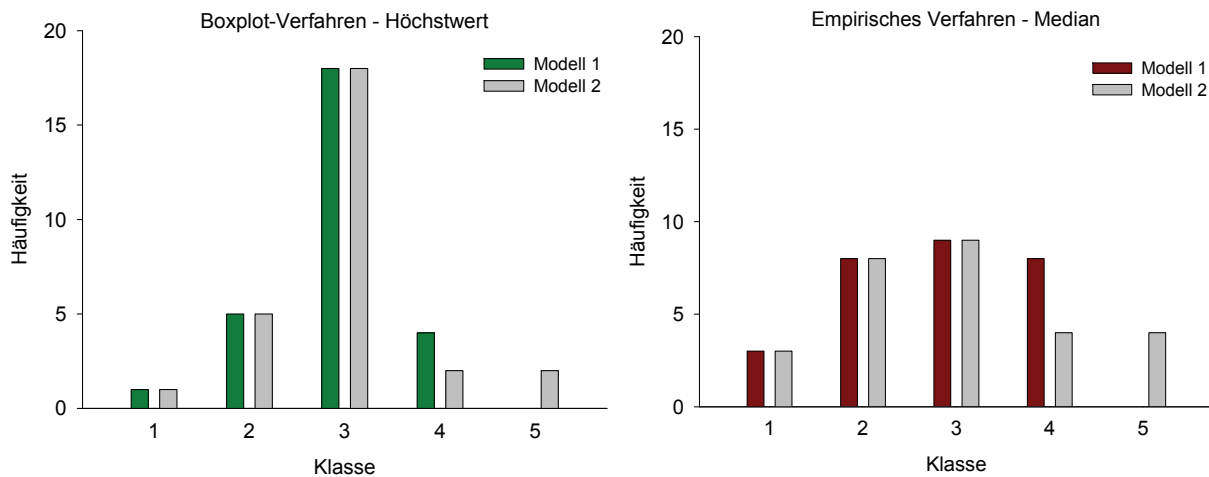


Abb. 4.9: Häufigkeitsverteilung der Klassen nach der Fuzzy-Logik-Klassifizierung mit zwei verschiedenen Modellen und vorheriger Aufteilung der Daten mittels des Boxplot- und empirischen Verfahrens.

Dieser überwiegend optische Eindruck einer besseren und gleichmäßigeren Klassifizierung der Standorte durch die Aufteilung der Daten mittels des empirischen Verfahrens und der Bestimmung des graduellen Zugehörigkeitsbereiches durch den Median im Modell 2 wurde auch statistisch überprüft. Hierfür wurden die Ergebnisse aus den spezifischen Biotestverfahren mit den Klassen der verschiedenen Klassifizierungsmodellen korreliert (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman) und der Mittelwert aus den Korrelationskoeffizienten gebildet (Tab. 4.5), um damit festzustellen, welches Klassifizierungsmodell die Belastungssituation der Sedimentproben am Besten widerspiegelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mittels des empirischen Verfahrens und der Bestimmung des graduellen Zugehörigkeitsbereiches durch den Median in nahezu allen Analysen die höchste Korrelation erreicht wird. Außerdem wird durch das Klassifizierungs-Modell 2 insgesamt eine, wenn auch nur geringfügig, bessere Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *In vitro*-Biotests erzielt.

Tab. 4.5: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ($n = 28$; $p < 0,05$) zwischen den Messergebnissen der *In vitro*-Biotest und den verschiedenen Modellen und Verfahren zur Fuzzy-Logik-Klassifizierung. Fette Zahlen markieren den jeweils höchsten Korrelationskoeffizienten.

		Comet-Assay	Neutralrottest	EROD-Assay	Fischeitest (Nativ)	Fischeitest (Extrakt)	Mittelwert	
Modell 1	Boxplot	HW	0,533	0,694	0,793	0,386	0,039	0,489
		Median	0,657	0,748	0,686	0,483	0,031	0,521
	Empirisches Verfahren	HW	0,718	0,582	0,653	0,601	0,148	0,540
		Median	0,751	0,754	0,612	0,487	0,284	0,578
Modell 2	Boxplot	HW	0,537	0,695	0,791	0,386	0,038	0,489
		Median	0,660	0,747	0,688	0,483	0,028	0,521
	Empirisches Verfahren	HW	0,712	0,619	0,685	0,593	0,112	0,544
		Median	0,749	0,788	0,657	0,527	0,206	0,585

HW = Höchstwert

4.4 Berücksichtigung der ökologischen Relevanz in der Klassifizierung

Sedimentgebundene Schadstoffe verursachen zahlreiche Wirkungen auf allen Ebenen der biologischen Organisation (Burton 1991, Chapman & Hollert 2006, Fent 2004, Lettieri 2006). Die Geschwindigkeit mit der sich ein Effekt einer Schadreaktion manifestiert wird hierbei mit zunehmender biologischer Organisationshöhe abnehmen, während die ökologische Relevanz von ökotoxikologischen Testergebnissen mit steigendem Organisationsniveau zunimmt (Abb. 4.10; Braunbeck et al. 1994b). Diesem ökologisch bedeutenden Zusammenhang wurde im vorliegenden Klassifizierungskonzept Rechnung getragen. Hierfür wurden zunächst die verschiedenen gemessenen Endpunkte der spezifischen Biotests bezüglich ihrer ökologischen Relevanz geordnet, wobei auch das Expositionsszenario berücksichtigt wurde. Diese Sortierung/Gewichtung erhebt allerdings nicht den Anspruch vollständig bzw. endgültig zu sein und bedarf weiterer Forschungen und Diskussionen. Änderungen an der Gewichtung können aber auch verhältnismäßig einfach in der Fuzzy-Logik-Klassifizierung übernommen werden.

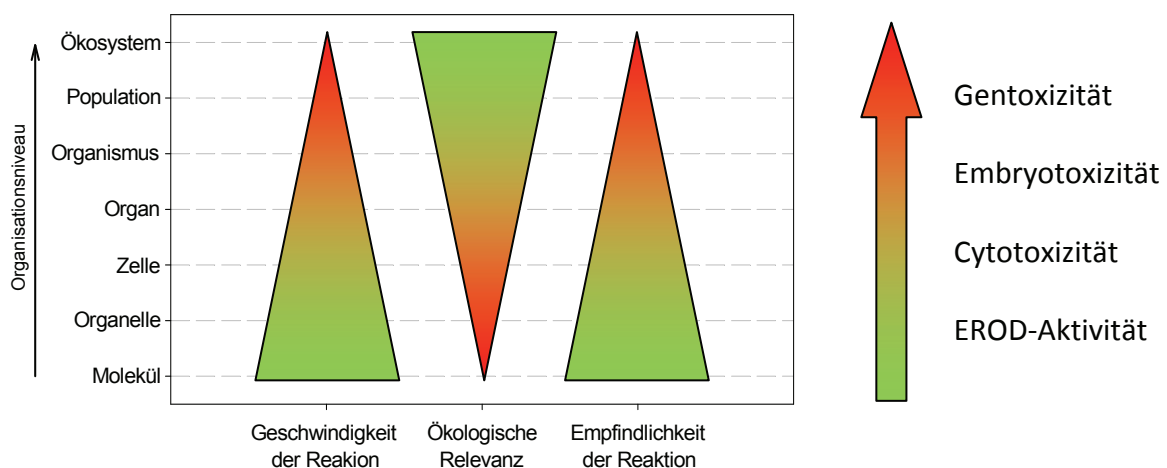


Abb. 4.10: Sortierung der verschiedenen biologischen Organisationsniveaus nach ihrer ökologischen Relevanz sowie deren Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen und die Geschwindigkeit der daraus resultierenden Reaktion (verändert nach Braunbeck (1994b)). Außerdem die Gewichtung, die in dieser Studie eingesetzten Biotestverfahren, die sich aus dem biologischen Organisationsniveau ergibt.

Für den EROD-Assay wurde die niedrigste ökologische Relevanz angenommen, da es sich, dem biologischen Organisationsniveau folgend, um eine Enzymmessung handelt. Im Neutralrottest werden akut cytotoxische Effekte beobachtet, das bedeutet die Integrität der gesamten Zelle wird überprüft, nachdem sie toxischen Substanzen exponiert wurde. Mit dem Fischeitest kann hingegen festgestellt werden, ob durch chemische Verbindungen die embryonale Entwicklung eines gesamten Organismus nachhaltig geschädigt werden kann, wodurch dieses Testsystem den beiden vorherigen übergeordnet wurde. In diesem Testverfahren wurde außerdem noch zwischen zwei Expositionspfaden unterschieden, nativen Sedimenten und Sedimentextrakten. Nach Hollert et al. (2003) verfügt jedoch die Exposition mit nativen Sedimenten über eine höhere ökologische Relevanz als jene mit acetonischen Extrakten. Die höchste ökologische Bedeutung wird in diesem Klassifizierungskonzept dem gentoxischen Effekt zugewiesen, obwohl noch kein Beweis erbracht wurde, der einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Exposition mit gentoxischen Substanzen und der Beeinträchtigung einer gesamten Fischpopulation herstellt (vgl. Abs. 3.8.; Dieckmann et al. 2004a, b). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine chronische Exposition von Gameten gegenüber gentoxisch wirksamen Substanzen zu einer verminderten Vitalität der Gameten führt, und sich damit auch auf die gesamte Population auswirkt (Anderson & Wild 1994, White et al. 1999, Yauk et al. 2000).

Die bisherigen Untersuchungen zur Bildung der linguistischen Variablen (Toxizitätsstufen) ergaben, dass sich das empirische Verfahren am besten eignet, um als Basis in der Fuzzy-Logik zu dienen. Dieses Verfahren kann darüber hinaus auch genutzt werden, um die ökologische Relevanz der spezifischen Biotests zu berücksichtigen. Hierfür wurden die Bereiche der verschiedenen Toxizitätsstufen je nach Bedarf vergrößert bzw. verkleinert (Abb. 4.11). So wurde beispielweise der toxische Bereich im Comet-Assay um 10 % erhöht und der nicht-toxische Bereich um 10 % verkleinert, so dass sich eine Verteilung der Datenmenge wie folgt ergibt: 23,33 % aller Daten im nicht-toxischen, 33,33 % im moderat-toxischen und 43,33 % im toxischen Bereich. Der prozentuale Anteil der moderat-toxischen Daten bleibt bei allen Biotests stets unverändert bei 33,33 %. Bei der Testung des embryotoxischen Schädigungspotentials von nativen Sedimenten im Fischeitest mit *Danio rerio* wurde keine Verschiebung der Toxizitätsstufen vorgenommen.

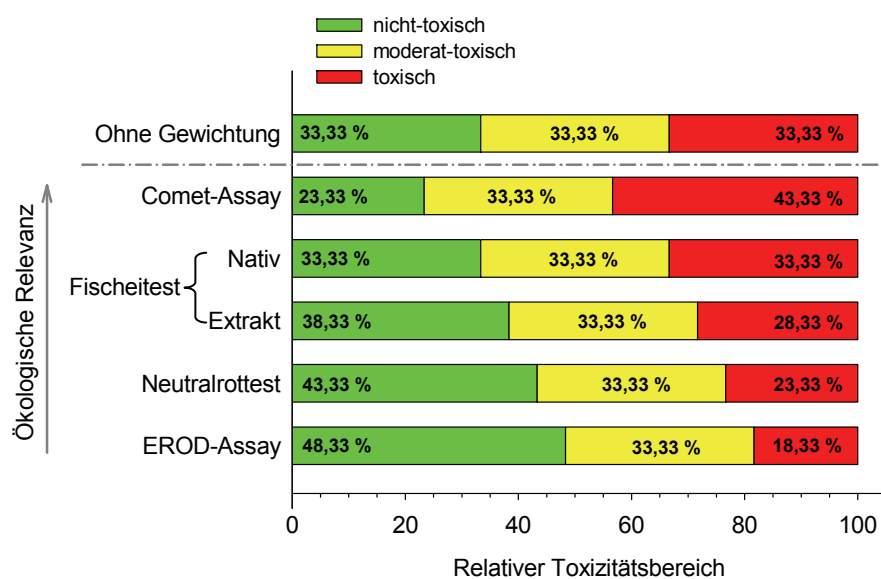


Abb. 4.11: Verschiebung der Toxizitätsstufen zum Zweck der Gewichtung der verschiedenen Biotests (Comet-Assay, Fischeitest, Neutralrottest und EROD-Assay) bzw. der Expositionsszenarien (native und extrahierte Sedimentproben) in Abhängigkeit von ihrer ökologischen Relevanz.

Tab. 4.6: Ergebnisse der Fuzzy-Logik-Klassifizierung für Sedimentproben aus der oberen Donau und dem Rhein mit und ohne Berücksichtigung der ökologischen Relevanz der eingesetzten Biotestverfahren.

Donau	Gewichtung		Rhein	Gewichtung	
	ohne	mit		ohne	mit
Sigmaringen	3	3	HRRK1	2	2
Lauchert	1	1	HRRK2	3	2
Schwarzach	5	5	HRRS1	3	3
Riedlingen	1	1	HRRS2	2	3
Rottenacker	5	5	ORMW1	3	3
Ehingen	5	5	ORMW2	2	2
Öpfingen	5	5	ORBW1	3	3
Ingolstadt	3	3	ORBW2	4	4
Bad Abbach	3	3	ORSW1	2	2
Jochenstein	1	1	ORSW2	3	3
			ORIF1	4	3
			ORIF2	3	3
			ORIW1	4	3
			ORIW2	2	2
			ORAA1	3	3
			ORAA2	4	4
			ORWB1	2	2
			ORWB2	2	2

Modifiziert man die linguistischen Variablen entsprechend den oben genannten Änderungen für die Fuzzy-Logik, konnten nur für 4 Proben Veränderungen in den Klassen beobachtet werden (Tab. 4.6). Auch durch die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (Daten nicht gezeigt) zwischen den Biotestergebnissen und den daraus gebildeten Klassen ergeben sich nur unwesentliche Veränderungen zur Klassifizierung, die eine Gewichtung der Biotests in Abhängigkeit von ihrer ökologischen Relevanz vernachlässigt. Dessen ungeachtet sollte auf die Möglichkeit, das biologische Organisationsniveaus in eine Klassifizierung zu integrieren, nicht verzichtet werden. Eine Gewichtung der verschiedenen Biotests bzw. der erfassten ökotoxikologischen Endpunkte berücksichtigt deren ökologische Relevanz, und ermöglicht somit eine exaktere Bildung von Klassen zur Bestimmung des ökotoxikologischen Schädigungspotentials von Sedimenten (Ahlf & Heise 2005, Hollert et al. 2002b, Tran et al. 2002).

4.5 Bewertung der Klassifizierung von Sedimenten mittels der Fuzzy-Logik

Zur umfassenden integrativen Risikobewertung aquatischer Ökosysteme werden eine Vielzahl verschiedener Parameter mit unterschiedlichen Endpunkten erfasst. Die Interpretation und Analyse dieser Parameter ist aufgrund der komplexen Wechselbeziehungen zwischen den Variablen nicht einfach, da biologische Wirkdaten auch eine gewisse Unsicherheit bergen (Adriaenssens et al. 2004, Bojorquez-Tapia et al. 2002, Tran et al. 2002, Wickham et al. 1999). Mathematische Modelle, die zur Beurteilung von Ökosystemen herangezogen werden, müssen diese Unsicherheiten berücksichtigen, da sie für eine verlässliche Bewertung von entscheidender Bedeutung sind (Adriaenssens et al. 2004). Regan et al. (2002) bestimmten zwei Hauptkategorien von Unsicherheiten: Die epistemische und die linguistische Unsicherheit. Die epistemische Unsicherheit ist nach Regan et al. (2000) als die

Unsicherheit definiert, die mit dem unzureichenden Wissen über ein System, beispielsweise über ein Ökosystem, verbunden ist sowie den technischen Grenzen der verwendeten Messinstrumente, unzureichenden Daten und der Schwankung des Systems über Zeit und Raum. Linguistische Unsicherheiten dagegen entstehen dadurch, dass unsere Sprache und auch häufig der wissenschaftliche Wortschatz unspezifische, vieldeutige, vage und kontextabhängige Aspekte beinhaltet (Regan et al. 2000).

Regel-basierte Bewertungsmodelle berücksichtigen meist nur die linguistischen Aspekte der Unsicherheit in Form von Expertenwissen und/oder biologischen Messwerten (Salski & Kandzia 1996). In regelbasierten Bewertungskonzepten können aber auch durch die Integration der inhärenten Variabilität von biologischen Wirkdaten, die epistemische Unsicherheit miteinbezogen werden (Babut et al. 2007, Silvert 2000). Diese epistemische Unsicherheit wurde in der vorliegenden Studie verwendet, um damit den graduellen Zugehörigkeitsbereich in der Fuzzy-Logik zu berechnen. Die linguistische Unsicherheit dagegen wurde durch folgende Parameter im Fuzzy-Logik-Experten-system miteinbezogen:

- a) Durch das Boxplot- und das empirische Verfahren konnten Toxizitätsstufen gebildet werden, die das Mechanismus-spezifische Reaktionsspektrum der eingesetzten Biotests integrieren.
- b) Das empirische Verfahren ermöglicht die Integration der ökologischen Relevanz der Biotests, und somit auch von Expertenwissen.

Insgesamt konnte dadurch ein Klassifizierungsmodell erstellt werden, dass sowohl die Unsicherheiten biologischer Wirkdaten als auch deren ökologischen Relevanz berücksichtigt, und stellt damit eine konzeptionelle Weiterentwicklung der Fuzzy-Logik-Klassifizierung von Heise et al. (2000) und Hollert et al. (2002b) dar. Des Weiteren erlaubt es die Integration von Expertenwissen und von Mechanismus-spezifischen Effekten, um das ökotoxikologische Belastungspotential von Standorten in Form von Klassen wiederzugeben. Außerdem ermöglicht dieses Klassifizierungsmodell, bei der notwendigen Aggregation von verschiedenen Untersuchungsmethoden, die ursprünglichen Informationen aus den Biotestergebnissen länger für die Bildung von Klassen zu erhalten (Duft et al. 2003, Heise et al. 2000). Ein weiterer Vorteil stellt das verhältnismäßig transparente und einfache Konzept dar, das es auch leicht ermöglicht andere Biotestsysteme zu integrieren bzw. die Gewichtung der unterschiedlichen Parameter zu berücksichtigen. Babut et al. 2007 verglichen auch die Fuzzy-Logik-Klassifikation von Sedimenten mit anderen Klassifikationsverfahren, insbesondere mit dem Score Ordination Approach. Dieses erschien zwar als etwas leichter anwendbar, robuster und auch transparenter, hatte jedoch gegenüber dem Fuzzy-Logik-System den Nachteil, komplexere Zusammenhänge, wie sie in einer WOE-Studie anfallen, nicht so gut bewältigen zu können (Babut et al. 2007).

In weiteren Studien sollte versucht werden, auch die Ergebnisse aus chemischen Analysen (z.B. PAH-, PCB- und PCDD/F-Konzentrationen sowie den Gehalt verschiedener Schwermetalle) und verschiedene *In situ*-Parameter (z.B. Makrozoobenthos-Erhebungen und Mikroerntest an Fischerythrocyten) in die Fuzzy-Logik-Klassifizierung zu integrieren. Außerdem werden Diskussionen über die Gewichtung der unterschiedlichen ökotoxikologischen und chemischen Parameter notwendig sein, um möglichst eine umfassende und exakte Bewertung von Sedimenten in Form von einfachen Klassen zu erreichen.



5. Literatur

- Aarts B.G.W., van den Brink F.W.B. & Nienhuis P.H. (2004): Habitat loss as the main cause of the slow recovery of fish faunas of regulated large rivers in Europe: The transversal floodplain gradient. *River Res Appl* (20), 3 - 23.
- Aarts J.M., Denison M.S., Cox M.A., Schalk M.A., Garrison P.M., Tullis K., de Haan L.H. & Brouwer A. (1995): Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetrachloro- and 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl. *Eur J Pharmacol* (293), 463 - 474.
- Adriaenssens V., De Baets B., Goethals P.L. & De Pauw N. (2004): Fuzzy rule-based models for decision support in ecosystem management. *Sci Total Environ* (319), 1 - 12.
- Ahlf W. (1995): Biotests an Sedimenten. In: Steinberg C., Bernhardt H. and Klappner H. (eds.), *Handbuch Angewandte Limnologie - Teil Aquatische Ökotoxikologie*. Ecomed, 1 - 43.
- Ahlf W. (2007): Comments on the article: 'Optimisation of the solid-contact test with *Arthrobacter globiformis*'. *J Soils Sediments* (7), 67.
- Ahlf W. & Heise S. (2005): Sediment toxicity assessment. *J Soils Sediments* (5), 16 - 20.
- Ahlf W., Hollert H., Neumann-Hensel H. & Ricking M. (2002): A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: A german approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J Soils Sediments* (2), 37 - 42.
- Akcha F., Leday G. & Pfohl-Leszkowicz A. (2004): Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: Effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat Res* (552), 197 - 207.
- Akcha F., Vincent Hubert F. & Pfohl-Leszkowicz A. (2003): Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of *in situ* exposure to genotoxic compounds. *Mutat Res* (534), 21 - 32.
- al-Sabti K. & Metcalfe C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* (343), 121 - 135.
- Alcock S., Barcelo D. & Hansen P.D. (2003): Monitoring freshwater sediments. *Biosens Bioelectron* (18), 1077 - 1083.
- Alvarez M., Quezada C., Molina A., Krauskopf M., Vera M.I. & Thiry M. (2006): Ultrastructural changes of the carp (*Cyprinus carpio*) hepatocyte nucleolus during seasonal acclimatization. *Biol Cell* (98), 457 - 463.
- Ames B.N., McCann J. & Yamasaki E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* (31), 347 - 364.
- Anderson S.L. & Wild G.C. (1994): Linking genotoxic responses to reproductive success in ecotoxicology. *Environ Health Perspect* (102), 9 - 12.
- Andreasen E.A., Spitsbergen J.M., Tanguay R.L., Stegeman J.J., Heideman W. & Peterson R.E. (2002): Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: Effects of developmental stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure. *Toxicol Sci* (68), 403 - 419.
- Anonymous (2005): Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz und Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg - Umsetzung der europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG (WRRL), Bericht zur Bestandsaufnahme gemäß Art.5, Anhang II und Anhang III, sowie Art. 6, Anhang IV, der WRRL für das Deutsche Donaugebiet. 89 pp.

-
- Antkiewicz D.S., Peterson R.E. & Heideman W. (2006): Blocking expression of AHR2 and ARNT1 in zebrafish larvae protects against cardiac toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci* (94), 175 - 182.
- 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), 115 - 127.
- Arcaro K.F., Vakharia D.D., Yang Y. & Gierthy J.F. (1998): Lack of synergy by mixtures of weakly estrogenic hydroxylated polychlorinated biphenyls and pesticides. *Environ Health Perspect* (106), 1041 - 1046.
- Arias I.M., Popper H., Schachter D. & Schafritz D.A. (1988): *The liver: Biology and pathobiology*. Raven Press, 664 pp.
- Arnold H., Pluta H.J. & Braunbeck T. (1996): Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Cytological alterations in the liver by a potent acetylcholine esterase inhibitor. *Ecotoxicol Environ Saf* (34), 43-55.
- 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), 85 - 90.
- Babich H. & Borenfreund E. (1992): Neutral red assay for toxicology *in vitro*. In: Watson R.R. (eds.), *In vitro methods of toxicology*. CRC - Press, 238 - 251.
- Babut M., Oen A., Hollert H., Apitz S., Heise S. & White S. (2007): Prioritisation at river basin scale, risk assessment at site-specific scale: Suggested approaches. In: Heise S. (eds.), *Sediment risk management and communication*. Elsevier, 107-152.
- Bagatto B. (2005): Ontogeny of cardiovascular control in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of developmental environment. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* (141), 391 - 400.
- Barile F.A. (1994): *Introduction to in vitro cytotoxicology: Mechanisms and methods*. CRC Press, 213 pp.
- Bärlocher F. (1999): *Biostatistik*. Thieme Verlag, 206 pp.
- Barrionuevo W.R. & Burggren W.W. (1999): O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): Influence of temperature and ambient O₂. *Am J Physiol* (276), 505 - 513.
- Barron M.G., Carls M.G., Heintz R. & Rice S.D. (2004): Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol Sci* (78), 60 - 67.
- Behnisch P.A., Hosoe K. & Sakai S. (2001): Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and the environment. *Environ Int* (27), 495 - 519.
- Behnisch P.A., Hosoe K. & Sakai S. (2003): Brominated dioxin-like compounds: *In vitro* assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ Int* (29), 861 - 877.
- Behrens A., Schirmer K., Bols N.C. & Segner H. (1998): Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. *Mari Environ Res* (46), 369 - 373.

- Behrens A., Schirmer K., Bols N.C. & Segner H. (2001): Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environ Toxicol Chem* (20), 632 - 643.
- Berbnar T., Rahman N. & Braunbeck T. (1999): Induction of P450 1A and DNA damage in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biomarkers* (4), 214 - 228.
- Bergmann H. & Maass V. (2007): Sediment regulations and monitoring programmes in Europe. In: Heise S. (eds.), *Sediment risk management and communication - Sediment and dredged material treatment*. Elsevier, 207 - 232.
- Bernet D. & Burkhardt-Holm P. (2000): Äschensterben im Inn (Kt. Graubünden). EAWAG - <http://www.fischnetz.ch/basics/publ.htm>, 27 pp.
- BfG (2000): Sedimentbewertung in europäischen Flussgebieten - Sediment Assessment in European River Basins. Beiträge zum internationalen Symposium vom 12. - 14. April 1999 in Berlin. Bundesanstalt für Gewässerkunde, 196 pp.
- Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D., Chikhi L. & Athwal R. (2000): Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat Res* (463), 33 - 51.
- Billiard S.M., Timme-Laragy A.R., Wassenberg D.M., Cockman C. & Di Giulio R.T. (2006): The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol Sci* (92), 526 - 536.
- Birnbaum L.S., Staskal D.F. & Diliberto J.J. (2003): Health effects of polybrominated dibenzo-*p*-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environ Int* (29), 855 - 860.
- Blaha L., Hilscherova K., Mazurova E., Hecker M., Jones P.D., Newsted J.L., Bradley P.W., Gracia T., Duris Z., Horka I., Holoubek I. & Giesy J.P. (2006): Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects. *Environ Int* (32), 749 - 757.
- BMU (2005): Die Wasserrahmenrichtlinie - Neues Fundament für den Gewässerschutz in Europa. BMU - Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit - <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3043.pdf>, 121 pp.
- Böhmer J., Jansen W., Kappus B. & Tham J. (1996): Möglichkeiten der Bioindikation mit limnischen Makroinvertebraten. In: Arndt U. and Formin A. (eds.), *Bioindikatoren und Umweltbelastung - Neue Aspekte und Entwicklungen*. Verlag G.Heimbach, 195 - 206.
- Böhmer J., Rawer-Jost C. & Zenker A. (2004): Multimetric assessment of data provided by water managers from Germany: Assessment of several different types of stressors with macrozoobenthos communities. *Hydrobiologia* (516), 215 - 228.
- Bojorquez-Tapia L.A. & Juarez L. (2002): Integrating fuzzy logic, optimization, and GIS for ecological impact assessments. *Environ Assess* (30), 418 - 433.
- Bols N.C., Boliska S.A., Dixon D.G., Hodson P.V. & Kaiser G.L.E. (1985): The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquat Toxicol* (6), 147 - 155.
- Bols N.C., Dayeh V.R., Lee L. & Schirmer K. (2005): Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. In: Hochachka P.W. and Mommsen T.P. (eds.), *Biochemistry and molecular biology in fishes*. Elsevier, 43 - 84.

-
- Bols N.C., Schirmer K., Joyce E.M., Dixon D.G., Greenberg B.M. & Whyte J.J. (1999): Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicol Environ Saf* (44), 118 - 128.
- Borchert C. (1983): *Geographische Landeskunde von Baden-Württemberg*. Kohlhammer, 379 pp.
- Borenfreund E. & Puerner J.A. (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth* (9), 7 - 9.
- Bosveld A.T., de Bie P.A., van den Brink N.W., Jongepier H. & Klomp A.V. (2002): *In vitro* EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in the Netherlands. *Chemosphere* (49), 75 - 83.
- Böttcher M. (2005): *Untersuchungen zur Gentoxizität anhand von Sedimenten und Fischen der Donau*. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 105 pp.
- Böttcher M., Grund S., Keiter S., Seitz N., Hollert H. & Braunbeck T. (2007): Comparison between genotoxicity *in vitro* and *in situ* by means of the comet assay and the micronucleus test. *Toxicol Sci* in prep.
- Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Moder M., Segner H. & Schuurmann G. (1999a): Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - A contribution to hazard assessment. *Arch Environ Contam Toxicol* (37), 164 - 174.
- Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H. & Schuurmann G. (1999b): Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - A contribution to hazard assessment. *Arch Environ Contam Toxicol* (37), 164 - 174.
- Brack W., Schirmer K., Erdinger L. & Hollert H. (2005): Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-o-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environ Toxicol Chem* (24), 2445 - 2458.
- Brack W., Schirmer K., Kind T., Schrader S. & Schuurmann G. (2002): Effect-directed fractionation and identification of cytochrome P4501A inducing halogenated aromatic hydrocarbons in a contaminated sediment. *Environ Toxicol Chem* (21), 2654 - 2662.
- Brack W., Segner H., Möder M. & Schuurmann 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): *Zooökologische und saprobiologische Beiträge zu einer allgemeinen regionalen Bachtypologie*. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, 462 pp.
- Braukmann U. & Vobis H. (1998): *Gewässergütekarte Baden-Württemberg*. 65 pp.
- Braunbeck T. (1989): *Cytopathologische Veränderungen in der Fischleber durch Umweltchemikalien - Beiträge zur Ökotoxikologie*. Department of Zoology, University of Heidelberg, 329 pp.
- Braunbeck T. (1994a): Detection of environmental relevant pesticide concentrations using cytological parameters: Pesticide specificity in the reaction of rainbow trout liver? In: Müller R. and Lloyd R. (eds.), *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Blackwell, 15 - 29.
- Braunbeck T. (1994b): Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen zum Nachweis letaler und sublethaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. In: Breitenstein A., Scholz W., Waitzmann M. and Zelesny H. (eds.), *Veröff PAÖ. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg*, 533 - 558.

- Braunbeck T. (1998): Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics - Structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck T., Hinton D.E. and Streit B. (eds.), Fish ecotoxicology. Birkhäuser Verlag, 61 - 140.
- Braunbeck T., Berbner T., Bieberstein U., Erdinger L., Geier V., Hollert H., Leist E., Rahman N. & Zipperle J. (1995): Toxikologische und Ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fliegewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen. In: LfU (eds.), Veröff PAÖ. Landesanstalt für Umweltschutz des Landes Baden-Württemberg, 345 - 358.
- Braunbeck T., Gorgas K., Storch V. & Volkl A. (1987): Ultrastructure of hepatocytes in golden ide (*Leuciscus idus melanotus* L.; Cyprinidae: Teleostei) during thermal adaptation. Anat Embryol (Berl) (175), 303 - 313.
- Braunbeck T., Lammer E., Leist E. & Rudolf M. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The zebrafish (*Danio rerio*) embryo toxicity test - an update. ALTEX (22), 87 - 102.
- Braunbeck T., Leist E., Paulsen U. & Rudolf M. (2002): Optimierung und Normierung des Fischeitests mit dem Zebrabräbling (*Danio rerio*) als Ersatzmethode zum Fischtest nach dem Abwasserabgabengesetz der Bundesrepublik Deutschland. Bericht an das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg, 138 pp.
- Braunbeck T. & Storch V. (1990): Zelle und Umwelt - Wie wirken sich Umweltgifte auf Zellen aus? BIUZ (19), 127 - 134.
- Braunbeck T., Storch V. & Bresch H. (1990): Species-specific reaction of liver ultrastructure in Zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. Arch Environ Contam Toxicol (19), 405 - 418.
- Braunbeck T. & Völkel A. (1993): Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution? A case-study on hepatocellular effects of dinitro-o-cresol in golden ide (*Leuciscus idus melanotus*). In: Braunbeck T., Hanke W. and Segner H. (eds.), Fish in ecotoxicology and ecophysiology. VCH, 55 - 80.
- Bro-Rasmussen F. (1996): Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. Sci Total Environ (188), 45 - 60.
- Brown J.N. & Peake B.M. (2006): Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff. Sci Total Environ (359), 145 - 155.
- Brown S.B., Fisk A.T., Brown M., Vilella M., Muir D.C., Evans R.E., Lockhart W.L., Metner D.A. & Cooley H.M. (2002): Dietary accumulation and biochemical responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126). Aquat Toxicol (59), 139 - 152.
- Brüggemann R. & Halfon E. (1997): Comparative analysis of nearshore contaminated sites in Lake Ontario: Ranking for environmental hazard. J Environ Sci Health Part A (32), 277 - 292.
- Brüschweiler B.J., Wuergler F.E. & Fent K. (1996): Inhibition of Cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1. Environ Toxicol Chem (15), 728 - 735.
- Buckley L.J., Turner S.I., Halavik T.A., Smigielsky A.S., Drew S.M. & Laurence G.C. (1984): Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). Mar Ecol Progr Ser (15), 91 - 97.

-
- Bühl A. & Zöfel P. (1995): SPSS für Windows Version 6.1 - Praxisorientierte Einführung in die moderne Datenanalyse. Addison-Wesley Publishing Company, 623 pp.
- Burkhardt-Holm P., Braunbeck T. & Storch V. (1990): Auswirkung der beim Sandoz-Unfall 1986 in den Rhein gelangten Chemikalien auf die Ultrastruktur des Darmes von Aalen. In: Kinzelbach R. and Friedrich G. (eds.), *Biologie des Rheins*. 393 - 404.
- Burkhardt-Holm P., Giger W., Guttinger H., Ochsenbein U., Peter A., Scheurer K., Segner H., Staub E. & Suter M.J. (2005): Where have all the fish gone? The reasons why fish catches in Swiss rivers are declining. *Environ Sci Technol* (39), 441 - 447.
- Burkhardt-Holm P. & Segner H. (2002): Decline of fishcatch in Switzerland. *Aquat Sci* (64), 36 - 54.
- Burton G.A. (1991): Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* (10), 1585 - 1627.
- Burton G.A. (1995): Sediment toxicity testing issues and methods. In: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A. and Cairns J. (eds.), *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis-Publishers, 70 - 103.
- Burton G.A., Jr. & Nordstrom J.E. (2004): An *in situ* toxicity identification evaluation method Part I: Laboratory validation. *Environ Toxicol Chem* (23), 2844 - 2850.
- Bustamante J., Bredeston L., Malanga G. & Mordoh J. (1993): Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res* (6), 348 - 353.
- Byczkowska-Smyk W. (1968): The ultrastructure of the hepatic cells of the burbot (*Lota lota* L.). *Zool Pol* (18), 287 - 295.
- Calace N., Cardellicchio N., Petronio B.M., Pietrantonio M. & Pietroletti M. (2006): Sedimentary humic substances in the northern Adriatic sea (Mediterranean sea). *Mar Environ Res* (61), 40 - 58.
- Calmano W., Hong H. & Förstner U. (1992): Einfluß von pH-Wert und Redoxpotential auf die Bindung und Mobilisierung von Schwermetallen in kontaminierten Sedimenten. *Vom Wasser* (78), 245 - 257.
- Canfield T.J., Kemble N.E., Brumbaugh W.G., Dwyer F.J., Ingersoll C. & 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), 1999 - 2012.
- Carney S.A., Chen J., Burns C.G., Xiong K.M., Peterson R.E. & Heideman W. (2006): Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish. *Mol Pharmacol* (70), 549 - 561.
- Carney S.A., Peterson R.E. & Heideman W. (2004): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol Pharmacol* (66), 512 - 521.
- Castano A., Vega M.M. & Tarazona J.V. (1995): Acute toxicity of selected metals and phenols on RTG-2 and CHSE-214 fish cell lines. *Bull Environ Contam Toxicol* (55), 222 - 229.
- Chapman G.B. (1981): Ultrastructure of the liver of the fingerling rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J Fish Biol* (18), 553 - 567.
- Chapman P.M. (2000): The sediment quality triad: Then, now and tomorrow. *Int J Environ Pollut* (13), 351 - 356.

- Chapman P.M. (2002): Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *Sci Total Environ* (288), 131 - 140.
- Chapman P.M., Ho K.T., Munns W.R., Jr., Solomon K. & Weinstein M.P. (2002): Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar Pollut Bull* (44), 271 - 278.
- Chapman P.M. & Hollert H. (2006): Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *J Soils Sediments* (6), 4 - 8.
- Chapman P.M., Power E.A. & Burton G.A. (1992): Integrative assessments in aquatic ecosystems. In: Burton G.A. (eds.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis-Publisher, 313 - 340.
- Charnley G. & Kimbrough R.D. (2006): Overview of exposure, toxicity, and risks to children from current levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds in the USA. *Food Chem Toxicol* (44), 601 - 615.
- Chen G. & White P.A. (2004): The mutagenic hazards of aquatic sediments: A review. *Mutat Res* (567), 151 - 225.
- Christensen G.M. (1975): Biochemical effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrate on embryos and alevins of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Toxicol Appl Pharmacol* (32), 191 - 197.
- Clemons J.H., Dixon D.G. & Bols N.C. (1997): Derivation of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs) for selected dioxins, furans and PCBs with rainbow trout and rat liver cell lines and the influence of exposure time. *Chemosphere* (34), 1105 - 1119.
- Clemons J.H., Myers C.R., Lee L.E.J., Dixon D.G. & Bols N.C. (1998): Induction of cytochrome P4501A by binary mixtures of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in liver cell lines from rat and trout. *Aquat Toxicol* (43), 179 - 194.
- Cook P.M., Robbins J.A., Endicott D.D., Lodge K.B., Guiney P.D., Walker M.K., Zabel E.W. & Peterson R.E. (2003): Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century. *Environ Sci Technol* (37), 3864 - 3877.
- Cornelissen G., Gustafsson O., Bucheli T.D., Jonker M.T., Koelmans A.A. & van Noort P.C. (2005): Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ Sci Technol* (39), 6881 - 6895.
- Cote C., Blaise C., Delisle C.E., Meighen E.A. & Hansen P.D. (2004): A miniaturized Ames mutagenicity assay employing bioluminescent strains of *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* (345), 137 - 146.
- D'Adamo R., Pelosi S., Trotta P. & Sansone G. (1997): Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Mar Chem* (56), 45 - 49.
- Davoren M., Ni Shuilleabhain S., Hartl M.G., Sheehan D., O'Brien N.M., O'Halloran J., Van Pelt F.N. & Mothersill C. (2005): Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicol In Vitro* (19), 421 - 431.
- de Lafontaine Y., Gilbert N.L., Dumouchel F., Brochu C., Moore S., Pelletier E., Dumont P. & Branchaud A. (2002): Is chemical contamination responsible for the decline of the copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered fish species, in Canada? *Sci Total Environ* (298), 25 - 44.
- DelValls T.A., Forja J.M., GonzalezMazo E., GomezParra A. & Blasco J. (1998): Determining contamination sources in marine sediments using multivariate analysis. *Trends Analy Chem* (17), 181 - 192.

-
- Diekmann M., Hultsch V. & Nagel R. (2004a): On the relevance of genotoxicity for fish populations I: Effects of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life-cycle test. *Aquat Toxicol* (68), 13 - 26.
- Diekmann M., Waldmann P., Schnurstein A., Grummt T., Braunbeck T. & Nagel R. (2004b): On the relevance of genotoxicity for fish populations II: Genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat Toxicol* (68), 27 - 37.
- DIN (1983): DIN 11466: Aufschluss mit Königswasser zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Metallen.
- DIN (1996): DIN EN 1485: Bestimmung adsorbierbarer organisch gebundener Halogene (AOX). pp.
- DIN (2000): DIN 38415 T6: DIN-AK "Fischartest DIN 38415 T6": Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern (T6).
- DIN (2004): DIN 38412 L48: *Athrobacter globiformis*-Kontakttest für kontaminierte Feststoffe.
- Doostdar H., Burke M.D. & Mayer R.T. (2000): Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* (144), 31 - 38.
- Doucette W.J. (2003): Quantitative structure-activity relationships for predicting soil-sediment sorption coefficients for organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* (22), 1771 - 1788.
- Duft M., Tillmann M. & Oehlmann J. (2003): Ökotoxikologische Sedimentkartierung der großen Flüsse Deutschlands. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 221 pp.
- 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), 175 - 177.
- Engström H. (2001): Long term effects of cormorant predation on fish communities and fishery in a freshwater lake. *Ecography* (24), 127 - 138.
- 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 Toxicol Chem* (15), 213 - 222.
- Ensenbach U. (1998): Embryonic development of fish - A model to assess the toxicity of sediments to vertebrates. *Fresenius Environ Bull* (7), 531 - 538.
- Erdinger L., Dorr I., Durr M. & Hopker K.A. (2004): Analysis of mutagenic activity of airborne particulate matter, standard reference materials and reference compounds using base pair-specific *Salmonella typhimurium* tester strains. *Mutat Res* (564), 149 - 157.
- Erdinger L., Dürr M. & Hopker K.A. (2005): Correlations between mutagenic activity of organic extracts of airborne particulate matter, NOx and sulphur dioxide in southern Germany: Results of a two-year study. *Environ Sci Pollut Res* (12), 10 - 20.
- EU-WRRL (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. Europäische Union, 327 pp.
- Faller P., Kobler B., Peter A., Sumpter J.P. & Burkhardt-Holm P. (2003): Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environ Toxicol Chem* (22), 2063 - 2072.

- Farmer P.B., Singh R., Kaur B., Sram R.J., Binkova B., Kalina I., Popov T.A., Garte S., Taioli E., Gabelova A. & Cebulska-Wasilewska A. (2003): Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat Res* (544), 397 - 402.
- Feiler U., Ahlf W., Hoess S., Hollert H., Neumann-Hensel H., Meller M., Weber J. & Heining P. (2005): The SeKT joint research project: definition of reference conditions, control sediments and toxicity thresholds for limnic sediment contact tests. *Environ Sci Pollut Res* (12), 257 - 258.
- Fent K. (2001): Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: Assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol In Vitro* (15), 477 - 488.
- Fent K. (2004): Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* (205), 223 - 240.
- Fent K. & Bättscher R. (2000): Cytochrome P450A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: Demonstration of additive interactions and an induction equivalency concept. *Environ Toxicol Chem* (19), 2047 - 2058.
- Fischnetz (2004): Schlussbericht des Projekts - Netzwerk Fischrückgang Schweiz - «Fischnetz - Dem Fischrückgang auf der Spur». EAWAG - <http://www.fischnetz.ch>, 184 pp.
- Fluckiger-Isler S., Baumeister M., Braun K., Gervais V., Hasler-Nguyen N., Reimann R., Van Gompel J., Wunderlich H.G. & Engelhardt G. (2004): Assessment of the performance of the Ames II assay: A collaborative study with 19 coded compounds. *Mutat Res* (558), 181 - 197.
- Förstner U. (2002): Sediments and the European Water Framework Directive. *J Soils Sediments* (2), 54.
- Frenzilli G., Scarcelli V., Del Barga I., Nigro M., Forlin L., Bolognesi C. & Sturve J. (2004): DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour. *Mutat Res* (552), 187 - 195.
- Garcia-Reyero N., Grau E., Castillo M., Lopez de Alda M.J., Barcelo D. & Pina B. (2001): Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* (20), 1152 - 1158.
- Garrison P.M., Tullis K., Aarts J.M., Brouwer A., Giesy J.P. & Denison M.S. (1996): Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. *Fundam Appl Toxicol* (30), 194 - 203.
- Gasiewicz T.A., Kende A.S., Rucci G., Whitney B. & Willey J.J. (1996): Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: Ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem Pharmacol* (52), 1787 - 1803.
- Gebhardt K. (1995): Die Entwicklung aquatischer Lebensräume nach Umgestaltung der Donau im Bereich des Blochinger Sandwinkels. 157 pp.
- Gercken J., Forlin L. & Andersson J. (2006): Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters. *Mar Pollut Bull* (53), 497 - 507.
- Götz R. (1997): Dioxine und Furane. In: Maaß V., Schmidt C., Lüscho R. and Leitz T. (eds.), *Sedimentuntersuchungen im Hamburger Hafen 1994/95*. Stadt Hamburg, Wirtschaftsbehörde, Strom- und Hafenbau, 61 - 64.
- Gratzer H. & Ahlf W. (1999): Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. 171 pp.
- Gravato C. & Santos M.A. (2002a): Juvenile sea bass liver biotransformation and erythrocytic genotoxic responses to pulp mill contaminants. *Ecotoxicol Environ Saf* (53), 104 - 112.

-
- Gravato C. & Santos M.A. (2002b): Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* (51), 115 - 127.
- Graw M. & Borchardt D. (1999): Ein Bach ist mehr als Wasser. Hessisches Ministerium für Umwelt, ländlichen Raum und Verbraucherschutz - <http://interweb1.hmulv.hessen.de>, pp.
- Gray J.P., Leas T.L., Obert E., Brown D., Clark G.C. & Vanden Heuvel J.P. (2003): Evidence of aryl hydrocarbon receptor ligands in Presque Isle Bay of Lake Erie. *Aquat Toxicol* (64), 343 - 358.
- Grinwis G.C., van den Brandhof E.J., Engelsma M.Y., Kuiper R.V., Vaal M.A., Vethaak A.D., Wester P.W. & Vos J.G. (2001): Toxicity of PCB 126 in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P4501A induction in several organ systems. *Arch Toxicol* (75), 80 - 87.
- Grisolia C.K. & Starling F.L. (2001): Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranao, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat Res* (491), 39 - 44.
- Groß A. (1990): Auswertung der Makrozoobenthosaufnahme in der Donau und ihren Zuflüssen zwischen Laiz und Zwiefaltendorf. Institut für Biologie - Universität Tübingen, 66 pp.
- Groß A. (1991): Sanierung der Donau zwischen Zwiefaltendorf und Ulm. Institut für Biologie - Universität Tübingen, 153 pp.
- Grund S. (2005): Integrative Sedimentbewertung der Donau mit Hilfe von EROD-Assay, Histopathologie und Makrozoobenthos-Arterhebung. *Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg*, 180 pp.
- Grund S., Böttcher M., Keiter S., Wurm K., Reifferscheid G., Manz W., van Bavel B., Erdinger L., Braunbeck T. & Hollert H. (2007): Assessment of environmental contaminants in the Danube River by ultrastructural alterations in the liver of barbel (*Barbus barbus*) and its correlation to EROD-induction caused by river sediments. *Environ Toxicol Chem* in prep.
- Gunkel G. (1994): Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag, 540 pp.
- Gustafsson Ö. & Gschwend P. (1998): The flux of black carbon to surface sediments on the New England continental shelf. *Geochim Cosmochim Acta* (62), 465 - 472.
- Gustavsson L.K., Klee N., Olsman H., Hollert H. & Engwall M. (2004): Fate of Ah receptor agonists during biological treatment of an industrial sludge containing explosives and pharmaceutical residues. *Environ Sci Pollut Res* (11), 379 - 387.
- Handy R.D., Galloway T.S. & Depledge M.H. (2003): A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* (12), 331 - 343.
- Hansen J.A., Lipton J., Welsh P.G., Cacula D. & MacConnell B. (2004): Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem* (23), 1902 - 1911.
- Hasspieler B.M., Haffner G.D. & Adeli K. (1996): Influence of DT diaphorase on quinone-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. *Mutat Res* (360), 43 - 49.
- Hawkes J.W. (1980): The effects of xenobiotics on fish tissues: Morphological studies. *Fed Proc* (39), 3230 - 3236.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P. & MacGregor J.T. (1991): Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* (18), 277 - 291.
- Heise S. & Ahlf W. (2005): A new microbial contact assay for marine sediments. *J Soils Sediments* (1), 9 - 15.

-
- Heise S. & Apitz S. (2007): The role of risk management and communication in sustainable sediment management. In: Heise S. (eds.), Sediment risk management and communication - Sediment and dredged material treatment. Elsevier, 1 - 8.
- Heise S. & Förstner U. (2006): Risks from historical contaminated sediments in the Rhine Basin. *Water Air Soil Pollut: Focus* (6), 625 - 636.
- Heise S., Maaß V., Gratzner H. & Ahlf W. (2000): Möglichkeiten und Leistungen einer ökotoxikologischen Sedimentklassifikation am Beispiel der Elbe. Bundesanstalt für Gewässer-kunde, 96 - 104 pp.
- Hertel R., Lehmann M. & Kroner C. (2001): Gütebericht 2001 - Entwicklung der Fließgewässerbeschaffenheit in Baden-Württemberg. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 56 pp.
- Hill I.R., Matthiessen P. & Heimbach F. (1993): Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. Workshop on sediment toxicity assessment Netherlands, 105 pp.
- Hinger T. (2003): Biotransformationenzyme als *In vitro*-Biomarker für die Belastung von Rheinsedimenten - Vergleich zwischen der Zelllinie RTL-W1 und embryonaler Hühnerleberkultur. *Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg*, 49 pp.
- Hinton D.E., Lantz R.C., Hampton J.A., McCuskey P.R. & McCuskey R.S. (1987): Normal versus abnormal structure: Considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants. *Environ Health Perspect* (71), 139 - 146.
- Hinton D.E. & Pool C.R. (1976): Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Biol* (8), 208 - 219.
- Hjorth T. (2004): Effects of freeze-drying on partitioning patterns of major elements and trace metals in lake sediments. *Anal Chim Acta* (526), 95 - 102.
- Hoffmann R., Berg R., Blank S., Dehus P., Grimm R. & Rösch R. (1995): Fische in Baden-Württemberg - Gefährdung und Schutz. Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Baden-Württemberg, 92 pp.
- Hollert H. (2001): Entwicklung eines kombinierten Untersuchungssystem für die Bewertung der Ökotoxikologischen Belastung von Fließgewässersedimenten und -schwebstoffen. *Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg*, 252 pp.
- Hollert H. & Braunbeck T. (1997): Ökotoxikologie *in vitro* - Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoffen. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 189 pp.
- Hollert H. & Braunbeck T. (2001): Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. BW-Plus, online unter <http://bwplus.fzk.de/>, 260 pp.
- 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.
- Hollert H., Dürr M., Geier V., Erdinger L. & Braunbeck T. (1999): Ökotoxikologie *in vitro*: Gefährdungspotential von Neckarsedimenten. In: Oehlmann J. and Markert B. (eds.), Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, 444 - 462.
- Hollert H., Dürr M., Olsman H., Halldin K., van Bavel B., Brack W., Tysklind M., Engwall M. & Braunbeck T. (2002a): 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* (11), 323 - 336.
- Hollert H., Heise S., Keiter S., Heinrich H. & Förstner U. (2007): Wasserrahmenrichtlinie - Fortschritte und Defizite. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* (19), 58 - 70.
- Hollert H., Heise S., Pudenz S., Brüggemann R., Ahlf W. & Braunbeck T. (2002b): Application of a sediment quality triad and different statistical approaches (Hasse diagrams and fuzzy logic) for the comparative evaluation of small streams. *Ecotoxicology* (11), 311 - 321.
- Hollert H., Keiter S., König N., Rudolf M., Ulrich M. & Braunbeck T. (2003): A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*). *J Soils Sediments* (3), 197 - 207.
- Hölzinger J. (1977): Der Einfluss von Sulfitzellstoff-Abwässern und Schwermetallen auf das Ökosystem des Öpfinger Stausees. *Journal für Ornithologie* (118), 329 - 415.
- Humphries P. & Lake P.S. (2000): Fish larvae and the management of regulated rivers. *Regul Rivers: Res Manag* (16), 421 - 432.
- Huuskonen S.E., Hahn M.E. & Lindstrom-Seppä P. (1998): A fish hepatoma cell line (PLHC-1) as a tool to study cytotoxicity and CYP1A induction properties of cellulose and wood chip extracts. *Chemosphere* (36), 2921 - 2932.
- Huwe J.K. (2002): Dioxins in food: A modern agricultural perspective. *J Agric Food Chem* (50), 1739 - 1750.
- Incardona J.P., Collier T.K. & Scholz N.L. (2004): Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* (196), 191 - 205.
- Irmer U. (2000): Die neue EG-Wasserrahmenrichtlinie: Bewertung der chemischen und ökologischen Qualität von Oberflächengewässern. *Acta Hydrochim Hydrobiol* (28), 7 - 14.
- Isosaari P., Hallikainen A., Kiviranta H., Vuorinen P.J., Parmanne R., Koistinen J. & Vartiainen T. (2006): Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers in the edible fish caught from the Baltic Sea and lakes in Finland. *Environ Pollut* (141), 213 - 225.
- 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. *Ecotoxicol Environ Saf Mar* (33), 193 - 200.
- Johnston R.K., Munns W.R., Tyler P.L., Marajh-Whittemore P., Finkelstein K., Munney K., Short F.T., Melville A. & Hahn S.P. (2002): Weighing the evidence of ecological risk from chemical contamination in the estuarine environment adjacent to the Portsmouth Naval Shipyard, Kittery, Maine, USA. *Environ Toxicol Chem* (21), 182 - 194.
- Kammann U., Riggers J.C., Theobald N. & Steinhart H. (2000): Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutat Res* (467), 161 - 168.
- Karnovsky M.J. (1964): The localization of cholinesterase activity in rat cardiac muscle by electron microscopy. *J Cell Biol* (23), 217 - 232.
- Katchamart S., Miranda C.L., Henderson M.C., Pereira C.B. & Buhler D.R. (2002): Effect of xenoestrogen exposure on the expression of cytochrome P450 isoforms in rainbow trout liver. *Environ Toxicol Chem* (21), 2445 - 2451.

- Keiter S. (2003): Toxikologische Untersuchungen zum Fischrückgang in der Donau. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 94 pp.
- Keiter S., Grund S., van Bavel B., Engwall M., Hagberg J., Kammann U., Klempt M., Manz W., Olsman H., Braunbeck T. & Hollert H. (2007a): Activities and identification of Ah receptor agonists in sediments from the Danube River. Anal Bioanal Chem accepted.
- Keiter S., Braunbeck T., Heise S., Manz W., Pudenz S. & Hollert H. (2007b): A fuzzy-logic based model for the classification of sediments using *in vitro* biotest systems. in prep.
- Keiter S., Rastall A.C., Kosmehl T., Wurm K., Erdinger L., Braunbeck T. & Hollert H. (2006): Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube River - a pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. Environ Sci Pollut Res (13), 308 - 319.
- Kiel E. & Frutiger A. (2002): Handbuch angewandte Limnologie - Fließgewässer. In: Steinberg C., Calmano W., Klapper H. and Wilken R.D. (eds.), Handbuch angewandte Limnologie. 38 - 88.
- Kim I.Y. & Hyun C.K. (2006): Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. Ecotoxicol Environ Saf (64), 288 - 297.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwaert A. & Wakata A. (2003): Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. Mutat Res (540), 153 - 163.
- Klee N., Gustavsson L., Kosmehl T., Engwall M., Erdinger L., Braunbeck T. & Hollert H. (2004): Changes in toxicity and genotoxicity in an industrial sewage sludge containing nitro- and amino-aromatic compounds during treatment in bioreactors under different oxygen regimes. Environ Sci Pollut Res (11), 313 - 320.
- Klee O. (1993): Wasser untersuchen - Einfache Analysemethoden und Beurteilungskriterien. Quelle & Meyer Verlag, pp.
- Klopman G. & Chakravarti S. (2003): Structure-activity relationship study of a diverse set of estrogen receptor ligands using MultiCASE expert system. Chemosphere (51), 445 - 459.
- Köck G. (1996): Die toxische Wirkung von Schwermetallen auf Fische. In: Steinberg C., Calmano W., Klapper H. and Wilken R.D. (eds.), Handbuch Angewandte Limnologie. Ecomed, 3 - 37.
- König N. (2002): Der Zebraabräbling in Fischeitest und Comet-Assay - Embryotoxische Untersuchungen von Rheinsedimenten. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 67 pp.
- Konold (1991): Donausanierung zwischen Laiz und Zwiefaltendorf. Regierungspräsidium Tübingen, 86 pp.
- Kosmehl T., Hallare A.V., Reifferscheid G., Manz W., Braunbeck T. & Hollert H. (2007): A new contact assay to assess genotoxic burden of sediments using the comet assay with zebrafish larvae. Environ Toxicol Chem in press.
- Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Erdinger L., Braunbeck T. & Hollert H. (2004): Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the permanent cell lines RTG-2 and RTL-W1 in the comet assay and ames assay. J Soils Sediments (4), 84 - 94.
- Lachmund C., Köcher B., Manz W. & Heininger P. (2003): Chemical and microbiological *in situ* characterization of benthic communities in sediments with different contamination levels. J Soils Sediments (3), 188 - 196.

- 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), 2087 - 2102.
- Lasne C., lu Y.P., Orfila L., Ventura L. & Chouroulinkov I. (1990): Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* (11), 541 - 547.
- LAWA (1998): Beurteilung der Wasserbeschaffenheit von Fließgewässern in der Bundesrepublik Deutschland - Chemische Gewässergüteklassifikation. LAWA-Arbeitskreis "Zielvorgaben" in Zusammenarbeit mit LAWA-Arbeitskreis "Quantitative Hydrologie der Fließgewässer", 69 pp.
- Lee L.E.J., Clemons J.H., Bechtel D.G., Caldwell S.J., Han K., Pasitschniak-Arts M., Mosser D.D. & Bols N.C. (1993): Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol Toxicol* (9), 279 - 294.
- Legler J., Dennekamp M., Vethaak A.D., Brouwer A., Koeman J.H., van der Burg B. & Murk A.J. (2002): Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using *in vitro* reporter gene assays. *Sci Total Environ* (293), 69 - 83.
- Lettieri T. (2006): Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect* (114), 4 - 9.
- LfU (2004): Beschaffenheit der Fließgewässer. Jahresdatenkatalog 1972 - 2004 und aktueller Gütebericht 2004. Landesanstalt für Umweltschutz - Baden-Württemberg.
- Lima A.L.C., Eglinton T.I. & Reddy C.M. (2003): High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century. *Environ Sci Technol* (37), 53 - 61.
- Liß W. & Ahlf W. (1997): Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* (36), 140 - 147.
- Liu D. (1989): A rapid and simple biochemical test for direct determination of chemical toxicity. *Toxic Assessment* (4), 399 - 404.
- Luo X.J., Chen S.J., Mai B.X., Yang Q.S., Sheng G.Y. & Fu J.M. (2006): Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. *Environ Pollut* (139), 9 - 20.
- Lyons B.P., Stentiford G.D., Green M., Bignell J., Bateman K., Feist S.W., Goodsir F., Reynolds W.J. & Thain J.E. (2004): DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutat Res* (552), 177 - 186.
- Machala M., Vondracek J., Blaha L., Ciganek M. & Neca J.V. (2001): Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using *in vitro* reporter gene assay. *Mutat Res* (497), 49 - 62.
- Maron D.M. & Ames B.N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* (113), 173 - 215.
- Martel P.H., Kovacs T.G., O'Connor B.I. & Voss R.H. (1997): Source and identity of compounds in a thermomechanical pulp mill effluent inducing hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Environ Toxicol Chem* (16), 2375 - 2383.
- Marvin C.H., McCarry B.E., Villella J., Allan L.M. & Bryant D.W. (2000): 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), 979 - 988.

-
- Masuda Y. & Yoshimura H. (1984): Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with yusho and their toxicological significance: A review. *Prog Clin Biol Res* (137), 31 - 44.
- Mauch E. (1964): Biologische Untersuchung der Donau zwischen Donaueschingen und Ulm. Landestelle für Gewässerkunde und wasserwirtschaftliche Planung Baden-Württemberg, pp.
- 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.
- McKim J.M. (1977): Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J Fish Res Bd Can* (34), 1148 - 1154.
- MELUF (1982): Bericht des MELUF - Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt Baden-Württemberg vom 2.2.1982. Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt Baden-Württemberg, 87 pp.
- 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), 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), 125 - 141.
- Meyers T.R. & Hendricks J.D. (1985): Histopathology. In: Rand G.M. and Petrocelli S.R. (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publ Corp, 283 - 323.
- Middelburg J.J., Nieuwenhuize J. & van Breugel P. (1999): Black carbon in marine sediments. *Marine Chem* (65), 245 - 252.
- Mikaelian I., de Lafontaine Y., Harshbarger J.C., Lee L.L. & Martineau D. (2002): Health of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) with elevated tissue levels of environmental contaminants. *Environ Toxicol Chem* (21), 532 - 541.
- Minissi S., Ciccotti E. & Rizzoni M. (1996): Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res* (367), 245 - 251.
- Mitchelmore C.L. & Chipman J.K. (1998): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* (399), 135 - 147.
- Moermond C.T., Roozen F.C., Zwolsman J.J. & Koelmans A.A. (2004): Uptake of sediment-bound bioavailable polychlorobiphenyls by benthivorous carp (*Cyprinus carpio*). *Environ Sci Technol* (38), 4503 - 4509.
- Moretti M., Marcarelli M., Villarini M., Fatigoni C., Scassellati-Sforzolini G. & Pasquini R. (2002): *In vitro* testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: Cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol In Vitro* (16), 81 - 88.
- Morrison H.A., Whittle D.M. & Haffner G.D. (2002): A comparison of the transport and fate of polychlorinated biphenyl congeners in three Great Lakes food webs. *Environ Toxicol Chem* (21), 683 - 692.
- Munns W.R., Jr., Black D.E., Gleason T.R., Salomon K., Bengtson D. & Gutjahr-Goebel R. (1997): Evaluation of the effects of dioxin on *Fundulus heteroclitus* populations using a modeling approach. *Environ Toxicol Chem* (16), 1074 - 1081.

- Murk A.J., Legler J., Denison M.S., Giesy J.P., van de Guchte 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. *Fundam Appl Toxicol* (33), 149 - 160.
- Murk A.J., Legler J., van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkelink A., van der Burg B., Rijs G.B.J. & Vethaak D. (2002): Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environ Toxicol Chem* (21), 16 - 23.
- Nacci D.E., Cayula S. & Jackim E. (1996): Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat Toxicol* (35), 197 - 210.
- Nacci D.E., Kohan M., Pelletier M. & George E. (2002): Effects of benzo[*a*]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquat Toxicol* (57), 203 - 215.
- Nagel R. (2002): DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - A general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* (19), 38 - 48.
- Nagel R. & Isberner K. (1998): Testing of chemicals with fish - A critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. In: Braunbeck T., Hinton D.E. and Streit B. (eds.), *Fish ecotoxicology - Experientia Supplement*, Vol. 86. Birkhäuser, 337 - 352.
- Nakata H., Sakai Y., Miyawaki T. & Takemura A. (2003): Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake Sea, Japan. *Environ Sci Technol* (37), 3513 - 3521.
- Nehls S. & Segner H. (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environ Toxicol* (16), 321 - 329.
- Nendza M. (2002): Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere* (48), 865 - 883.
- Netzband A. (2007): Report on the SedNet round table discussion - Sediment management: An essential element of River Basin management plans. *J Soils Sediments* (7), 117 - 132.
- Neumann-Hensel H. & Melbye K. (2006): Optimisation of the solid-contact test with *Arthrobacter globiformis*. *J Soils Sediments* (6), 201 - 207.
- Nolan D.T., Spanings F.A., Ruane N.M., Hadderingh R.H., Jenner H.A. & Wendelaar Bonga S.E. (2003): Exposure to water from the lower Rhine induces a stress response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Arch Environ Contam Toxicol* (45), 247 - 257.
- Oberemm A. (2000): The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Res Note* (29), 32 - 40.
- Ohe T. (1997): Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutat Res* (393), 73 - 79.
- Oinonen T., Saarikoski S., Husgafvel-Pursiainen A. & Lindros K. (1994): Pretranslational induction of cytochrome P4501A enzymes by beta-naphthoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones. *Biochem Pharmacol* (48), 2189 - 2197.
- Okey A.B., Riddick D.S. & Harper P.A. (1994): The Ah receptor: Mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* (70), 1 - 22.
- Olsman H., Hollert H., Kammann U., Klempt M., Otte J., van Bavel B. & Engwall M. (2007): Differences in Ah receptor mediated responses for eighteen polybrominated and mixed halogenated dibenzo-*p*-dioxins and -furans in cell lines from four different species. *Environ Toxicol Chem* in press.

- Olson J.R., McGarrigle B.P., Gigliotti P.J., Kumar S. & McReynolds J.H. (1994): Hepatic uptake and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. *Fundam Appl Toxicol* (22), 631 - 640.
- Padilla P.A. & Roth M.B. (2001): Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (98), 7331 - 7335.
- Pellacani C., Buschini A., Furlini M., Poli P. & Rossi C. (2006): A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat Toxicol* (77), 1 - 10.
- Phillips M.J., Poucell S., Patterson J. & Valencia P. (1987): The liver: An atlas and text of ultrastructural pathology. Raven Press, 585 pp.
- Pinkney A.E., Harshbarger J.C., May E.B. & Melancon M.J. (2001): Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, watershed. *Environ Toxicol Chem* (20), 1196 - 1205.
- Pinkney A.E., Harshbarger J.C., May E.B. & Reichert W.L. (2004): Tumor prevalence and biomarkers of exposure and response in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) from the Anacostia River, Washington, DC and Tuckahoe River, Maryland, USA. *Environ Toxicol Chem* (23), 638 - 647.
- Power E.A. & Chapman P.M. (1992): Assessing sediment quality. In: Burton G.A. (eds.), *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis-Publishers, 1 - 18.
- Preston S., Coad N., Townend J., Killham K. & Paton G. (2000): Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic or antagonistic? *Environ Toxicol Chem* (19), 775 - 780.
- 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.
- Quaglia A. (1976a): Observations on the fine structure of the hepatocytic cells in the sprat (*Sprattus sprattus* L.). *Boll Pesca Piscic Idrobiol* (31), 221 - 226.
- Quaglia A. (1976b): Seasonal variations in the ultrastructure of the liver of the pilchard *Sardinia pilchardus*. *Walb Arch Oceanogr Limn* (18), 525 - 530.
- Ramsch R. (1989): Donausanierung zwischen Laiz und Zwiefaltendorf - Eine hydrobiologische Bestandsaufnahme. Regierungspräsidium Tübingen, 45 pp.
- Regan H.M., Colyvan M. & Burgman M.A. (2002): A taxonomy and treatment of uncertainty for ecology and conservation biology. *Ecol Appl* (12), 618 - 628.
- Reifferscheid G., Dill F., Fieblinger D., Gminski R., Grummt H.J., Hafner C., Hollert H., Kunz S., Rodrigo G., Ziemann C. & Selke D. (2007): Untersuchung von Abwasserproben auf Genotoxizität: Ergebnisse eines Ringversuchs mit dem *In vitro*-Mikrokerntest im Rahmen der Standardisierung nach ISO. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* (19), 7 - 16.
- Reynolds E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 208 - 212.
- Ribeiro C.A., Vollaire Y., Sanchez-Chardi A. & Roche H. (2005): Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat. Toxicol.* (74), 53 - 69.
- Richardson H.H. (1960): Färbung für Araldit-, Vestopal- oder Methacrylschnitte. *Stain Technol* (35), 313 - 323.
- Rieß M.H., Wefers H. & Weigel H.P. (1997): Ökotoxikologische Bewertung von Sedimentschadstoffen. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* (9), 201 - 209.

- Rodriguez-Cea A., Ayllon F. & Garcia-Vazquez E. (2003): Micronucleus test in freshwater fish species: An evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Saf* (56), 442 - 448.
- Rönnpapel 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), 1291 - 1304.
- Rönnpapel K., Liß W. & Ahlf W. (1995): Microbial bioassays to assess the toxicity of solid associated contaminants. *Ecotox Environ Saf* (31), 99 - 103.
- Rowlands J.C. & Gustafsson J.A. (1997): Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* (27), 109 - 134.
- Roy L.A., Steinert S., Bay S.M., Greenstein D., Sapozhnikova Y., Bawardi O., Leifer I. & Schlenk D. (2003): Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquat Toxicol* (65), 159 - 169.
- Ruddock P.J., Bird D.J. & McCalley D.V. (2002): Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotoxicol Environ Saf* (51), 97 - 105.
- Rudolf M. (2000): Die Bedeutung unterschiedlicher Expositionswege für die Wirkung von Umweltgiften auf die Embryonalentwicklung von *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg*, 175 pp.
- Rutschke E. & Brozio F. (1974): Bemerkungen zur Substruktur der Leber des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). *Z mikroskop anat Forsch* (88), 745 - 758.
- Sachs L. (2004): *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, 889 pp.
- Sáez I., Zuvicacuta t., Amthauer R., Rodríguez E. & Krauskopf M. (1984): Fish liver protein synthesis during cold acclimatization: Seasonal changes of the ultrastructure of the carp hepatocyte. *J Exp Zool* (230), 175 - 186.
- Safe S. (1990): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* (21), 51 - 88.
- Safe S.H. (1994): Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* (24), 87 - 149.
- Salski A. & Kandzia P. (1996): Fuzzy sets and fuzzy logic in ecological modelling. *Eco Sys* (4), 85 - 97.
- Sanderson J.T., Aarts J.M.M.J.G., Brouwer A., Froese K.L., Denison M.S. & Giesy J.P. (1996): Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-o-deethylase induction in H4IIE cells: Implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* (137), 316 - 325.
- Schirmer K., Chan A.G. & Bols N.C. (2000): Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo[*a*]pyrene in two cell lines from rainbow trout liver. *J Biochem Mol Toxicol* (14), 262 - 276.
- Schirmer K., Dixon D.G., Greenberg B.M. & Bols N.C. (1998): Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* (127), 129 - 141.
- Schmidt H., Bernet D., Wahli T., Meier W. & Burkhardt-Holm P. (1999): Active biomonitoring with brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in diluted sewage plant effluents. *J Fish Biol* (54), 585 - 596.

-
- Schmitz W. (1991): Gutachtliche Stellungnahme zum Antrag auf Ableitung von Abwässern der Zellstoff- und Papierfabrik der Schwäbischen Zellstoff AG bei Ehingen in die Donau. Regierungspräsidium Tübingen.
- Schnurstein A. (2000): Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 196 pp.
- Schnurstein A. & Braunbeck T. (2001): Tail moment versus tail length-application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol Environ Saf (49), 187 - 96.
- Schönborn W. (1992): Fließgewässerbiologie. Gustav Fischer Verlag, 504 pp.
- Schoor W.P. & Couch J.A. (1979): Correlation of mixed-function activity with ultrastructural changes in the liver of a marine fish. Cancer Biochem Biophys (4), 95 - 103.
- Schrenk-Bergt C. & Steinberg C. (1998): Endokrine Substanzen in der aquatischen Umwelt. In: Steinberg C., Bernhardt H. and Klappner H. (eds.), Handbuch Angewandte Limnologie - Teil Aquatische Ökotoxikologie. Ecomed, 1 - 55.
- Schulz U. & Troschel H.J. (1990): Fischökologische Beurteilung der Donau zwischen Laiz und Zwiefaltendorf. Arbeitsgemeinschaft für Fischökologie, 178 pp.
- Schwartz P. (2005): Ökologische und ökotoxikologische Untersuchungen zur Fischfauna im Unteren Neckar. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 106 pp.
- Schweigert N., Eggen R.I.L., Escher B.I., Burkhardt-Holm P. & Behra R. (2001): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz - Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie. Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie, EAWAG, 29 pp.
- Schwörbel J. (1986): Methoden der Hydrobiologie - Süßwasserbiologie. Gustav Fischer Verlag, 301 pp.
- Schwörbel J. (1993): Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, 316 pp.
- Segner H. (1998a): Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. Exs (86), 1 - 38.
- Segner H. (1998b): Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. Comp Biochem Physiol A: Mol Inte Physiol (120), 71 - 81.
- Segner H., Behrens A., Joyce E.M., Schirmer K. & Bols N.C. (2000): Transient induction of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity by medium change in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1. Mar Environ Res (50), 489 - 493.
- Segner H. & Braunbeck T. (1998): Cellular response profile to chemical stress. In: Schüürmann G. and Markert B. (eds.), Ecotoxicology. John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, 521 - 569.
- Seiler T.B. (2004): Development and evaluation of a membrane dialysis extraction method for wet and dry sediment samples and as a clean-up technique for acetonic Soxhlet extracts. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 73 pp.
- Seiler T.B., Rastall A.C., Leist E., Erdinger L., Braunbeck T. & Hollert H. (2006): Membrane dialysis extraction (MDE): A novel approach for extracting toxicologically relevant hydrophobic organic compounds from soils and sediments for assessment in biotests. J Soils Sediments (6), 20 - 29.

-
- Seitz N. (2005): Der ökologische Zustand der oberen Donau - Eine integrierte Bewertung auf Grundlage von Makrozoobenthos und Sedimentkontakttests mit *Danio rerio*. Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg, 201 pp.
- Seitz N., Böttcher M., Keiter S., Kosmehl T., Manz W., Hollert H. & Braunbeck T. (2007): A novel index to evaluate genotoxicity data from dose-response curves in the comet assay. Chemosphere under review.
- Shepard R.B. (2005): Quantifying environmental impact assessments using fuzzy logic. Springer, 264 pp.
- Silvert W. (1997): Ecological impact classification with fuzzy sets. Ecol Modell (96), 1 - 10.
- Silvert W. (2000): Fuzzy indices of environmental conditions. Ecol Modell (130), 111 - 119.
- 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. Exp Cell Res (175), 184 - 191.
- Siu W.H.L., Mak E., Cao J., De Luca-Abbott S.B. & Richardson B.J. (2004): Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. Environ Toxicol Chem (23), 1317 - 1325.
- Sole M., Porte C. & Barcelo D. (2000): Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol. Environ Contam Toxicol (38), 494 - 500.
- Solomon K.R. & Sibley P. (2002): New concepts in ecological risk assessment: Where do we go from here? Mar Pollut Bull (44), 279 - 285.
- Song J., Peng P. & Huang W. (2002): Black carbon and kerogen in soils and sediments. 1. Quantification and characterization. Environ Sci Technol (36), 3960 - 3967.
- Stahl R.G. (1991): The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. Ecotoxicol Environ Safety (22), 94 - 125.
- Stark A., Abrajano T., Hellou J. & Metcalfe-Smith J.L. (2003): Molecular and isotopic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution and sources at the international segment of the St. Lawrence River. Org Geochem (34), 225 - 237.
- Steinberg C., Calmano W., Klapper H. & Wilken R.D. (2002): Handbuch angewandte Limnologie - Einführung: Mensch und Gewässer. In: Steinberg C., Calmano W., Klapper H. and Wilken R.D. (eds.), Handbuch angewandte Limnologie. Ecomed, 1 - 44.
- Storch V., Segner H., Juario J. & Duray M.N. (1984): Influence of nutrition on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Chanidae: Teleostei). Zool Anz (213), 151 - 160.
- Sturve J., Stephensen E. & Forlin L. (2005): Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Hepatol (4), 1 - 8.
- Suzuki J., Sadamasu T. & Suzuki S. (1982): Mutagenic activity of organic matter in an urban river sediment. Environ Pollut (29), 91 - 99.
- Terofal F. (1996): Süßwasserfische. Mosaik Verlag, 287 pp.
- Thomson K., Liu D. & Kaiser K.L.E. (1986): A direct resazurin test for measuring chemical toxicity. Toxicity Assessment (1), 407 - 418.
- Torres de Lemos C., Milan Rodel P., Regina Terra N., Cristina D'Avila de Oliveira N. & Erdtmann B. (2007): River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. Ecotoxicol Environ Saf (66), 391 - 401.

-
- Tran L.T., Knight C.G., O'Neill R.V., Smith E.R., Riitters K.H. & Wickham J. (2002): Fuzzy decision analysis for integrated environmental vulnerability assessment of the mid-Atlantic Region. *Environ Manag* (29), 845 - 859.
- Ulrich M., Schulze T., Leist E., Glaß B., Maier M., Maier D., Braunbeck T. & Hollert H. (2002): Ökotoxikologische Untersuchung von Sedimenten und Schwebstoffen: Abschätzung des Gefährdungspotenzials für Trinkwasser und Korrelation verschiedener Expositionspfade (Acetonischer Extrakt, Natives Sediment) im Bakterienkontakttest und Fischeitest. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* (14), 132 - 137.
- 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. *Mutat Res* (394), 81 - 93.
- Valentin-Severin I., Le Hegarat L., Lhuguenot J.C., Le Bon A.M. & Chagnon M.C. (2003): Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: Comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res* (536), 79 - 90.
- 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), 455 - 499.
- van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F. & Zacharewski T. (1998): Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* (106), 775 - 792.
- van den Berg M., De Jongh J., Poiger H. & Olson J.R. (1994): The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* (24), 1 - 74.
- van Metre P.C., Mahler B.J. & Furlong E.T. (2000): Urban sprawl leaves its PAH signature. *Environ Sci Technol* (34), 4064 - 4070.
- 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 Toxicol* (30), 71 - 133.
- Walker M.K., Cook P.M., Butterworth B.C., Zabel E.W. & Peterson R.E. (1996): Potency of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in causing fish early life stage mortality. *Fundam Appl Toxicol* (30), 178 - 186.
- Wang S.L., Lin C.Y., Guo Y.L., Lin L.Y., Chou W.L. & Chang L.W. (2004): Infant exposure to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs) - Correlation between prenatal and postnatal exposure. *Chemosphere* (54), 1459 - 1473.
- Weinmann W. (1952): Untersuchung der Donau von 2. bis 7. September 1952. Innenministeriums, Abt. VI, Straßen- und Wasserbau, Abwicklungsstelle Tübingen und der Stadt Ulm, pp.
- Wessler A. (1999): Assessment and characterization of genotoxic water contaminants with modern genotoxicological methods. *Acta Hydrochim Hydrobiol* (27), 164 - 169.
- Westerfield C. (1987): The zebrafish book: A guid for the labortary use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press.

- 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), 1582 - 1588.
- White P.A. (2002): The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res* (515), 85 - 98.
- White P.A. & Claxton L.D. (2004): Mutagens in contaminated soil: A review. *Mutat Res* (567), 227 - 345.
- White P.A., Robitaille S. & Rasmussen J.B. (1999): Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* (18), 1843 - 1847.
- Whitlock J.P. (1993): Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem Res Toxicol* (6), 754 - 763.
- Wickham J.D., Jones K.B., Riitters K.H., O'Neill R.V., Tankersley R.D., Smith E.R., Neale A.C. & Chaloud D.J. (1999): Environmental Auditing: An integrated environmental assessment of the US Mid-Atlantic region. *Environ Manage* (24), 553 - 560.
- Willett K.L., Gardinali P.R., Sericano J.L., Wade T.L. & Safe S.H. (1997): Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Arch Environ Contam Toxicol* (32), 442 - 448.
- Windal I., Van Wouwe N., Eppe G., Xhrouet C., Debacker V., Baeyens W., De Pauw E. & Goeyens L. (2005): Validation and interpretation of CALUX as a tool for the estimation of dioxin-like activity in marine biological matrixes. *Environ Sci Technol* (39), 1741 - 1748.
- Wirzinger G., Weltje L., Gercken J. & Sordyl H. (2007): Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? *Mutat Res* (628), 19 - 30.
- Wölz J. (2004): Entwicklung von Fraktionierungsmethoden zur Untersuchung des Dioxin-ähnlichen Potenzials von Hochwasserschwebstoffen. *Aquatic Toxicology - Department of Zoology, University of Heidelberg*, 93 pp.
- Wright P.J. & Tillitt D.E. (1999): Embryotoxicity of Great Lakes lake trout extracts to developing rainbow trout. *Aquat Toxicol* (47), 77 - 92.
- Wurm K. (2001): Untersuchung zum Rückgang des fischereilichen Ertrages in der Donau zwischen Sigmaringen und Erbach. *Gewässerökologisches Labor Dr. Karl Wurm*, 124 pp.
- Yauk C.L., Fox G.A., McCarry B.E. & Quinn J.S. (2000): Induced minisatellite germline mutations in herring gulls (*Larus argentatus*) living near steel mills. *Mutat Res* (452), 211 - 218.
- Zabel E.W., Cook P.M. & Peterson R.E. (1995a): Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners based on early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* (31), 315 - 328.
- Zabel E.W., Walker M.K., Hornung M.W., Clayton M.K. & Peterson R.E. (1995b): Interactions of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners for producing rainbow trout early life stage mortality. *Toxicol Appl Pharmacol* (134), 204 - 213.
- Zahn T. & Braunbeck T. (1993): Isolated fish hepatocytes as a tool in aquatic toxicology: Sublethal effects of dinitro-*o*-cresol and 2,4-dichlorophenol. *Sci Tot Environ (Suppl.)*, 721 - 734.
- Zahn T. & Braunbeck T. (1995): Cytologic evidence for malachite green toxicity in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicol In Vitro* (9), 729 - 741.
- Zhou J.G., Henry E.C., Palermo C.M., Dertinger S.D. & Gasiewicz T.A. (2003): Species-specific transcriptional activity of synthetic flavonoids in guinea pig and mouse cells as a result of

differential activation of the aryl hydrocarbon receptor to interact with dioxin-responsive elements. *Mol Pharmacol* (63), 915 - 924.

Zimmer M. & Ahlf W. (1994): Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. Technische Universität Hamburg-Harburg, 309 pp.

Zimmermann H.J. (1995): Datenanalyse: Anwendung von DataEngine mit Fuzzy Technologien und neuronalen Netzen. VDI Verlag, 230 pp.

