Bericht an die Stiftung des Landesnaturschutzverbandes zum Schwerpunktthema „Das Wasser und sein Lauf“

Thema des Forschungsvorhabens: Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen

Antragstellerin: Krisztina Vincze

Betreuer: Prof. Dr. Rita Triebskorn
Dr. Volker Scheil

Die Promotionsarbeit wird ausgeführt an der:
Universität Tübingen
Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere
Konrad- Adenauer Str. 20, 72072 Tübingen

März 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 4

2. Einleitung 5

3. Beschreibung des Projektes 5

4. Ziele des Projektes 9

5. Bisher geleistete Arbeiten, Stand des Forschungsvorhabens 9

6. Methoden 11

6.1 Probenahme 11

6.2 Mikrokern-Test 12

6.3 Komet Assay 13

6.4 Histologie 13

6.5 Stressproteinanalyse 14

6.6 Early Life Stage (ELS) Test mit dem Zebrabärbling (Danio rerio) 14

6.7 Statistische Auswertung 15

7. Ergebnisse 16

7.1 Limnologische Untersuchungen 16

7.2 Early Life Stage Test (ELS) mit Eiern des Zebrabärblings 17

7.3 Untersuchungen an Flohkrebsen 22

7.3.1 Histologische Untersuchungen an Flohkrebsen 23

7.3.2 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Flohkrebse 24

7.4 Untersuchungen an Bachforellen des aktives Monitorings 25

7.4.1 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Bachforellen 26

7.4.2 Gentoxische Untersuchungen bei Bachforellen 28

8. Diskussion 28

8.1 Passives Umweltmonitoring 29

8.2 Aktives Umweltmonitoring 30

8.3 Fazit 31

9. Literatur 33

1. Zusammenfassung

Die Verwendung von Biomarkern in der ökotoxikologischen Freilandforschung ist ein relativ neues und hochaktuelles Thema. Biomarker sind definiert als biologische Veränderungen von Organismen (von der molekularen über die zelluläre und physiologische Ebene bis zu Verhaltensänderungen), die durch Exposition gegenüber Umweltchemikalien verursacht werden. Ziel des vorliegenden Projektes ist die Charakterisierung des ökologischen Zustandes des Neckars mit Hilfe einer Biomarkerpalette bei Fischen und Wirbellosen. In dieser Studie wurden mehrere Probestellen am Neckar bei Tübingen ober- und unterhalb der örtlichen Kläranlage untersucht. An diesen Probestellen erfolgte im Jahr 2012 im Rahmen eines passiven Monitorings die Entnahme von Flohkrebsen (*Gammarus sp.).* Durch den Einsatz von diversen mikroskopischen (Histopathologie) und molekularbiologischen (Stressproteinanalyse) Methoden konnten Gewebeschädigungen und allgemeine Stressreaktionen bewertet werden. Die physikochemischen Grundverhältnisse und toxischen Potenziale von Wasser- und Sediment wurden durch limnologische Untersuchungen bzw. durch den Embryotest mit den Eiern des Zebrabärblings (*Danio rerio*), beurteilt. Um relevante Informationen über den Einfluss der Tübinger Kläranlage auf die Physiologie von Fische zu erhalten wurde im vergangenen Jahr eine Expositionsstudie durchgeführt, wobei Bachforellen in Edelstahl-Schwimmkäfigen ober- und unterhalb der Kläranlage aktiv exponiert wurden. Es wurden mit Hilfe einer gut konstruierten Biomarkerpalette proteotoxische und genotoxische Wirkungen sowie generelle Schädigungen bei den Forellen erfasst. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen untersuchten Gewässerabschnitten eine deutliche toxische Belastung vorliegt und sowohl die Fische, als auch die Invertebraten empfindlich auf Umweltstressoren reagieren. Eine bedeutende Belastungsquelle stellt die Tübinger Kläranlage dar, welche eindeutige negative Effekte auf den Gesundheitsstatus der Fische hervorrief. Die vorliegende Studie liefert wichtige Informationen über die Wasserqualität des Neckars und hilft zu beurteilen, welche Biomarker zur Umweltrisikoabschätzung und Charakterisierung eines Gewässers am besten geeignet sind.

2. Einleitung

Die ökotoxikologische Freilandforschung spielt eine entscheidende Rolle in der Einschätzung möglicher Gefahren durch Umweltchemikalien in der Natur. Mittels diverser Monitoringmethoden ist es möglich, aquatische und terrestrische Lebensräume in Hinsicht auf ihre Belastung und ökologischen Zustand zu charakterisieren. Bei dem sogenannten passiven Umweltmonitoring werden in einem bestimmten Habitat lebenden Organismen entnommen und untersucht. Dadurch ist es möglich, die Konsequenzen einer Langzeitbelastung zu beurteilen, es ist allerdings zu beachten, dass die Tiere im Laufe der Zeit Resistenzen gegen verschiedene Stressfaktoren entwickeln können. Das aktive Monitoring bietet eine weitere Option beim Detektieren toxischer Wirkungen, dabei werden unbelastete Testorganismen in eine bestimmte Umgebung eingesetzt (in Käfigen, Bypass-Aquarien usw.) und über einen definierten Zeitraum exponiert. Um Informationen über den physiologischen Zustand von Lebewesen zu gewinnen, können Techniken mit spezifischen Biomarkern angewendet werden (Nogueira et. al., 2010). In der Ökotoxikologie sind Biomarker definiert als biologische Veränderungen von Organismen (von der molekularen über die zelluläre und physiologische Ebene bis zu Verhaltensänderungen), die durch Exposition gegenüber Umweltchemikalien verursacht wurden (Peakall, 1994). Solche sind zum Beispiel: verminderte Integrität von DNA und Membranen, Induktion von Stressproteinen und Biotransformationsenzymen, ultrastrukturelle Veränderungen von Zellen, histologische und immunologische Effekte usw. Um diese Reaktionen der Organismen zu detektieren und zu quantifizieren ist eine Reihe von Biomarkertechniken nötig. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass mit Hilfe von Biomarkern meistens nur spezifische Toxizitäten abgebildet werden können, daher ist die Etablierung einer ausgesuchten Biomarkerpalette notwendig, um ökologisch relevante Aussagen treffen zu können.

3. Beschreibung des Projektes

Der 367 km lange Neckar fließt durch den zentralen Teil Baden-Württembergs, in seinem Einzugsgebiet leben etwa 5 Millionen Menschen. Die vielfältige Nutzung als Brauchwasserressource und Wasserstraße, sowie die Wasserkraftgewinnung und die zahlreichen Kläranlagen bedeuten erhebliche Eingriffe in die ökologische Balance des Neckars (Ikone, 2003). Leider gibt es im Fall dieses Flusses bis heute nur wenige Angaben über die genauen Konsequenzen der anthropogenen Einwirkungen. In dem vorliegenden Projekt wurde sowohl ein passives als auch ein aktives Umweltmonitoring durchgeführt, um den Gesundheitszustand des Neckars bei Tübingen zu charakterisieren und mögliche Belastungsquellen zu identifizieren.

Passives Umweltmonitoring

Für diese Studie wurden Probestellen am Neckar sowohl ober- als auch unterhalb der Tübinger Kläranlage (KA) zwischen Hirschau und Lustnau festgelegt (Abb. 1). Die örtliche Kläranlage weist ein konventionelles Abwasserreinigungssystem auf, ohne zusätzliche Ausbaustufen wie Ozonierung oder Aktivkohlefilter. Neben der Kläranlage stellt die Ammer, ein Zufluss des Neckars, eine weitere mögliche Belastungsquelle dar. Sie war vor einigen Jahren stark mit polychlorierten Biphenylen (PCBs) belastet (Schwäbisches Tagblatt, 2010).
Im Jahr 2011 erfolgten zwei Probenahmen, eine im Frühling und eine im Herbst. An den Probestellen wurden in Kooperation mit dem Kreisfischereiverein Tübingen Blut- und Gewebeproben von Döbeln (*Leuciscus cephalus*) entnommen. Es wurden zusätzlich an allen Standorten Flohkrebse (*Gammarus* sp.) gesammelt. Durch den Einsatz von diversen mikroskopischen und molekularbiologischen Biomarkermethoden konnten Gentoxizität, Gewebeschädigungen und allgemeine Stressreaktionen der Freilandorganismen erfasst werden. Um die Toxizität des Gewässers zu beurteilen, wurden nach der Messung limnologischer Parameter Wasser- und Sedimentproben entnommen und im Labor mit einem Entwicklungstest (Early Life Stage Test) mit Zebrabärblingen (*Danio rerio*) untersucht.

Abbildung 1: Probestellen des passiven Monitorings am Neckar bei Tübingen. P1- unterhalb der Kläranlage, P2- oberhalb der Kläranlage, unterhalb des Ammer Zuflusses, P3- oberhalb des Ammer-Zuflusses, P4- bei Hirschau.

Das Projekt wurde auch im Jahr 2012 fortgesetzt. Es wurden zweimal im Jahr Probenahmen durchgeführt, wobei limnologische Parameter gemessen und Wasser- und Sedimentproben mithilfe des Early Life Stage Tests untersucht wurden. Es erfolgten ebenfalls Entnahmen von Flohkrebsen. Während der Elektrobefischung im vorherigen Jahr ergaben sich zu geringe Fangzahlen unterhalb der Tübinger Kläranlage, obwohl die Strömung- und Strukturbedingungen theoretisch auch für Weißfische geeignet waren. Um dieses Problem zu überwinden, wurde für die Fische vom passiven Monitoring zum aktiven Monitoring gewechselt.

Aktives Umweltmonitoring

Im Rahmen des aktives Monitorings wurden jeweils 30 junge (18 Monate alt, Fischzucht Lohmühle, Alpirsbach) Bachforellen (*Salmo trutta fario*) in durchströmbaren Edelstahl Schwimmkäfigen (Abb. 2) unterhalb (PS1, siehe Abb. 1) und oberhalb (PS2, siehe Abb. 1) der Kläranlage Tübingen exponiert. Der Bau der Käfige erfolgte mit finanziellen Mitteln der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere. Die Fische wurden alle zwei Tage *ad libitum* mit Forellenpellets gefüttert, dabei wurde die Mortalität ebenfalls regelmäßig kontrolliert. Die Beprobung der Fische erfolgte nach 10 und 30 Tagen, auf diese Weise war es möglich, die Reaktion der Tiere auf eine kurz- und mittelfristige Belastung zu vergleichen. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich 15 unbelastete Bachforellen von der Fischzucht Lohmühle untersucht. Um den Gesundheitszustand der Forellen erfassen zu können, wurde die gleiche Palette von Biomarkertests verwendet wie bei den Döbeln im Jahr 2011.

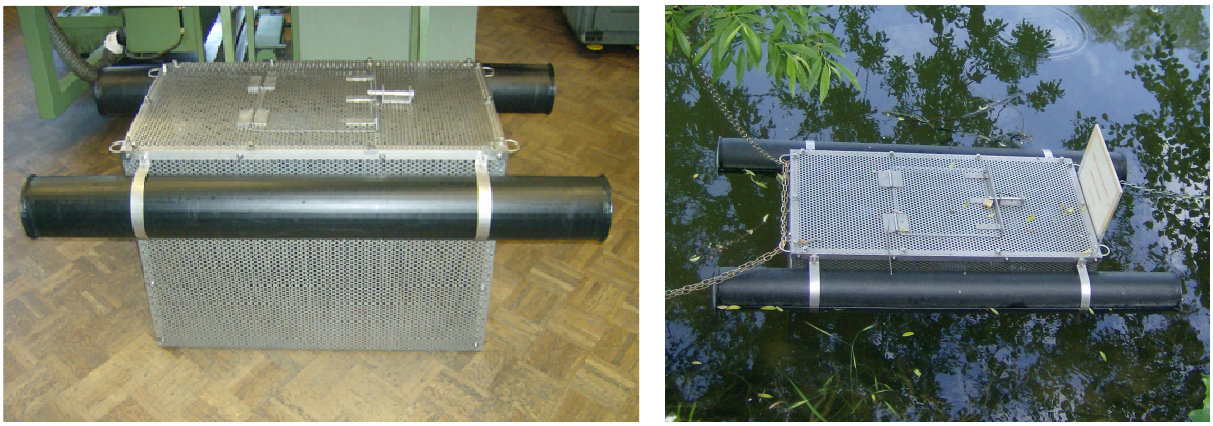

Abbildung 2: Durchströmbarer Edelstahl-Schwimmkäfig des aktiven Monitorings. Die Expositionskäfige wurden von der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere der Universität Tübingen entworfen und in der Universitätswerkstatt gebaut.

In dem vorliegenden Projekt wurde bei den im Neckar lebenden, bzw. exponierten Organismen eine gut konstruierte Biomarkerpalette eingesetzt. Eine einfache Übersicht dazu zeigen die Tabellen 1 und 2.

Tabelle 1: Untersuchte Organismen und Biomarkertests des passives Monitorings

Passives Monitoring			
Organismus	**Test**	**Zweck**	**Zeitpunkt**
Eier des Zebrabärblings	Early Life Stage	Nachweis von toxischen und teratogenen Potenziale	Mai /Sept. 2011 Mai/Sept. 2012
Flohkrebse	Stressproteine	Detektieren von proteotoxischen Wirkungen	Mai /Sept. 2011 Mai/Sept. 2012
	Histologie	Gewebeschädigungen identifizieren	Mai /Sept. 2011 Mai/Sept. 2012
Döbel	Stressproteine	Proteotoxische Wirkungen	Mai /Sept. 2011
	Histologie	Gewebeschädigungen identifizieren	Mai /Sept. 2011
	Komet Assay	Nachweis von DNA-Schäden	Mai /Sept. 2011
	Mikrokern	Detektieren von Zellteilungsfehler	Mai /Sept. 2011

Tabelle 2: Untersuchte Organismen und Biomarkertests des aktives Monitorings

Aktives Monitoring			
Organismus	**Test**	**Zweck**	**Zeitpunkt**
Bachforellen	Stressproteine	Detektieren von proteotoxischen Wirkungen	Juni/ Juli 2012
	Histologie	Gewebeschädigungen identifizieren	Juni/ Juli 2012
	Komet Assay	Nachweis von DNA-Schäden	Juni/ Juli 2012
	Mikrokern	Detektieren von Zellteilungsfehler	Juni/ Juli 2012

4. Ziele des Projektes

Das Ziel des vorliegenden Projektes ist zum einen die Beurteilung des ökologischen Zustandes des Neckars bei Tübingen durch Untersuchungen von im Fluss lebenden bzw. exponierten Organismen, zum anderen die Evaluierung sowie der Vergleich der in der Studie angewandten Biomarker- und Monitoringmethoden hinsichtlich deren Sensitivität und Eignung für ein umfassendes Gewässercharakterisierung.

Durch die vorliegende Studie sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie hoch ist das toxische Potenzial und wie ist die Wasserqualität der Probestellen am Neckar? Kann man Belastungsquellen identifizieren?
- Wie stark ist der Einfluss des Klärwassers der Kläranlage Tübingen auf den Gesundheitszustand der Fische? Kann man erklären, weshalb im Neckar unterhalb der Kläranlage nur noch sehr wenige Fische leben?
- Welche qualitativen und quantitativen Unterschiede gibt es in den Effekten bei Invertebraten und Fischen nach einer toxischen Belastung? Kann man die Ergebnisse vergleichen?
- Welche zusätzlichen Informationen erbringen Biomarkerstudien im Vergleich zu etablierten Gewässergütekriterien?

5. Bisher geleistete Arbeiten, Stand des Forschungsvorhabens

Das „Neckarprojekt“ ist Ende 2010 mit den ersten Überlegungen gestartet. Im Jahr 2011 erfolgte ein passives Monitoring von Döbeln und Flohkrebse, zusätzlich wurden toxische Potenziale des Neckars durch limnologische Messungen und den Entwicklungstest mit Zebrabärblingseiern erfasst (Tab. 3.). Die Ergebnisse der oben genannten Biomarkerunteruntersuchungen wurden im Rahmen des ersten Berichts und einer Präsentation für die LNV-Stiftung bereits vorgestellt. Der vorliegende, zweite Bericht fokussiert aus diesen Gründen hauptsächlich auf die Ergebnisse der im Jahr 2012 geleisteten Arbeiten (Tab.4.).

Tabelle 3: Zusammenfassung der im Jahr 2011 geleisteten Arbeiten

2011	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sept	Okt	Nov	Dez
Vorarbeiten Flohkrebse												
Probenahme und Limnologie												
Stressproteinanalyse Döbel												
Mikrokern Test Döbel												
Komet Assay Döbel												
Early Life Stage Test Zebrabärbling												

Tabelle 4: Zusammenfassung der im Jahr 2012 geleisteten Arbeiten

2012	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sept	Okt	Nov	Dez
Histologie Döbel												
Erster Bericht an die LNV-Stiftung												
Stressproteinanalyse Flohkrebse von 2011												
Probenahme und Limnologie												
Exposition Bachforellen												
Histologie Flohkrebse von 2011												
Stressproteinanalyse Bachforellen												
Mikrokern Test Bachforellen												

Im Jahr 2013 ist geplant, die noch ausstehenden Laborarbeiten (Histologie und Komet Assay bei Bachforellen, ggf. auch chemische Analytik) durchzuführen. Einen Zeitplan für die zukünftigen Tätigkeiten stellt Tabelle 4 dar.

Tabelle 4 : Zeitplan der noch ausstehenden Arbeiten

2013	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sept	Okt	Nov	Dez
Mikrokern Test Bachforellen												
Zweiter Bericht an die LNV-Stiftung												
Histologie Bachforellen												
Comet Assay Bachforellen												
Ggf. chemische Analytik Bachforellen												
Histologie Flohkrebse von 2012												
Stressproteine Flohkrebse von 2012												

6. Methoden

6.1. Probenahme

Bei den Probenahmen des passiven Monitorings wurden an allen vier Probestellen chemische (Sauerstoff, Nitrat, Nitrit, Ammonium, Chlorid, Phosphat, Härte) und physikalische (Leitfähigkeit, Temperatur, pH) Wasserparameter gemessen. Es wurden Wasser und Sedimentproben entnommen, gekühlt in das Labor transportiert und bis zur Nutzung im ELS-Test bei -20℃ gefroren gelagert. An den Standorten wurden ebenfalls Flohkrebse gesammelt und sofort in Glutardialdehyd, bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert.

Im Fall des aktiven Monitorings (Expositionsstudie) wurden die Bachforellen mit Tricaine-Methansulfonat betäubt und getötet. Für die gentoxische Untersuchung (Mikrokern Test) an Erythrozyten wurde Blut entnommen. Parallel dazu wurden Gewebeproben für histologische Untersuchungen, Komet Assay und für die Stressproteinanalyse aus Kieme, Leber, Niere und Gonade entnommen und zunächst in Glutardialdehyd fixiert bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um eine chemische Analyse der Fischgewebe zu ermöglichen, wurde zusätzlich Muskelgewebe der Bachforellen eingefroren und im Labor bei -80℃ gelagert.

6.2. Mikrokern-Test

Mit Hilfe des Mikrokern-Tests können gentoxische Einwirkungen identifiziert werden. Wird das genetische Material im Zellkern durch Strahlung oder Chemikalien beschädigt, entstehen während der Zellteilung durch Fehlfunktionen DNA-Fragmente, die nicht in die Tochterzellen transportiert werden, sondern im Cytoplasma bleiben. Diese DNA-Fragmente sind die sogenannten Mikrokerne (Al-Sabti & Metcalfe, 1995) (Abb. 3). Die zellkernhaltigen Erythrozyten von Fischen können aufgrund ihrer großen Anzahl sowie ihrer guten Anfärbbarkeit auch in kleinen Blutvolumina für ökotoxikologische Untersuchungen verwendet werden (Schnurstein, 2001). Dafür wird den Fischen nach der Betäubung Blut entnommen und auf einem Objektträger aufgetragen. Die Blutausstriche werden vor Ort in Methanol fixiert. Im Labor erfolgt die Färbung mit Giemsa Lösung, dadurch werden die Erythrocyten blau gefärbt und der Kern wird wesentlich stärker hervorgehoben als das umgebende Cytoplasma (Abb. 4). So sind Mikrokerne im Cytoplasma neben dem normalen Kern relativ einfach zu erkennen. Die Auswertung des Mikrokerntests erfolgt unter dem Lichtmikroskop. Ein erhöhtes Auftreten von Zellen mit Mikronukleus weist darauf hin, dass die Umweltproben Fehlfunktionen bei der Zellteilung hervorrufen können (Böttcher & Hollert, 2005).

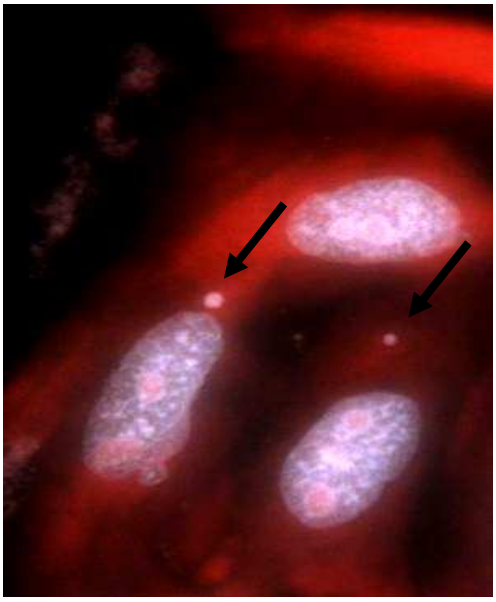

Abbildung 3: Mikrokerne in Forellenleberzellen, gefärbt mit Fluoreszenzfarbstoff (Acridinorange).

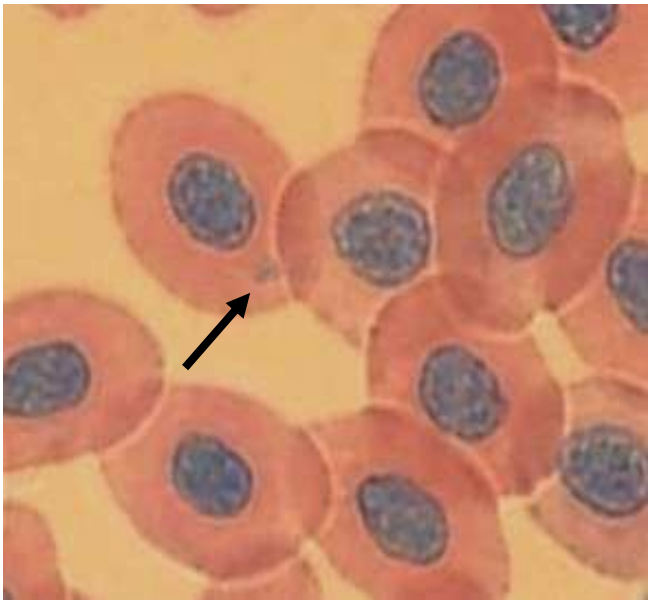

Abbildung 4: Mikrokern in Döbelerythrocyten, gefärbt mit Giemsa-Lösung.

6.3. Komet Assay

Der Komet Assay (Mikrogelelektrophorese) ist eine weitere Methode zum Nachweis von mehr oder weniger starken DNA-Schäden (Einzel- und Doppelstrangbrüche) (Schnurstein, 2001). Dabei werden die einzelnen Zellen von den Geweben durch mechanische Behandlung gewonnen. Zunächst werden sie mit flüssigem Agar gemischt und auf einen vorher mit zwei Agaroseschichten beschichteten Objektträger aufgetragen. Zum Schluss wird noch eine vierte Schutzschicht ebenfalls aus Agarose hinzugefügt. Die Objektträger werden zunächst in einer Lyselösung inkubiert. Durch diesen Schritt wird die Membran zerstört und die DNA freigesetzt. Die Fragmente werden im folgenden Schritt in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Gelelektrophorese). Die DNA kann sich während die Elektrophorese in den Poren der Agaroseschicht frei bewegen. Die negativ geladene DNA wird in die Richtung des positiven Pols gezogen. Die kleineren DNA Fragmente bewegen sich schneller in der Agarose, auf diese Weise werden die DNA Stücke nach Größe getrennt und bilden den namensgebenden „Kometen-Schweif“ (Abb. 5). Durch Färbung der Objektträger mit Ethidiumbromid wird die Verteilung der DNA für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Der DNA-Gehalt des Zellkerns und die Länge des Schweifes kann durch ein Computerprogramm gemessen und quantifiziert werden. Eine zunehmende Gentoxizität (Verursachung von Strangbrüchen) drückt sich in der Größe des Schweifs aus DNA-Fragmenten aus.

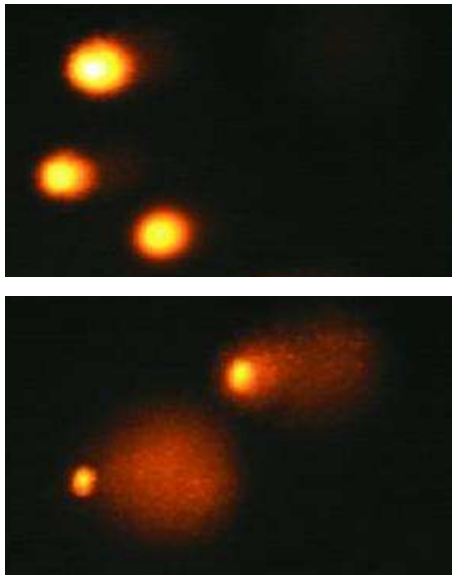

Abbildung 5: Unbeschädigte (oben) und Geschädigte (unten mit Komet-Schweif) Zellen von Forellenlebern.

6.4. Histologie

Durch eine histologische Untersuchung ausgewählter Organe ist es möglich, die von der Belastung verursachten strukturellen und funktionellen Veränderungen auf der Organebene bzw. auf zellulärer Ebene zu erforschen. Als erster Schritt werden die Proben in Glutaraldehyd fixiert. Die Fixierung dient vor allem der strukturellen Konservierung des natürlichen Gewebszustandes und verhindert die Autolyse. Nach vollzogener Fixierung folgt bei Kieme und Niere der Fische sowie bei den Gammariden ein Entkalkungsschritt, danach werden die Proben in Paraffin (Fischgewebe) bzw. Kunststoff (Gammariden) eingebettet. Es werden zunächst mit dem Mikrotom Schnitte von 3-5 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Proben werden im folgenden Schritt mit Hämatoxilyn-Eosin, bzw.

Richardson-Blau oder PAS (Periodic Acid Shiff) angefärbt. So wird es möglich, eine optimale Darstellung zu erhalten und die zellulären Bestandteile zu differenzieren (Lammer, 2005). Nach der Färbung werden die Schnitte in Rothihistol eingedeckt. Die Bewertung der Gewebeschnitte erfolgt unter dem Lichtmikroskop durch eine mehrstufige Skala, wobei zelluläre Veränderungen wie auch entzündliche Veränderungen, Nekrosen, Zustand der Kapillaren, quantitative Verhältnis der im Organ vorkommenden Zelltypen, Vakuolen im Cytoplasma, Ablösung von Epithelien usw. betrachtet werden können. Auch Veränderungen der Gonaden, die Rückschlüsse auf endokrine Potentiale geben können, werden mit dieser Methode beurteilt.

6.5. Stressproteinanalyse

Hitzeschockproteine haben eine hohe Bedeutung für das Überleben von Zellen und Organismen (Edington et al., 1989), da sie bei der korrekten Faltung anderer Proteine helfen und sie vor Denaturierung schützen. Die Hitzeschockproteine werden nach Molekulargewicht in Familien eingeteilt. Eine wichtige davon ist die Hsp70-Familie. Die meisten Stressproteine in dieser Familie werden kontinuierlich synthetisiert, ihre Konzentration kann jedoch bei Belastung oder unter extremen Bedingungen zunehmen, dadurch ist es möglich, Stressreaktionen von Lebewesen nachzuweisen. Bei dieser Methode werden die Proteine nach Homogenisierung der Gewebeproben durch Gelelektrophorese nach Molekülgewicht getrennt. Die Proteine werden zunächst auf einem Nitrozelluloseblatt aufgetragen und mit spezifischen, an Hsp70 bindenden Antikörpern markiert und gefärbt. Nach Messung der Farbintensität ist es möglich, den Stressproteingehalt und damit die toxische Einwirkung und Schädigungen in den Geweben zu Quantifizieren.

6.6. Early Life Stage (ELS) Test mit dem Zebrabärbling (Danio rerio)

Der Zebrabärbling ist ein weit verbreiteter Modellorganismus in der Biologie, denn er ist leicht zu hältern, verfügt über einen kurzen Generationszyklus und pflanzt sich über das ganze Jahr hinweg fort. Die Embryonen und ihre Entwicklung sind leicht zu beobachten. Der Early Life Stage (ELS) Test mit dem Zebrabärbling ist ein sensitiver Assay zur Abschätzung toxikologischer Wirkungen, da die ersten 14 Tage eine der empfindlichsten Phasen im Lebenszyklus des Zebrabärblings sind. Durch diesen Test kann beurteilt werden, ob Schadstoffe oder komplexe Umweltproben die Ontogenese und das Überleben der Embryonen und Larven beeinflussen. Bei Ausführung des Tests kommen die Eier des Zebrabärblings in Petrischalen und werden mit der zu untersuchenden Umweltprobe (Sediment und Wasser) belastet. Als Negativkontrolle dient Kunstwasser. Die physiologischen Effekte der Schadstoffe im Embryo werden durch ein Binokular zu festgelegten Zeitpunkten nach der

Befruchtung beobachtet und notiert. Nach 96 Stunden sind die meisten Embryonen geschlüpft. Innerhalb des Tests können letale und subletale Endpunkte erfasst werden. Letale Parameter sind (1) Koagulation, (2) nicht ausgebildete Somiten, (3) fehlender Herzschlag und (4) nicht abgelöster Schwanz. Die subletalen Parameter sind z.B. fehlende Spontanbewegung, deformierter Kopf oder Somiten, generelle Missbildung oder Unterentwicklung, Störungen des Herzschlags bzw. Blutkreislaufsystems und Ödeme (Nagel, 2002) (Abb. 6).

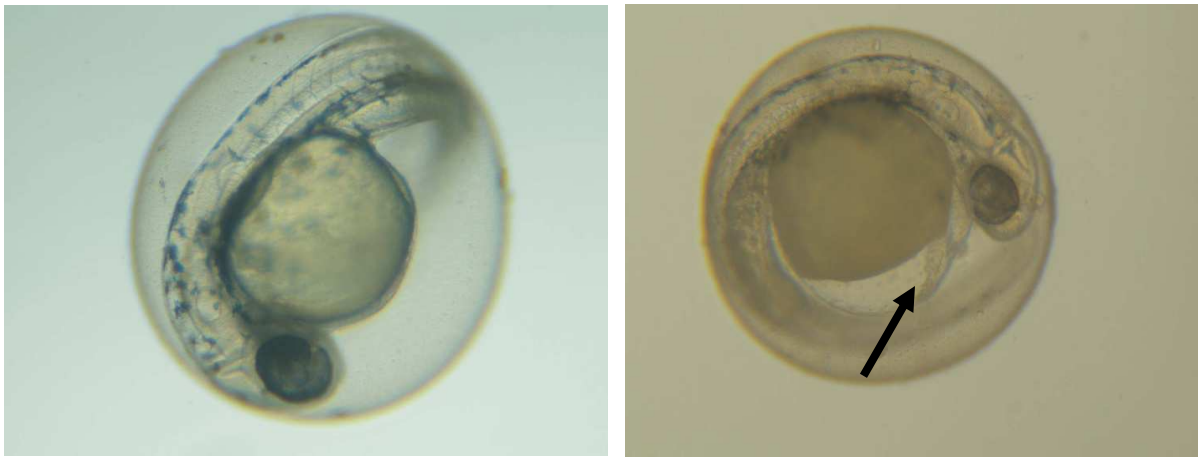

Abbildung 6: Embryonen des Zebrabärblings nach Exposition mit TMDD (2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol) (48h): Links Negativkontrolle, rechts belasteter Embryo mit Ödem, Kreislaufstörung und verminderte Pigmentierung.

6.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde in SAS JMP 9.0 ausgeführt. Alle Daten wurden zuerst mittels Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung untersucht. Im Fall einer Normalverteilung konnten parametrischen Tests wie der Tukey-Kramer Test verwendet werden. Bei nicht normal verteilten Werten wurden die Daten mittels Steel Dwass Methode (nichtparametrisch) analysiert. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen, bzw. Expositionen galten bei $p<0,05$ (*) als signifikant, bei $p<0,01$ als hochsignifikant (**) und bei $p<0,001$ (***) als höchstsignifikant. Die Graphen wurden in Sigma Plot 10.0 erstellt, signifikante Unterschiede sind immer mit Sternen markiert.

7. Ergebnisse

7.1 Limnologische Untersuchungen

Die limnologischen Wasserparameter bieten eine gute Möglichkeit, um die chemischen und physikalischen Grundverhältnisse von Gewässern zu beurteilen. Die im Neckar im Jahr 2012 gemessenen Werte sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt. Nach der chemischen Gewässerklassifikation der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser des Umweltbundesamtes (UBA, 2013) liegen die Konzentrationen von Nitrit, Ammonium und Chlorid im Frühling im mittleren, die von Nitrat und Phosphat im oberen Bereich. Zwischen den einzelnen Neckarabschnitten sind nur wenige Unterschiede zu beobachten. Im Herbst ergaben sich etwas niedrigere Nitrit- und Phosphatwerte als im Frühling, auffällig ist jedoch eine sehr hohe Chloridkonzentration unterhalb der Kläranlage. Generell verfügt der Neckar bei Tübingen über gute pH-, Härte- und Sauerstoffverhältnisse, die Konzentration von Nährstoffen wie Nitrat, Nitrit und Phosphat befindet sich im Durchschnitt im mittleren, teilweise in dem oberen Bereich.

Tabelle 5: Limnologische Wasserparameter am Neckar im Mai 2012. Die chemischen Werte sind nach der Güteklassifikation der UBA-LAWA klassifiziert:

I: Unbelastet	I-II: sehr geringe Belastung	II: mäßige Belastung	II-III: deutliche Belastung	III: erhöhte Belastung	III-IV: hohe Belastung	IV: sehr hohe Belastung

Mai 2012	Probestelle 1	Probestelle 2	Probestelle 3	Probestelle 4
Wassertemperatur [C°]	14,5	15,1	16,2	16,0
Lufttemperatur [C°]	13,3	15,3	24,1	25,1
O_2 [mg/l]	9,7	9,55	11,82	11,8
O_2 [%]	99,1	97,3	112	108
Leitfähigkeit [µS/cm]	924	901	889	849
pH	7,74	8,12	8,28	8,48
Gesamthärte [°dH]	26	26	28	27
Karbonhärte [°dH]	15	16	17	16
Nitrit [mg/l]	0,1	0,11	0,12	0,12
Nitrat [mg/l]	22	15	17	15
Ammonium [mg/l]	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Chlorid [mg/l]	58	51	50	46
Ortho-Phosphat [mg/l]	0,6	0,5	0,5	0,5

Tabelle 5: Limnologische Wasserparameter am Neckar im September 2012. Die chemischen Werte sind nach der Güteklassifikation der UBA-LAWA klassifiziert:

I: Unbelastet	I-II: sehr geringe Belastung	II: mäßige Belastung	II-III: deutliche Belastung	III: erhöhte Belastung	III-IV: hohe Belastung	IV: sehr hohe Belastung

September 2012	Probestelle 1	Probestelle 2	Probestelle 3	Probestelle 4
Wassertemperatur [C°]	15,9	15,9	15,7	16,1
Lufttemperatur [C°]	17,4	21,0	27,6	22,7
O_2 [mg/l]	9,56	9,21	10,6	13,24
O_2 [%]	101,2	95,1	107,2	134
Leitfähigkeit [µS/cm]	1035	953	938	937
pH	8,25	8,05	8,08	8,22
Gesamthärte [°dH]	29	28	28	27
Karbonhärte [°dH]	14	16	15	15
Nitrit [mg/l]	0,03	0,06	0,05	0,03
Nitrat [mg/l]	23	16	15	17
Ammonium [mg/l]	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Chlorid [mg/l]	70	55	55	55
Ortho-Phosphat [mg/l]	0,5	0,3	0,3	0,3

7.2 Early Life Stage Test (ELS) mit Eiern des Zebrabärblings

Vom Early Life Stage Test wurden jeweils zwei Replikate durchgeführt, wobei der Einfluss von Wasser- und Sedimentproben aus dem Neckar auf die Entwicklung von Eiern des Zebrabärblings untersucht wurde. Die Neckarproben von beiden Jahreszeiten haben vielfältige Effekte bei der Ontogenese der Embryonen hervorgerufen. Im Fall der im Mai gesammelten Wasser- und Sedimentproben war die Mortalität bei der Probestelle 2 (unterhalb des Ammereinlaufs) nach 60 Stunden Exposition stark erhöht. Dieses Phänomen hängt wahrscheinlich mit dem Schlupf (ab ca. 60 Stunden) und der Permeabilität der Eihülle zusammen, große Moleküle kommen in der Regel nicht durch die Poren der Eihülle (Henn & Braunbeck, 2011). Nach dem Schlupf werden die Larven auch gegenüber diesen exponiert. Parallel zu PS2 wurde schon ab den ersten 12 Stunden der Entwicklung eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrolle bei den Probestellen 1 (unterhalb der KA) und 4 (in Hirschau) detektiert (Abb.7).

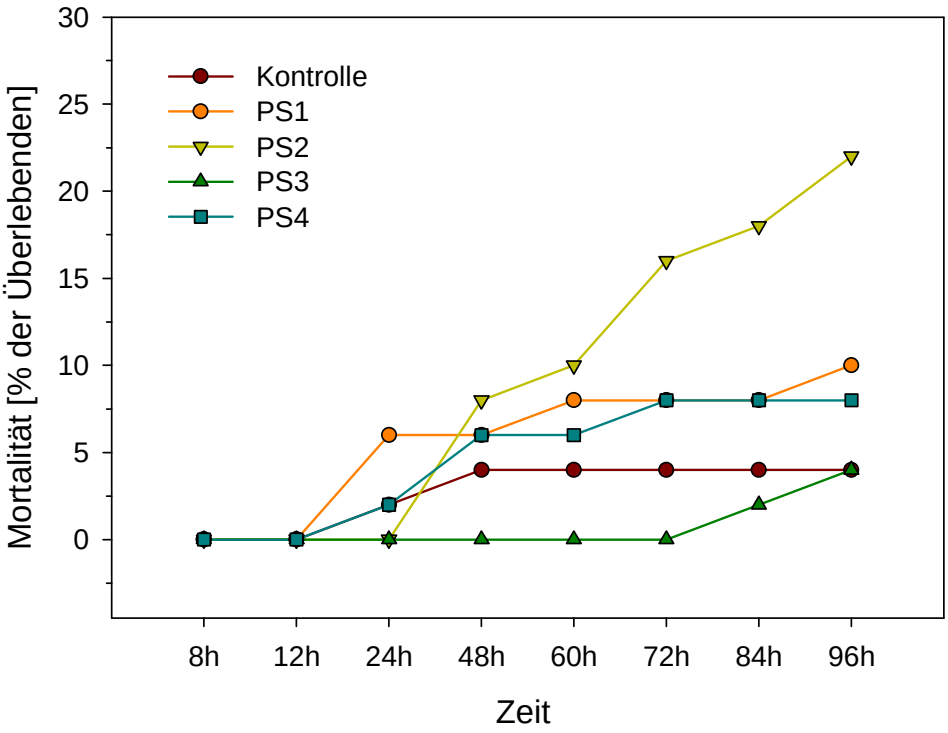

Abbildung 7: Mortalität beim Early Life Stage Test von Proben vom Mai 2012. Vereinigter Graph von zwei Replikaten.

Während der ersten 60 Stunden der Ontogenese hatten die Fische bei fast allen Expositionen der Frühlingsprobenahme Entwicklungsdefizite (Abb. 8) wie eine veränderte Herzschlagfrequenz, Ödeme, schwächere Pigmentierung sowie Schwanz- und Augendeformationen. Die stärksten Effekte traten bei den Proben der ersten und zweiten Probestelle auf, bei diesen Embryonen konnte man nach 48 Stunden keinen Herzschlag registrieren da die Tiere über ein unterentwickeltes Kreislaufsystem verfügten (Abb. 9). Bei Exposition gegenüber Proben der dritten Probestelle (oberhalb des Ammer Einlaufes) wurden nur niedrige toxische Potenziale detektiert, diese Umweltproben verursachten leichte Entwicklungszögerungen beim Zeitpunkt 24 Stunden nach Fertilisation. Im Fall der vierten Probestelle wurden Entwicklungsdefizite zwischen 10 und 40% und eine signifikant verminderte Herzschlagrate während der Ontogenese der ersten 60 Stunden detektiert.

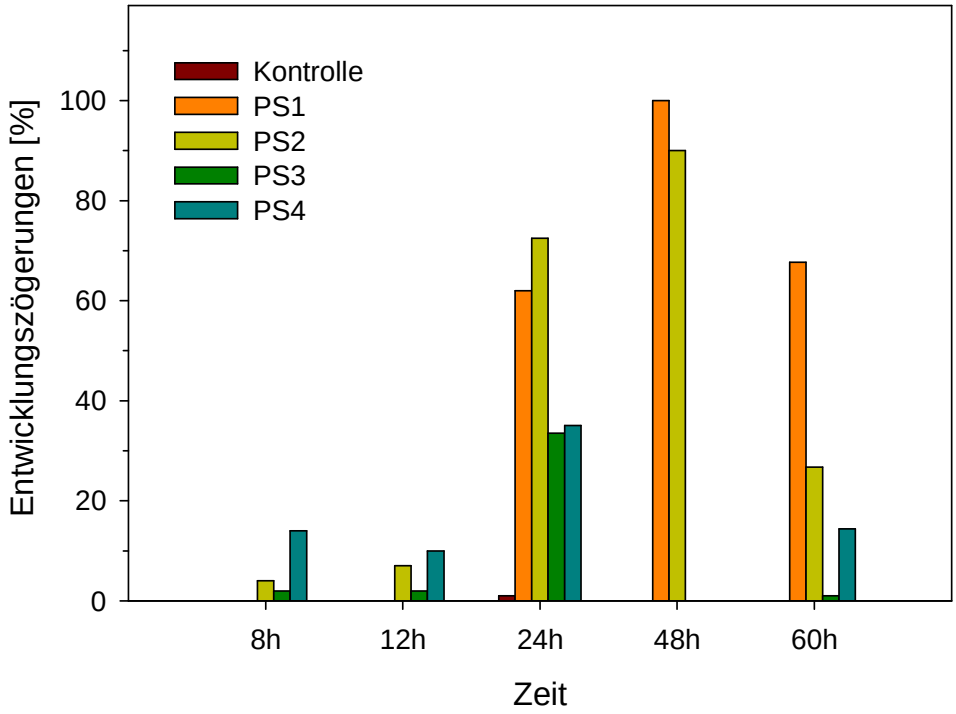

Abbildung 8: Entwicklungszögerungen in den ersten 60 Stunden der Entwicklung von Embryonen exponiert gegenüber Proben vom Mai 2012. Vereinigter Graph zweier Replikate.

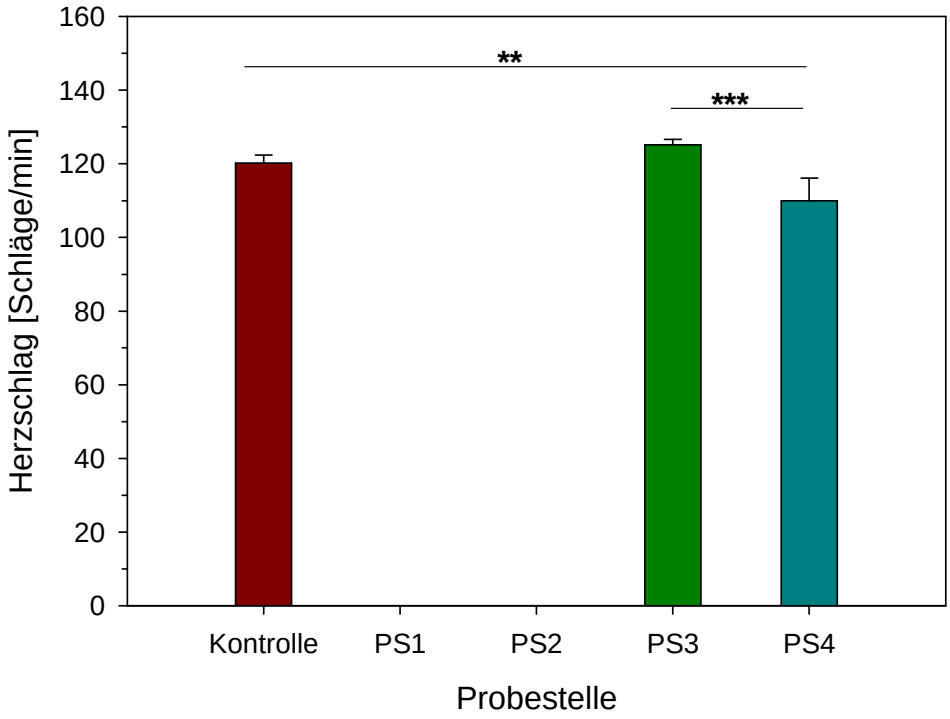

Abbildung 9: Herzschlagraten von Zebrabärblingsembryonen 48 Stunden nach Fertilisation exponiert gegenüber Proben von Mai 2012. Vereinigter Graph zweier zweier Replikate.

Bei der Untersuchung von Wasser- und Sedimentproben vom September 2012 ergab sich bei den Probestellen 1, 3 und 4 nach 96 Stunden ein Mortalitätsrate von über 40%, an die Probestelle 2 wurde nur eine leicht erhöhte Mortalität beobachtet (Abb. 10).

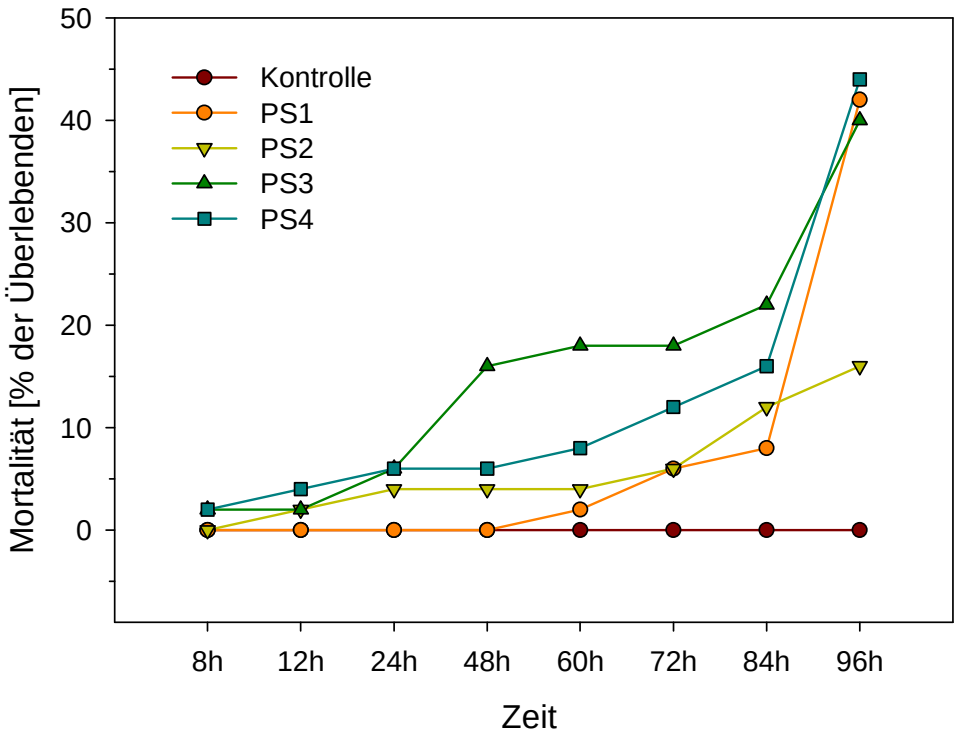

Abbildung 10: Mortalität beim Early Life Stage Test mit Proben vom September 2012. Vereinigter Graph von zwei Replikaten.

Im September gesammelte Wasser- und Sedimentproben hatten, ähnlich wie im Frühling, einen starken Einfluss auf die Ontogenese der Fischembryonen. Es wurden durch alle Expositionen Entwicklungszögerungen hervorgerufen (Abb. 11). Interessanterweise wiesen die Tiere der zweiten Probestelle die meiste Defizite auf, während dort die niedrigste Mortalitätsrate der vier Stellen ergab. Bei diesem Gewässerabschnitt konnte ebenfalls kein Herzschlag erfasst werden (Abb. 12), da die Embryonen so stark unterentwickelt waren, dass sie noch über kein Blutkreislaufsystem verfügten.

Der Early Life Stage Test zeigte, dass entlang der gesamten untersuchten Neckarstrecke deutliche toxische Potenziale anwesend sind, die stärksten Wirkungen wurden jedoch bei der ersten (unterhalb der Tübinger Kläranlage) und bei der zweiten Probestelle (unterhalb des Ammer-Einlaufes) detektiert. Es ergaben sich ebenfalls saisonale Unterschiede zwischen Frühling und Herbst, im September wurde generell eine höhere Mortalität hervorgerufen, als im Frühling.

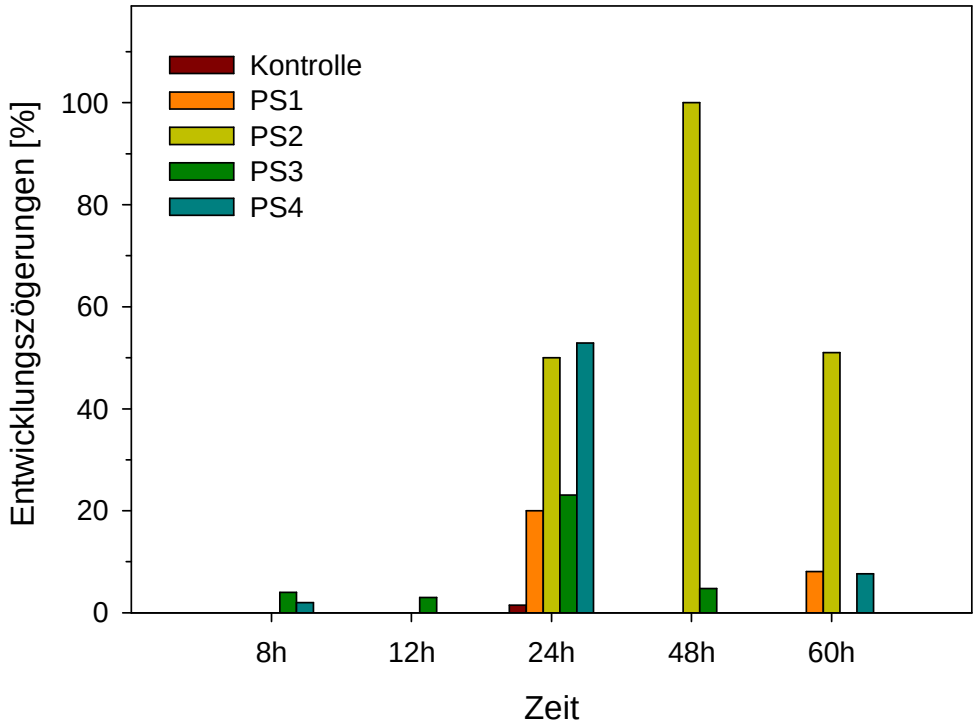

Abbildung 11: Entwicklungszögerungen in den ersten 60 Stunden der Entwicklung der Embryonen exponiert mit Proben vom September 2012. Vereinigter Graph von zwei Replikaten.

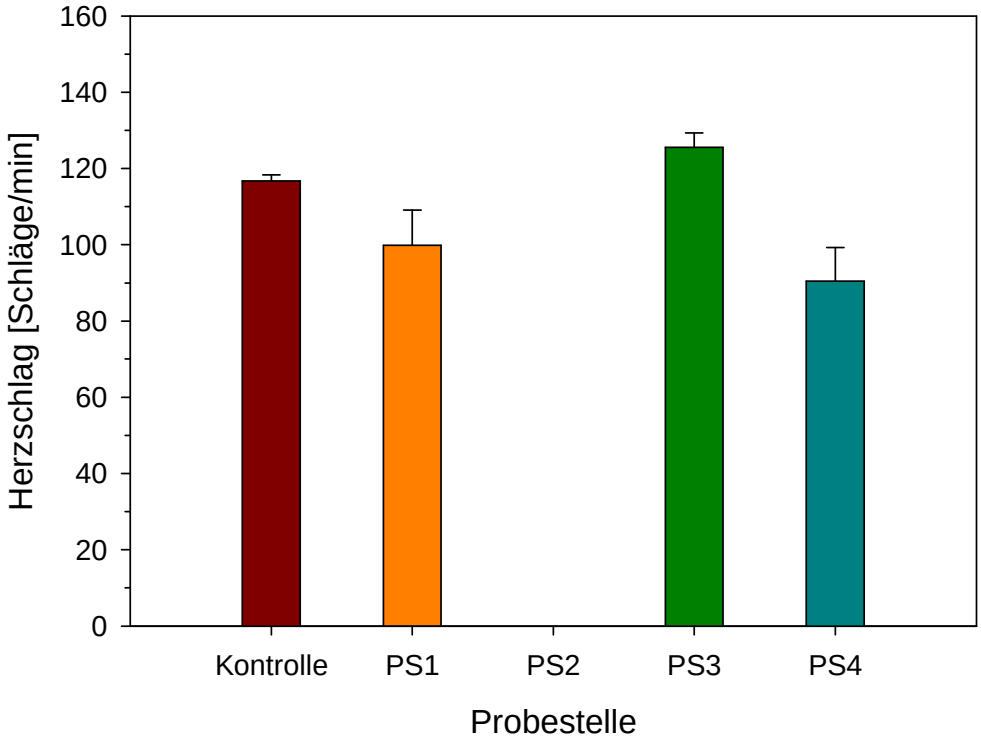

Abbildung 12: Herzschlag von Zebrabärblingsembryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber Proben vom September 2012. Vereinigter Graph von zwei Replikaten.

7.3 Untersuchungen an Flohkrebsen

Abbildung 13: Aufnahme eines fixierten Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*).

Es wurden im Rahmen des passiven Monitorings am Neckar an allen Probestellen Flohkrebse (Abb. 13) für histologische Untersuchungen und Stressproteinanalysen gesammelt. Es kamen an allen Gewässerabschnitten überwiegend Flussflohkrebse (*Gammarus roeseli*) vor, die teilweise mit Kratzern (*Acanthocephala*) parasitiert waren. Diese sogar makroskopisch erkennbaren Organismen nutzen Gammariden als Zwischenwirte und entwickeln sich in deren Leibeshöhle (Abb. 14) (Lucius & Loos-Frank, 2008). Der Parasitenbefall bedeutet eine erhebliche Belastung für den Wirt, daher war der Gesundheitszustand solcher Flohkrebse generell schlecht.

Abbildung 14: *Gammarus roeseli* parasitiert mit Acanthocephalem (Pfeil). Gefärbt mit Richardson-Blau.

7.3.1. Histologische Untersuchungen an Flohkrebsen

Bei den histologischen Untersuchungen an Flohkrebsen wurde großer Wert auf die Mitteldarmdrüse als Entgiftungsorgan, und ebenfalls auf die weibliche Geschlechtsorgane gelegt. Zur Auswertung wurde im Fall der Mitteldarmdrüse eine fünf- (1: sehr gut, 5: sehr schlecht), bzw. bei der weiblichen Gonade eine sechsstufige (Reifezustand der Eier) Skala verwendet.

Es wurden in den Mitteldarmdrüsen der Gammariden aller Probestellen starke Gewebeschädigungen detektiert. Diese beinhalteten Karyolyse, Ablösung von Zellen von der Basalmembran, starke Vakuolisierung und Nekrosen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gewässerabschnitten, wobei die erste Stelle (unterhalb der Kläranlage) tendenziell mehr Tiere, die sich bereits im Destruktionszustand befanden, aufwies (Abb. 15).

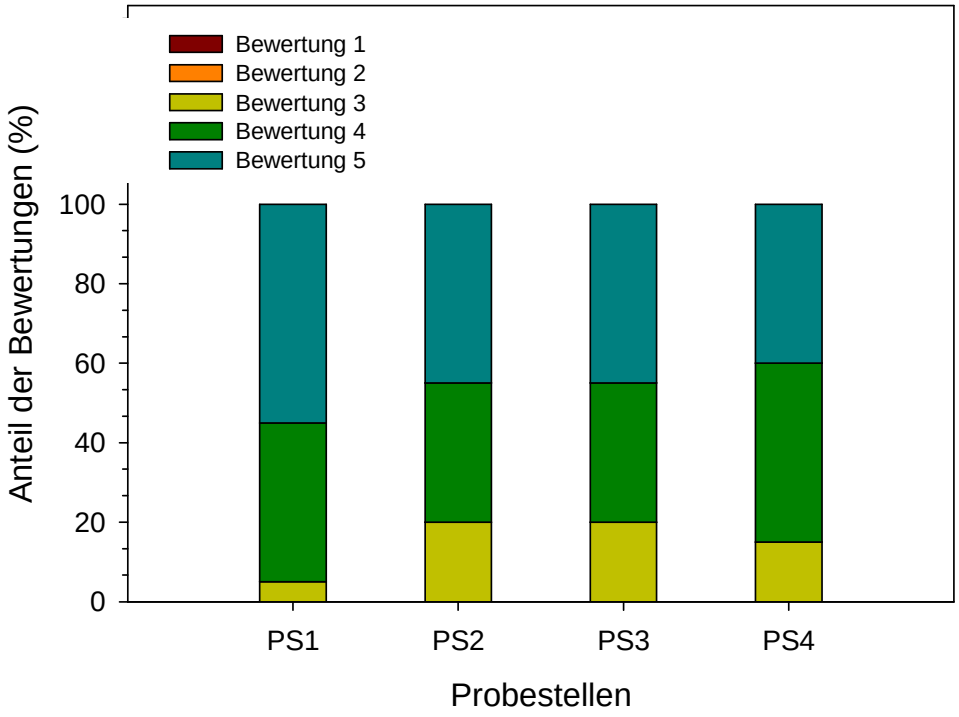

Abbildung 15: Histologische Bewertung der Mitteldarmdrüse von *Gammarus roeseli*. Proben vom Mai 2011.

Bei dem Zustand weibliche Geschlechtsorgane ergaben sich nach statistischer Analyse ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gewässerabschnitten. Es kamen an allen vier untersuchten Probestellen überwiegend spätvitellogene und reife Eistadien vor, was sich durch die Fortpflanzungszeit der Flohkrebse gut erklären lässt. Bei der ersten und zweiten Probestelle traten ebenfalls sogenannten atretische (intermediäre) Oocyten auf, die sich schon in der Abbauphase befinden (Abb. 16). Endokrine Effekte, die zu Intersextieren (sowohl weibliche als auch männliche Geschlechtsorgane im selben Individuum) führen, wurden nicht detektiert.

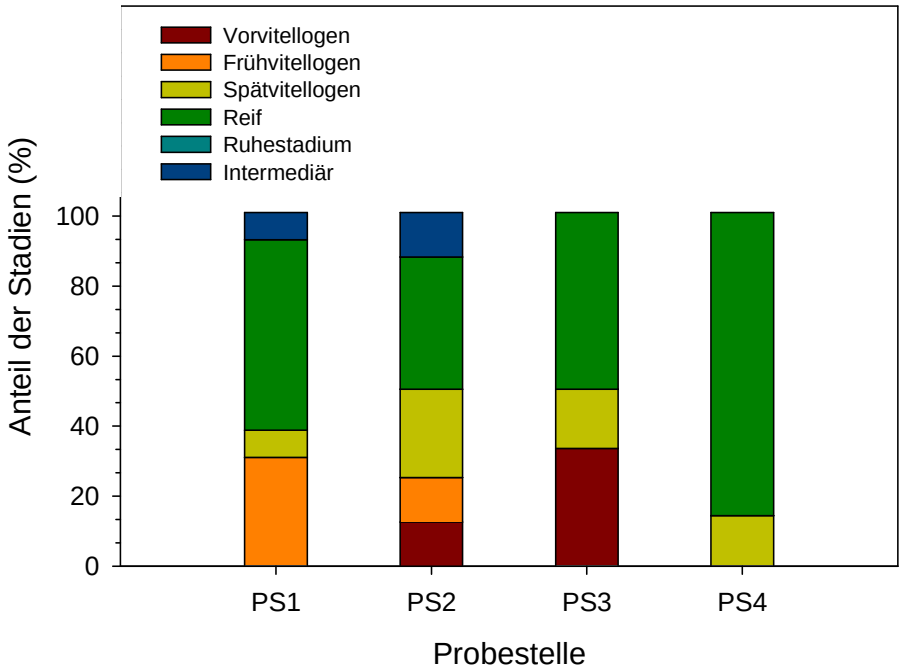

Abbildung 16: Histologische Bewertung der weibliche Gonade von *Gammarus roeseli.* Proben vom Mai 2011

7.3.2 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Flohkrebse

Während der Stressproteinanalyse der Flohkrebse stellte es sich heraus, dass dieses Protein bei Gammariden relativ instabil ist und leicht zerbricht, was seinem Nachweis schwierig macht. Nach der Datenanalyse ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Stressproteinlevel von Gammariden der verschiedenen Probestellen (Abb. 17), saisonale Unterschiede zwischen Frühling und Herbst wurden auch nicht detektiert.

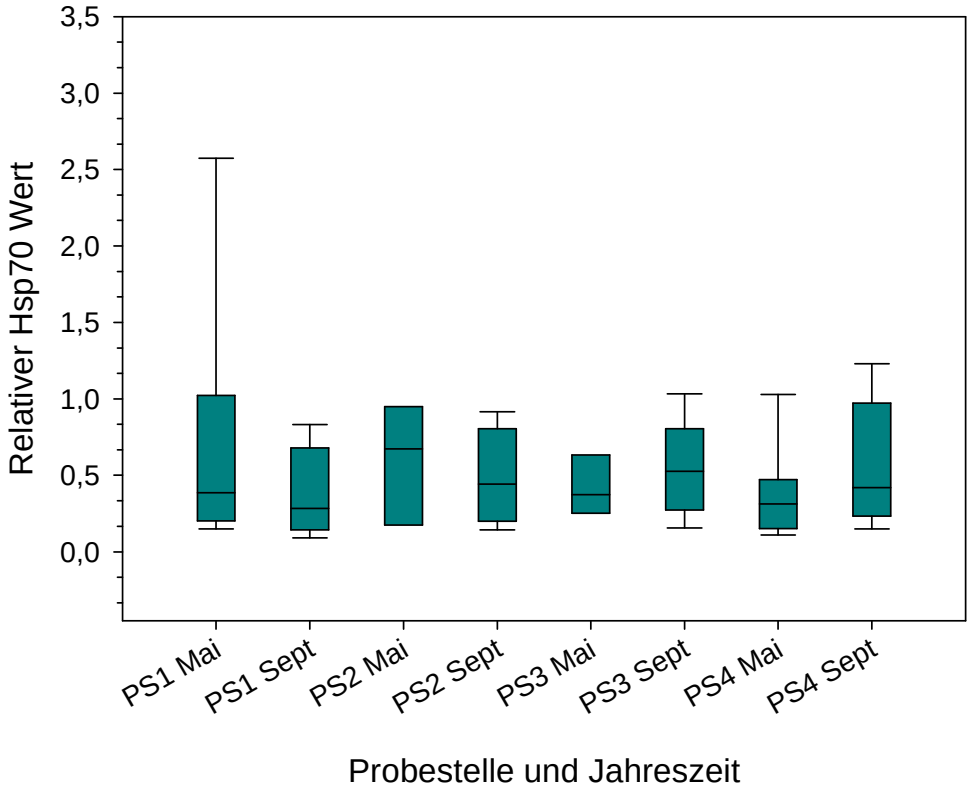

Abbildung 17: Analyse des Stressproteins Hsp70 bei *Gammarus roeseli*. Proben vom Mai und September 2011.

7.4 Untersuchungen an Bachforellen des aktives Monitorings

Durch die Ergänzung des Neckarprojekts um das aktives Monitoring konnte die Auswirkung der Kläranlage Tübingen an dem Gesundheitsstatus von Fische erfasst werden. Es ergab sich bereits nach den ersten 10 Tagen der Exposition am Neckar eine deutlich erhöhte Mortalitat bei den Bachforellen der ersten Probestelle (Unterhalb der Kläranlage) (Abb. 18).

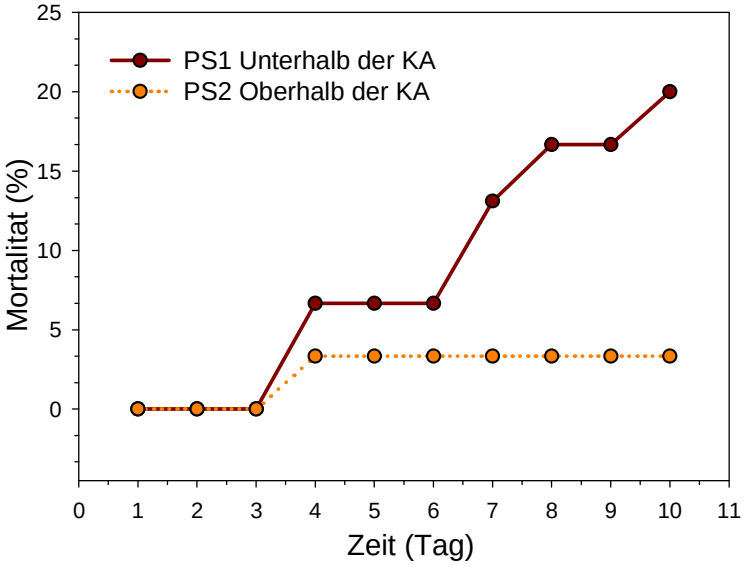

Abbildung 18: Mortalität der Bachforellen während der Expositionsstudie von 2012

7.4.1.Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Bachforellen

Bei der Bachforellen wurde der Stressproteingehalt in der Kieme, Niere und Leber untersucht, um proteotoxische Wirkungen des Gewässers zu identifizieren. Im Fall der Gonade werden die Ergebnisse erst nach der noch anstehenden Bestimmung des Geschlechts mittels histologischer Schnitte ausgewertet, da männliche und weibliche Geschlechtsorgane über einen unterschiedlichen Basis-Stressproteinlevel verfügen.

Es wurde bei den Kiemen der Fische (Abb. 19) schon nach 10 Tagen ein signifikanter Anstieg des Stressproteinlevels an den zwei Probestellen am Neckar im Vergleich zur Kontrolle detektiert, dabei wurde unterhalb der Kläranlage Tübingen die stärkste Hsp70 Induktion nachgewiesen. Die Expositionszeit hatte ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Stressreaktion der Bachforellen, nach einem Anfangsanstieg nahm der Stressproteingehalt in der Kieme nach 30 Tagen wieder ab, blieb jedoch noch immer höher als die Kontrolle.

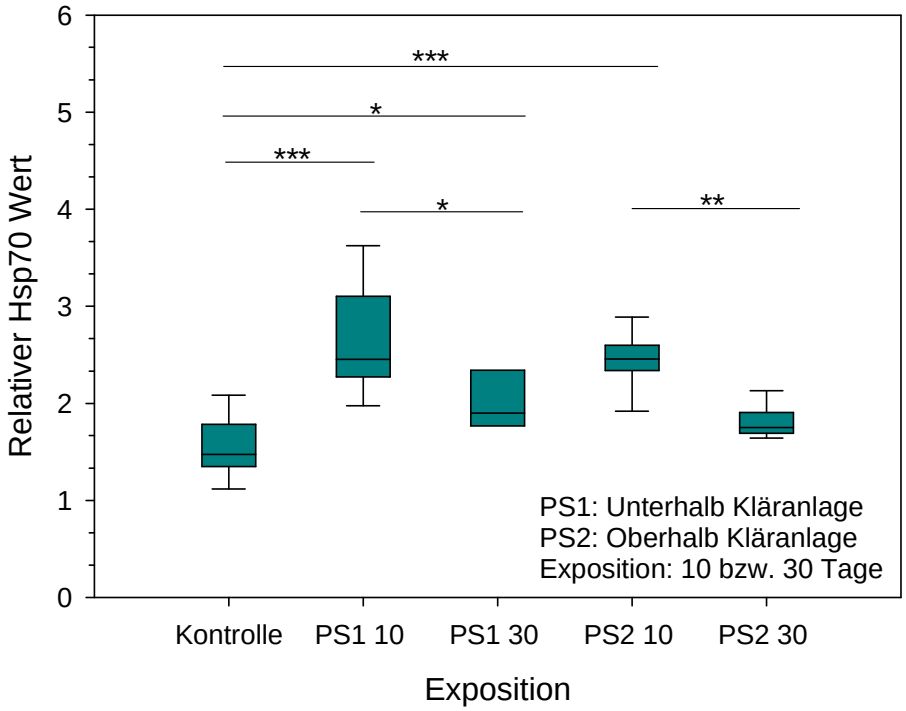

Abbildung 19: Relativer Stressproteinlevel in Kiemen von Bachforellen des aktives Monitorings. Expositionsstudie von 2012.

Die Niere (Abb. 20) und Leber (Abb. 21) der Fische zeigte eine ähnliche Reaktion auf Belastung. In den ersten 10 Tagen wurde keine, bzw. nur eine leichte (Leber) Stressproteininduktion an die Expositionsstellen nachgewiesen.

Nach 30 Tagen ergab sich ein signifikant erhöhtes Hsp70 Level sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Probestelle, unterhalb der Kläranlage wurde aber immer eine signifikant stärkere Antwort detektiert als oberhalb.

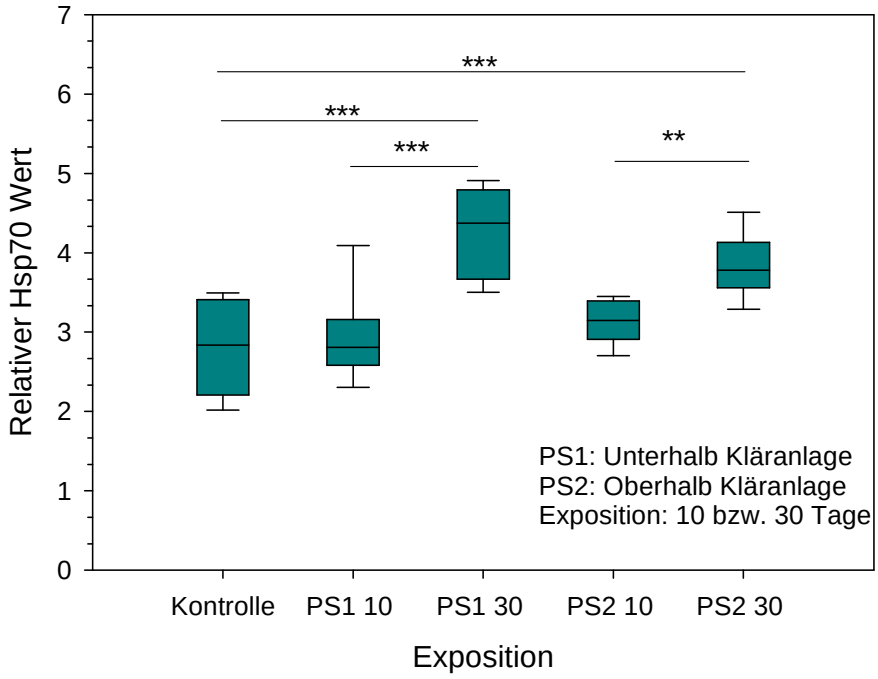

Abbildung 20: Relativer Stressproteinlevel in Nieren von Bachforellen des aktives Monitorings. Expositionsstudie von 2012.

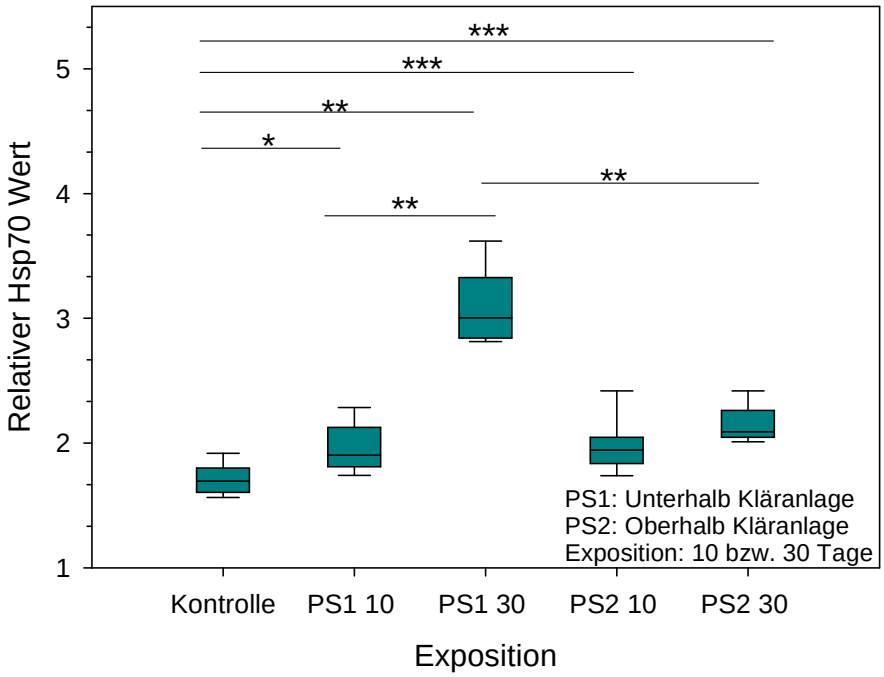

Abbildung 21: Relativer Stressproteinlevel in Lebern von Bachforellen. Expositionsstudie 2012.

7.4.2 Gentoxische Untersuchungen bei Bachforellen

Für die Evaluierung der Blutausstriche wurden unter dem Mikroskop pro Fisch jeweils 1000 Zellen ausgewertet. Bei den im Neckar exponierten Bachforellen ergab sich ein durchschnittlicher Mikrokernanateil von 0,3 bis 0,6% (Abb. 22). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Probestellen und der Kontrolle. Die Expositionszeit hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Entstehen von Mikrokernen, alle Werte befanden sich im Kontrollbereich (vgl. Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Im Gegensatz dazu wurden während der Studie im Jahr 2011 leichte gentoxische Potenziale bei Döbeln aus dem Neckar gefunden (siehe vorheriger Abschlussbericht). Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass es gut möglich ist, dass Schädigungen solcher Art erst nach einer Langzeitbelastung entstehen.

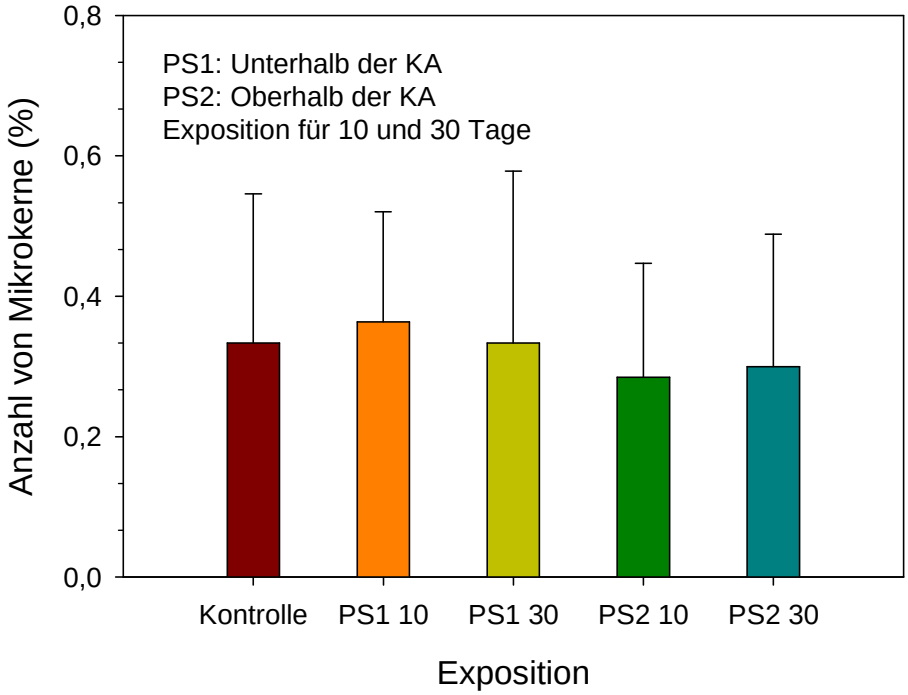

Abbildung 22: Mikrokerne in Blutzellen von Bachforellen des aktives Monitorings.

8. Diskussion

Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden diverse Monitoringmethoden und eine gut konstruierte Biomarkerpalette eingesetzt, um umweltrelevante Aussagen über die Wasserqualität des Neckars treffen zu können. Im Rahmen des passiven Monitorings konnten sowohl physikalische und chemische Grundparameter, als auch toxische Potenziale und ihre Wirkungen auf wirbellose Tiere und Wirbeltiere erfasst werden. Durch die Expositionsstudie mit Bachforellen wurden zusätzliche Daten über den Einfluss der Tübinger Kläranlage auf die Physiologie der Fische generiert.

8.1 Passives Umweltmonitoring

Die limnologischen Messungen wiesen gute physikalische Bedingungen entlang den ganzen Gewässerabschnitt auf. Nach Einstufung anhand chemischer Parameter gehört der Neckar in der Güteklasse II-III, was einer mittleren Belastung entspricht. Die grundlegende physikalischen und chemischen Wasserparameter sind zur Orientierung sehr geeignet, es können dabei aber keine spezifische Belastungen abgebildet werden, außerdem können die Messwerte stark vom Pegelstand oder punktuellen Einträgen beeinflusst werden.

Der Early Life Stage Test mit den Eiern des Zebrabärblings bietet eine gute Möglichkeit, um toxische Potenziale von Wasser und Sediment zu beurteilen. Die Ergebnisse der Untersuchungen von 2012 spiegeln grob die Resultate aus dem Jahr 2011 wider, dabei wurden bei der Probestellen 1 und 4 die meisten Entwicklungsdefizite nachgewiesen. Es wurden sowohl im 2011 als auch im 2012 saisonale Unterschiede detektiert, nach starken Regenereignissen wurden generell größere toxische Potenziale am Neckar gefunden. Wahrscheinlich liefern dabei die Regenüberlaufbecken (besonders bei PS4 und PS1) und der Kläranlageeinlauf in Tübingen deutliche Einträge. Der Embryotest mit dem Zebrabärbling beruht auf diversen Endpunkten während der Ontogenese und erwies sich als eine effektive und sensitive ökotoxikologische Methode für den Nachweis schädlicher Effekte von Umweltproben. Der Test ist ebenfalls geeignet, um saisonalen Unterschiede und, über eine Abfolge von Probestellen, mögliche Belastungsquellen eines Gewässers zu erfassen.

Flohkrebse spielen eine entscheidende Rolle in der Ökologie von Gewässer, da sie in von Frühling bis Ende Herbst in großer Masse vorkommen und vielen Fischarten als Nährtiere dienen. In der Ökotoxikologie gibt es jedoch bisher wenige Studien, die diese Tiere als Monitororganismen benutzen. Im vorliegenden Projekt wurde gezeigt, dass diese Organismen äußerst empfindlich auf verschiedene Stressfaktoren reagieren. Durch die histologischen Untersuchungen bei Flohkrebsen aus dem Neckar stellte sich heraus, dass diese Organsimen einer Belastung ausgeliefert sind und sich im Reaktionszustand, bzw. bereits im Destruktionszustand befinden. Endokrine Potenziale wurden bei keiner Probestelle detektiert. Durch die Stressproteinanalyse der Flohkrebse wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten erfasst. Bei diesem Biomarkertest müssen aber die methodischen Schwierigkeiten bei Gammariden berücksichtigt werden. Ein Problem stellt der durchgehend hohe Parasitierungsgrad der Tiere dar, welcher durch die daraus resultierende starke Belastung einen Einfluss auf den Stressproteinlevel haben kann (Sures, 2008). Aus den oben genannten Gründe waren leider die Endzahlen für die statistische Analyse niedriger als geplant.

8.2 Aktives Umweltmonitoring

Die Expositionsstudie mit Bachforellen bot eine gute Möglichkeit, um den Einfluss der Tübinger Kläranlage auf die Wasserqualität der Neckars zu beurteilen. Die erhöhte Mortalität der Bachforellen an der ersten Probestelle weist auf die negativen Effekte des Kläranlageeinlaufs auf die Wasserqualität des Neckars hin und erklärt teilweise, warum bei diesem Gewässerabschnitt während das passiven Monitorings kaum Fische vorkamen.

Die Ergebnisse der Stressproteinanalyse passen zu den Mortalitätsdaten, welche proteotoxische Wirkungen am Neckar zeigten. Dabei wiesen die verschiedenen Organe der Bachforellen eine unterschiedliche Reaktionszeit in der Antwort auf Belastung auf. Die Kieme der Fische reagiert in der Regel sehr schnell auf Umweltchemikalien, da sie in direktem Kontakt mit der äußeren Umgebung steht (Yoo & Janz, 2003), die Leber und Niere zeigen dagegen meistens eine verzögerte Antwort auf Stress, sind aber ebenfalls sehr sensitive Monitororgane. Stressproteine erwiesen sich im Fall der Fische als effektive Biomarker, da Schädigungen auch schon nach einer kurzfristigen Exposition erfasst werden konnten. Durch diese Biomarkermethode konnte gezeigt werden, dass die Tübinger Kläranlage eine deutliche Belastungsquelle für die Fische darstellt.

Beim Mikrokerntest wurde bei allen Tieren ein Mikrokernanteil <1% detektiert, was darauf hinweist, dass an den zwei untersuchten Gewässerabschnitten entweder keine genotoxische Potenziale vorhanden sind, oder dass solche Wirkungen erst nach eine längere Belastung gezeigt werden können.

Generell betrachtet war die Käfigexposition ein äußerst effektives Tool für die Beurteilung der Auswirkungen des Neckars auf den Gesundheitszustand der Fische. Man muss erwähnen, dass ähnliche Monitoringprojekte im Freiland eher selten ausgeführt werden, dadurch kann die vorliegende Expositionsstudie als Modell betrachtet werden. Das aktive Monitoring bestätigte die Ergebnisse des passiven Monitorings und bot nebenbei die Gelegenheit, der Frage der teilweise geringen Fanganzahlen unterhalb der Kläranlage auf den Grund zu gehen.

In der Zukunft wäre es empfehlenswert eine chemische Analyse auf aktuelle und relevante Schadstoffe (z.B. PBDEs, PCBs, DDX, PAKs, Methyl Triclosan, Benzotriazol usw.) in Gewebeproben der exponierten Bachforellen durchzuführen. Mit Hilfe der Erkenntnisse über im Neckar vorkommende Umweltchemikalien könnten die durch Biomerker detektierte Effekte in den Organismen genauer interpretiert werden, weiterhin wäre es möglich, direkte Verbindungen zwischen Belastung und Reaktion zu ziehen.

8.3 Fazit

Durch die vorliegende Studie wurden die folgenden Fragen beantwortet:

- Wie hoch ist das toxische Potenzial und wie ist die Wasserqualität der Probestellen am Neckar? Kann man Belastungsquellen identifizieren?

  Der Neckar bei Tübingen weist über den gesamten untersuchten Abschnitt (zwischen Lustnau und Hirschau) toxische Potenziale auf. Dabei stellen die Kläranlage Tübingen und mit großer Wahrscheinlichkeit die umgebenden Regenüberlaufbecken (besonders in Hirschau) Belastungsquellen dar.

- Wie stark ist die Einfluss des Klärwassers der Kläranlage Tübingen auf den Gesundheitszustand der Fische? Kann man erklären, weshalb im Neckar unterhalb der Kläranlage nur noch sehr wenige Fische leben?

  Durch das aktives Monitoring mit Bachforellen konnte gezeigt werden, dass eine Exposition unterhalb der Kläranlage proteotoxische Effekte und eine erhöhte Mortalität bei Fischen hervorrufen kann. Es ist durchaus möglich, dass der Eintrag von Umweltchemikalien an dieser Stelle einen zusätzlichen Stressfaktor für die Freilandfische darstellt und zu ihrer niedrigen Abundanz führt.

- Welche qualitativen und quantitativen Unterschiede gibt es in den Effekten bei Invertebraten und Fischen nach einer toxischen Belastung? Kann man die Ergebnisse vergleichen?

  Generell erwiesen sich während der Studie sowohl Flohkrebse als auch die untersuchten Fische als sensitive Monitororganismen. Die Ergebnisse waren gut vergleichbar, Fische bieten jedoch mehr Untersuchungsmöglichkeiten und haben als Wirbeltiere eine größere Relevanz in der ökotoxikologischen Freilandforschung. In bestimmten Situationen ist jedoch eine Exposition oder Entnahme von Fischen nicht möglich, hier bieten Untersuchungen an Flohkrebsen eine gute und zuverlässige Alternative.

- Welche zusätzlichen Informationen erbringen Biomarkerstudien im Vergleich zu etablierten Gewässergütekriterien?

  Mit Hilfe einer gut konstruierten Biomarkerpalette konnten Reaktionen von Lebewesen auf Belastung auf vielerlei biologische Ebenen gezeigt werden und dadurch umweltrelevante Aussagen über den Gesundheitszustand des Neckars getroffen werden. Die angewandten Biomarkermethoden haben sich sehr gut ergänzt und detektierten diverse toxische Potenziale. Im Gegensatz zu etablierten Gewässergütekriterien bieten Methoden mit Biomarkern eine Möglichkeitn detaillierte Informationen über chronische Auswirkungen geringer Schadstoffkonzentrationen im Gewässer zu erhalten, ihre Anwendung in der ökotoxikologischen Freilandforschung ist dadurch äußerst empfehlenswert.

9. Literatur

Al-Sabti, K. & Metcalfe, C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res. 343: 121-35.

Böttcher, M., Hollert, H. (2005): Mikrotucleus-Test mit RTL-W1-Zellen und Fischerytrocyten. SOP Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg

Edington, B.V., Whelan, S.A., Hightower, L.E. (1989): Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. J. Cell Physiol. 139: 219-228.

Henn, K., Braunbeck, T. (2011): Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 153:91-98

Ikone, (Integrierende Konzeption Neckar-Einzugsgebiet) (2003): Gütezustand der Fließgewässer im Neckar-Einzugsgebiet. Gewässerdirektion Neckar http://www.ikone-online.de/fileadmin/template/hefte/IKONE_Heft_5.pdf

Lammer, E. (2005): Histologie: Erstellung von Paraffinschnitte. SOP, Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg

Nagel, R. (2002): DarT: The embryo test with the Zebrafish Danio rerio--a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX. 19:38-48.

Nogueira, P., Pacheco, M., Pereira, L., Mendo,S., Rotchell M. J. (2010): Anchoring novel molecular biomarker responses to traditional responses in fish exposed to environmental contamination. Environmental Pollution. 158:1783-1790.

Peakall, D.W. (1994): Biomarkers, the way forward in environmental assessment. Toxicol. Ecotoxicol. News. 1:55-60. .

Schnurstein, A. (2001): Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring. Dissertation an der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät, Heidelberg

Schwäbisches Tagblatt (2010): Wieder Fische mit zu hohem PCB-Wert in der Ammer http://www.tagblatt.de/Home/nachrichten/kreis-tuebingen/ammerbuch_artikel,-Wieder-Fische-mit-zu-hohem-PCB-Wert-in-der-Ammer-_arid,98441.html

Sures, B. (2008): Host–parasite interactions in polluted environments. Journal of Fish Biology, 73: 2133‑2142

Umwelt Bundes Amt (2013): Chemische Gewässerklassifikation nach LAWA, http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/fluesse-und-seen/fluesse/bewertung/chemische-gewaesserklassifikation.htm

Yoo, J. L., Janz, D. M. (2003): Tissue-Specific HSP70 Levels and Reproductive Physiological Responses in Fishes Inhabiting a Metal-Contaminated Creek, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 110-120