

**Abschlussbericht an die Stiftung des
Landesnatuschutzverbandes
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

Krisztina Vincze

Februar 2012

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	4
3. Beschreibung des Projektes.....	5
4. Ziele des Projektes.....	7
5. Methoden.....	7
5.1. Probenahme.....	7
5.2. Mikrokern-Test.....	8
5.3. Komet Assay.....	9
5.4. Histologie.....	9
5.5. Stressproteinanalyse.....	10
5.6. Early Life Stage Test mit dem Zebrafisch.....	10
6. Stand der Arbeit.....	11
7. Ergebnisse.....	13
7.1. Physikalisch und chemische Wasserparameter.....	13
7.2. Early Life Stage Test mit dem Zebrafisch.....	14
7.2.1. Probenahme im November 2010.....	14
7.2.2. Probenahme im Mai 2011.....	16
7.2.3. Probenahme im September 2011.....	17
7.3. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen bei Flohkrebse.....	18
7.3.1. Histologische Untersuchung der Mitteldarmdrüse.....	19
7.3.2. Histologische Untersuchung der weiblichen Gonade.....	20
7.4. Analyse des Stressproteins Hsp70 bei <i>Gammarus sp.</i>	21
7.5. Gentoxizitätsuntersuchungen bei Döbeln.....	22
7.5.1. Mikrokern-Test mit Erythrozyten.....	22

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

7.5.2. Komet Assay mit Fischgeweben.....	23
7.6. Histologische Untersuchung der Döbel.....	26
7.6.1. Histopathologische Untersuchungen der Kieme.....	27
7.6.2. Histopathologische Untersuchungen der Leber.....	30
7.6.3. Histopathologische Untersuchungen der Niere.....	32
7.6.4. Histopathologische Untersuchungen von männlichen Gonaden.....	34
7.6.5. Histopathologische Untersuchungen der weiblichen Gonaden.....	36
7.7. Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Döbel.....	38
8.0. Diskussion.....	39
9.0. Zusammenfassung der Arbeit.....	41
10.0. Ausblick.....	43
11.0. Literatur.....	45

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

1. Zusammenfassung

Das Ziel des vorliegenden Projektes ist die Charakterisierung des ökologischen Zustandes des Neckars mittels verschiedener Biomarker bei Fischen und Wirbellosen. Das Verwenden von Biomarkern in der ökotoxikologischen Freilandforschung ist ein relativ neues und hochaktuelles Thema. Für diese Studie wurden Probestellen am Neckar bei Tübingen untersucht, an den Probestellen wurde in Kooperation mit dem Kreisfischereiverein Tübingen Blut- und Gewebeproben von Döbeln (*Leuciscus cephalus*) entnommen. Zusätzlich wurden an allen Standorten Flohkrebse (*Gammarus sp.*) gesammelt. Auf diese Weise war es möglich, die ökotoxikologischen Effekte auf Wirbellose und Wirbeltiere zu vergleichen. Um die Toxizität des Gewässers zu beurteilen, wurden Wasser- und Sedimentproben entnommen und im Labor mit einem Entwicklungstest (Early Life Stage Test) mit Zebrafärbchen (*Danio rerio*) untersucht. Durch den Einsatz von diversen mikroskopischen (Histologie, Mikrokern Test, Early Life Stage Test) und molekularbiologischen (Stressproteinanalyse, Komet Assay) Methoden konnten Gentoxizität, Gewebeschädigungen und allgemeine Stressreaktionen der Freilandorganismen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die untersuchten Invertebraten, als auch die Fische empfindlich auf Umweltstressoren reagieren. Bei den untersuchten Tieren wurden starke histopathologische Effekte und ein hoher Stressprotein-Level beobachtet. Nach den Ergebnissen der Gentoxizitätstests sind im Neckar keine Substanzen vorhanden, die das Erbmateriale von Fischen massiv beschädigen würden. Der Entwicklungstest mit dem Zebrafärbchen zeigt, dass entlang der gesamten untersuchten Neckarstrecke saisonal toxische Potenziale auftreten können. Die vorliegende Studie liefert auf diese Weise wichtige Informationen über die Wasserqualität des Neckars bei Tübingen und hilft zu beurteilen, welche Biomarker zur Umweltrisikoprüfung und Charakterisierung des Gewässers geeignet sind.

2. Einleitung

Die Ökotoxikologie beschäftigt sich mit der Analyse und dem Verständnis der Auswirkungen von chemischen Stoffen auf die Umwelt (Fent, 2003). Um die vielfältigen Fragestellungen in der Ökotoxikologie bearbeiten zu können, wurden sehr unterschiedliche Untersuchungsmethoden entwickelt, die teilweise im Labor, aber auch im Freiland angewendet werden. Im Labor können standardisierte Untersuchungen mit hoher Reproduzierbarkeit erfolgen. Dabei werden oft verschiedene Modellorganismen (Zebrafärbchen, Daphnien, Gammariden, Leuchtbakterien usw.) wie auch Zelllinien (*in vitro*-Studien) eingesetzt. Im Labor ausgeführte ökotoxikologische Tests mit Substanzen können schnelle Informationen über die Gefährlichkeit von Schadstoffen auf Lebewesen liefern. Allerdings sind

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

solche Untersuchungen häufig nicht direkt mit den Verhältnissen in der Umwelt vergleichbar (Sibbley et. al., 1999). Die ökotoxikologische Freilandforschung spielt deshalb eine entscheidende Rolle in der Einschätzung möglicher Gefahren durch Umweltchemikalien in der Natur. Um Informationen über den physiologischen Zustand von Organismen in einem bestimmten Habitat zu gewinnen und Einflüsse von deren Stressoren nachzuweisen, können Techniken mit spezifischen Biomarkern eingesetzt 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 Biotransformationseenzymen, 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 aber 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 Projekts

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). Die ökologischen Auswirkungen auf die Organismen dieses Flusses sind bis heute nur mangelhaft beschrieben. In dem vorliegenden Projekt wurden die toxischen Potentiale des Neckars bei Tübingen mittels biochemischer und physiologischer Antworten von verschiedenen vor Ort entnommenen Organismen charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden mehrere Probestellen entlang des Neckars innerhalb einer 10km langen Strecke zwischen Tübingen-Hirschau und Lustnau beprobt (Abb. 1). In Zusammenarbeit mit dem Tübinger Kreisfischereiverein wurde die Entnahme von Blut- und Gewebeproben von Döbeln (*Leuciscus cephalus*) durchgeführt. Zusätzlich wurden an allen Standorten Flohkrebse (*Gammarus sp.*) gesammelt, um die diversen Antworten auf Belastung von Wirbellosen und Wirbeltieren vergleichen zu können. Um die toxischen Effekte der Gewässer genauer zu beurteilen, wurden auch Wasser und Sedimentproben entnommen.

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

Nach den Probennahmen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Freilandfische:

- Histologische Untersuchung von Kieme, Leber, Gonade und Niere.
- Mikrokern-Test mit Erythrocyten zum Nachweis einer gentoxischen Wirkung.
- Komet Assay mit Gewebeproben zum Nachweis von DNA-Schäden.
- Quantitative Messung der Induktion des Stressproteins Hsp70.

Flohkrebse:

- Generelle Histologie.
- Quantitative Messung der Induktion des Stressproteins Hsp70.

Eier des Zebraäbrblings belastet mit Wasser/Sedimentprobe:

- Early Life Stage (ELS) Test zum Nachweis von toxischen und teratogenen Wirkungen.

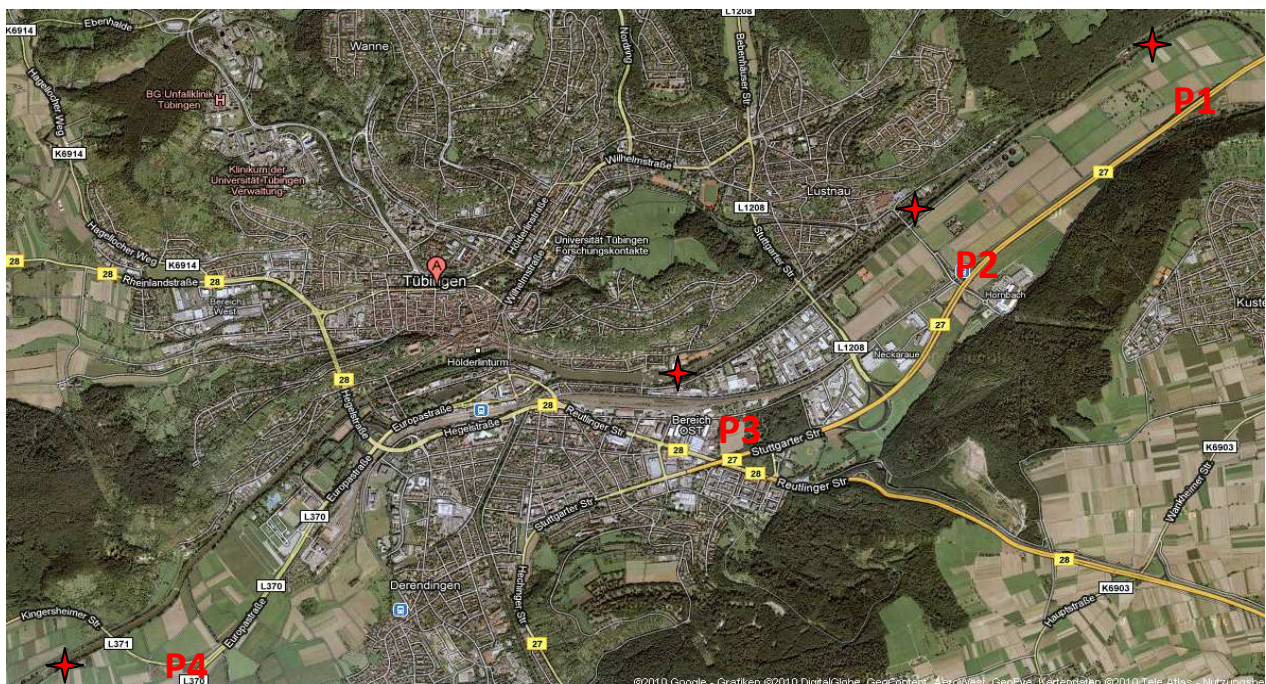


Abbildung 1: Probestellen am Neckar bei Tübingen. P1- unterhalb der Kläranlage, P2- oberhalb der Kläranlage, unterhalb des Ammer Zufluss, P3- oberhalb des Ammer-Zuflusses, P4- bei Hirschau.

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

4. Ziele des Projektes

Das Ziel des vorliegenden Projektes ist zum einen die Beurteilung des Gesundheitszustandes von Fischen und Wirbellosen des Neckars bei Tübingen mittels mikroskopischer und biochemischer Techniken und zum anderen die Evaluierung sowie der Vergleich der verschiedenen Biomarkermethoden hinsichtlich deren Sensitivität und Eignung für ein umfassendes Gewässermonitoring.

Durch die vorliegende Studie sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie stark ist das toxische Potenzial und wie ist der Wasserqualität der Probestellen am Neckar?
- Welche zusätzlichen Informationen erbringen Biomarkerstudien im Vergleich zu etablierten Gewässergütekriterien?
- Welche qualitativen und quantitativen Unterschiede gibt es in den Effekten bei Invertebraten und Fischen nach einer toxischen Belastung? Kann man die Ergebnisse vergleichen?

5. Methoden

5.1. Probenahme

An den Probestellen wurden chemische und physikalische Wasserparameter gemessen, Wasser und Sedimentproben entnommen, gekühlt in das Labor transportiert und gefroren gelagert. An den Standorten wurde die Entnahme von Döbeln mittels Elektrofischerei durchgeführt. Die Fische wurden 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, zunächst in Glutardialdehyd fixiert (Histologie) bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren (Stressproteinanalyse, Komet Assay). Es wurden zusätzlich an allen Probestellen Flohkrebse gesammelt und in Glutardialdehyd, bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert.

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

5.2. 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. 2). 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. 3). 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).

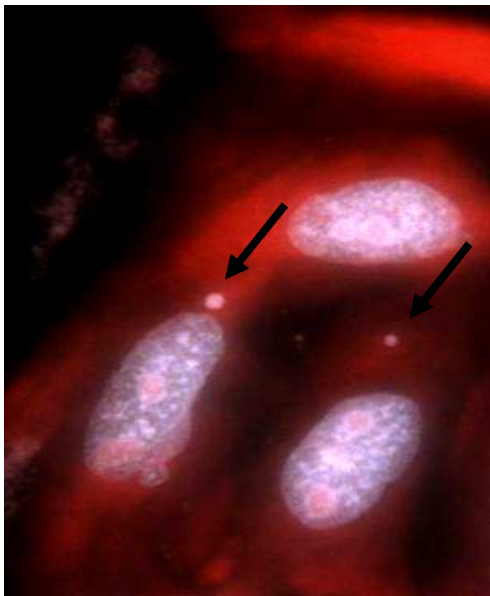


Abbildung 2: Mikrokerne in Forellenleberzellen, gefärbt mit Fluoreszenzfarbstoff (Acridinorange).

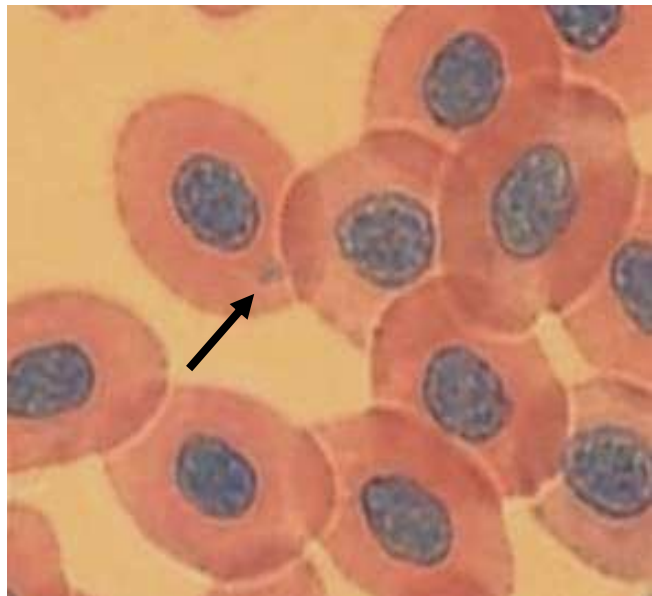


Abbildung 3: Mikrokern in Döbelerythrocyten, gefärbt mit Giemsa-Lösung.

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

5.3. 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 Behandlung mit Trypsin 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. 4). 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.

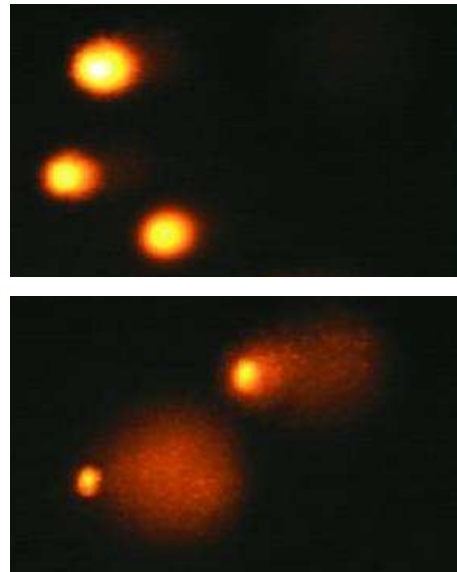


Abbildung 4: Unbeschädigte (oben) und Geschädigte (unten mit Komet-Schweif) Zellen von Forellenlebern.

5.4. 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 Schiff) angefärbt. So wird es möglich, eine

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

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.

5.5. 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 Molekulargewicht 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.

5.6. Early Life Stage (ELS) Test mit dem Zebrafisch (Danio rerio)

Der Zebrafisch ist ein weit verbreiteter Modellorganismus in der Biologie, denn er ist leicht zu halten, 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 Zebrafisch ist ein sensibler Assay zur Abschätzung toxikologischer Wirkungen, da die ersten 14 Tage eine der empfindlichsten Phasen im Lebenszyklus des Zebrafisches 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 Zebrafisches 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)

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

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. 5).

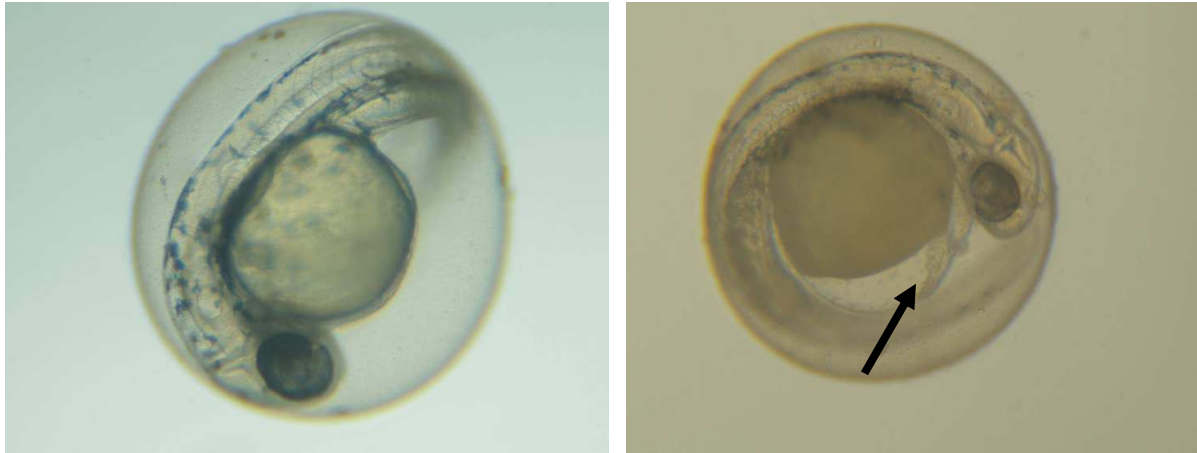


Abbildung 5: Embryonen des Zebrafischlings nach Exposition mit TMDD (2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol) (48h): Links Negativkontrolle, rechts belasteter Embryo mit Ödem, Kreislaufstörung und verminderte Pigmentierung.

6. Stand der Arbeit

Es wurden zwischen Ende 2010 und Ende 2011 drei Probenahmen durchgeführt:

Anfang November 2010 wurden an allen vier Standorten Wasser- und Sedimentproben gesammelt und physiko-chemische Wasserparameter gemessen. Es erfolgte ebenfalls die Entnahme von Flohkrebse. Die Elektrofischung war in der Jahreszeit aufgrund von Besatzmassnahmen im Neckar nicht mehr möglich. Die Analyse von Wasser- und Sedimentproben, sowie die Untersuchungen von Stressproteinen und Histologie bei Flohkrebse wurde bereits ausgeführt.

Anfang Mai 2011 wurde die zweite Probenahme durchgeführt. Dabei wurden Wasser- und Sedimentproben gesammelt, physikalische und chemische Wasserparameter gemessen, und Flohkrebse gesammelt. Mit Hilfe des Kreisfischervereins Tübingen wurden Döbel gefischt. Die Fangzahlen waren aus unbekannten Gründen ziemlich gering: unterhalb der Kläranlage (PS1) und oberhalb des Ammer-Einlaufs (PS3) wurden keine Fische gefangen, unterhalb des Ammer-Einlaufs (PS2) nur eine Döbel, in Hirschau (PS4) wurden sieben Döbel gefangen. Bei der zweiten Probestelle erwies sich die Wassertiefe zu hoch zum Elektrofischen und Sedimententnahme, aus diesen Gründen wurde dieser Neckarabschnitt aus dem weiteren Monitoring gestrichen. Die Untersuchung von Wasser- und

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

Sedimentproben, sowie die gentoxische-, histologische- und Stressprotein-Analyse der Fische wurde durchgeführt.

Anfang September 2011 wurden im Rahmen der dritten Probenahme ebenfalls Wasser- und Sedimentproben gesammelt, physikalische und chemische Wasserparameter gemessen und Flohkrebse gesammelt. Wegen der Wetterbedingungen wurden noch Ende Juli mittels Elektrofischung durch den Kreisfischereiverein Tübingen Döbel gefangen. Die Fangzahlen waren diesmal etwas besser: unterhalb der Kläranlage (PS1) wurden erneut keine Fische gefangen, oberhalb des Ammer-Einlaufs (PS3) drei, in Hirschau (PS4) wurden zwölf Döbel gefangen. Es wurden bis zur Berichtserstellung die Untersuchung der Wasser- und Sedimentproben sowie die gentoxischen-, histologischen- und Stressprotein-Analysen bei den Fischen durchgeführt.

Die Analyse der Gammarus-Histologie und des Stressproteingehaltes der zweiten und dritten Probenahme befindet sich in der Bearbeitungsphase. Die Untersuchung von Wasser- und Sedimentproben durch den Early Life Stage Test mit dem Zebrafisch wurde von der Bachelorstudentin Katharina Graf in Kooperation mit der Antragstellerin durchgeführt.

Tabelle 1: Stand der Arbeit

Probenahme	November 2010	Mai 2011	September 2011
Limnologie	ausgeführt	ausgeführt	ausgeführt
Early Life Stage Test	ausgeführt	ausgeführt	ausgeführt
Gammarus Histologie	ausgeführt	in Bearbeitung	in Bearbeitung
Gammarus Hsp70	ausgeführt	in Bearbeitung	in Bearbeitung
Döbel Histologie	-	ausgeführt	ausgeführt
Döbel Hsp70	-	ausgeführt	ausgeführt
Döbel Mikrokern Test	-	ausgeführt	ausgeführt
Döbel Komet Assay	-	ausgeführt	ausgeführt

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

7. Ergebnisse

7.1. Physikalische und chemische Wasserparameter

Die Werte der limnologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 2-5. dargestellt:

Tabelle 2: Ergebnisse der limnologischen Messungen vom November 2010.

November 2010	Probestelle 1	Probestelle 2	Probestelle 3	Probestelle 4
Wassertemperatur	11,1°C	11,3°C	10,3°C	9,7°C
Lufttemperatur	16,7°C	21,2°C	18,1°C	18,2°C
O₂ [mg/l]	10,975	11,65	12,2	12,08
O₂ [%]	90,7	103,6	108,7	109,5
Leitfähigkeit [µS/cm]	1000,5	900	900	901
pH	7,96	8,43	8,5	8,25
Nitrit [mg/l]	0,18	0,19	0,05	0,04
Nitrat [mg/l]	26	22	21	26
Ammonium [mg/l]	0,18	0,35	0,16	0,01
Chlorid [mg/l]	75,09	53,75	52,74	51,83
Ortho-Phosphat [mg/l]	0,66	0,35	0,41	0,4
Gesamthärte [°dH]	33	34	33	30
Karbonhärte [°dH]	21	24	22	18

Tabelle 3: Ergebnisse der limnologischen Messungen vom Mai 2011. Die Leitfähigkeit konnte wegen Fehlern des Messgerätes nicht bestimmt werden.

Mai 2011	Probestelle 1	Probestelle 2	Probestelle 3	Probestelle 4
Wassertemperatur	13,5°C	14°C	13,3°C	14,4°C
Lufttemperatur	8,9°C	9,9°C	11,7°C	11,6°C
O₂ [mg/l]	9,5	9,3	11,7	11,6
O₂ [%]	96	95	106	123
Leitfähigkeit [µS/cm]	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
pH	8,12	8,23	8,21	8,39
Nitrit [mg/l]	0,11	0,14	0,14	0,12
Nitrat [mg/l]	5,6	2,9	2,1	5,3
Ammonium [mg/l]	0,01	0,04	0,04	0,01
Chlorid [mg/l]	88,75	50,97	54,81	58,02
Ortho-Phosphat [mg/l]	0,7	1,97	2,28	3,4
Gesamthärte [°dH]	29	29	30	30
Karbonhärte [°dH]	17	16	16	16

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

Tabelle 4: Ergebnisse der limnologischen Messungen vom September 2011.

September 2011	Probestelle 1	Probestelle 3	Probestelle 4
Wassertemperatur	17,2°C	17,9°C	18,2°C
Lufttemperatur	15,3°C	18,7°C	19,9°C
O ₂ [mg/l]	7,83	9,22	9,38
O ₂ [%]	83,2	99,1	99
Leitfähigkeit [µS/cm]	901	930	904
pH	8,05	8,34	8,39
Nitrit [mg/l]	0,04	0,05	0,05
Nitrat [mg/l]	4,2	3,3	3,0
Ammonium [mg/l]	0,18	0,17	0,17
Chlorid [mg/l]	58	60	50
Ortho-Phosphat [mg/l]	0,17	0,25	0,14
Gesamthärte [°dH]	26	27	28
Karbonhärte [°dH]	13	14	16

Die gemessenen Werte liegen, verglichen mit der Trinkwasserverordnung von 2011 (DVGW, 2011) zu allen drei Zeitpunkten im normalen Bereich. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen den einzelnen Probestellen.

7.2. Early Life Stage Test (ELS) mit dem Zebrafisch

Die Neckarproben wurden in zwei Replikaten getestet. Bei jedem Test wurden pro Probestelle Wasser und Sediment zusammen in je fünf Glaspetrischalen verteilt. In die Schalen wurden fünf frisch befruchtete Zebrafischseier gegeben, die während der Ontogenese beobachtet wurden. Die Mortalität und Fehlbildungsraten wurden aufgenommen und in SAS JMP 9. mittels des Wilcoxon-Tests statistisch analysiert. Die Signifikanzlevel wurden nach Bonferroni korrigiert. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Probestellen und der Kontrolle sind in den Abbildungen durch Sterne markiert.

7.2.1. Probenahme im November 2010

Die Wasser- und Sedimentproben aus dem Neckar haben vielfältige Effekte während der Entwicklung der Zebrafischembryonen hervorgerufen (Abb. 6). Während der ersten 72 Stunden der Ontogenese hatten die Fische bei allen Probestellen Entwicklungsdefizite wie eine niedrigere Herzschlagfrequenz, Ödeme, schwächere Pigmentierung sowie Schwanz- und Augendeformationen. Nach 72 Stunden traten Erholungseffekte auf, die Fehlbildungen wurden auf unter 20% reduziert. Die stärksten Effekte traten bei der ersten und dritten Probestelle auf. Es ergaben sich

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

auch bei der Mortalität Unterschiede (Abb. 7) im Vergleich zur Kontrolle. Hier koagulierte die meisten Eier bei Exposition gegenüber Proben der ersten und dritten Probestelle. Nach dem Schlupf (72-96h) stieg der Anteil der gestorbenen Tiere. Dies kann durch die Permeabilität der Eihülle erklärt werden, große Moleküle kommen in der Regel nicht durch die Poren der Eihülle. Nach dem Schlupf werden die Larven auch gegenüber diesen exponiert.

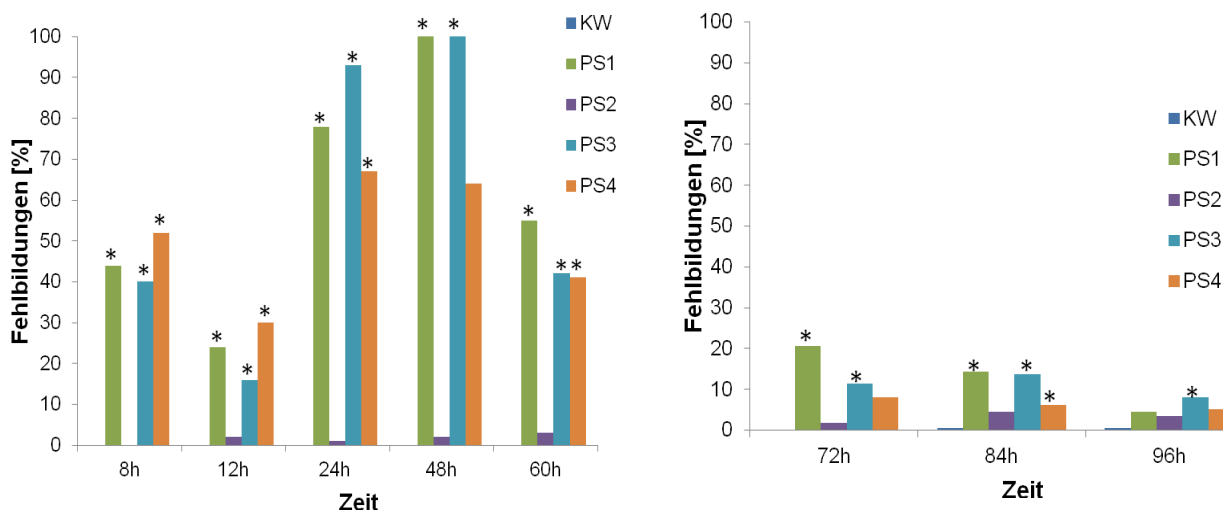


Abbildung 6: Fehlbildungen im ELS-Test bei Proben vom November 2010.

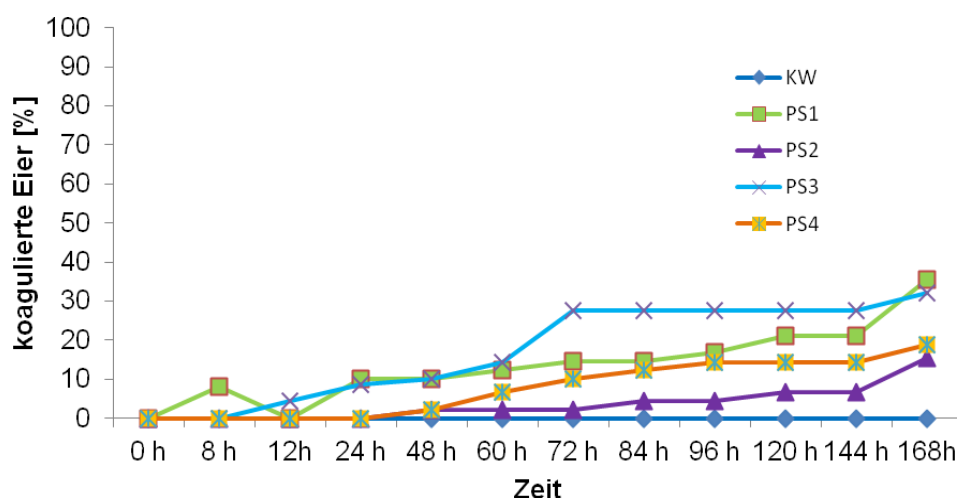


Abbildung 7: Anzahl der koagulierten Eier in % der eingesetzten Eier. Proben vom November 2010.

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

7.2.2. Probenahme im Mai 2011

Im Fall der Maiprobe traten bei der ersten und vierten Probestelle Fehlbildungen wie niedrigere Herzschlagfrequenz, Ödeme, schwächere Pigmentierung, Schwanz- und Augendeformationen auf (Abb. 8). Die Embryonen haben sich jedoch nach 72 Stunden normal weiterentwickelt, die Fehlbildungsrate lag unter 10%. Über die höchsten Mortalitätsraten verfügen ebenfalls die Probestellen eins und vier.

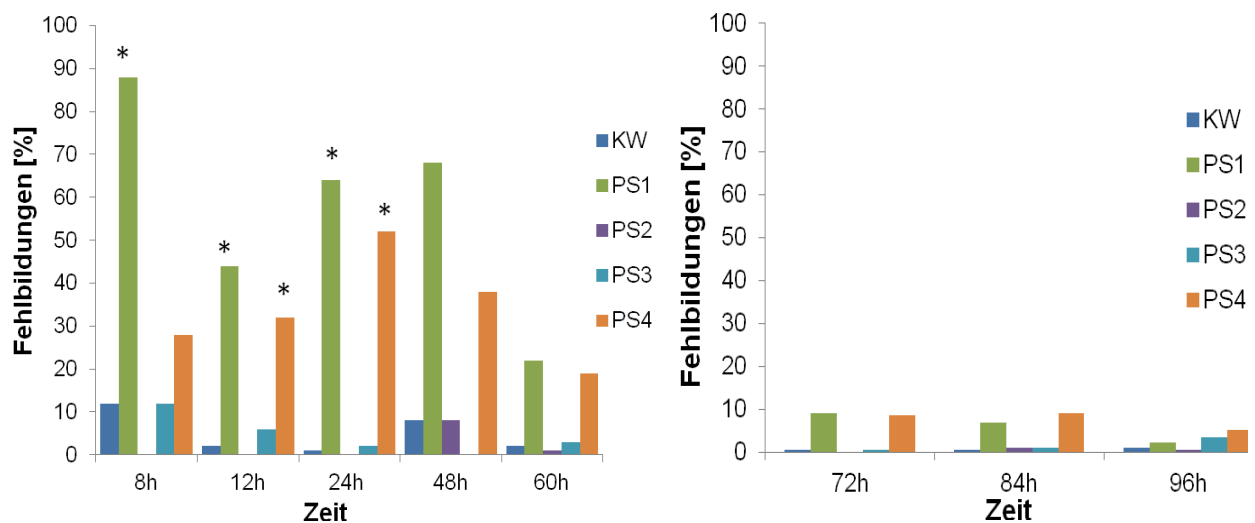


Abbildung 8: Fehlbildungen im ELS-Test mit Proben vom Mai 2011.

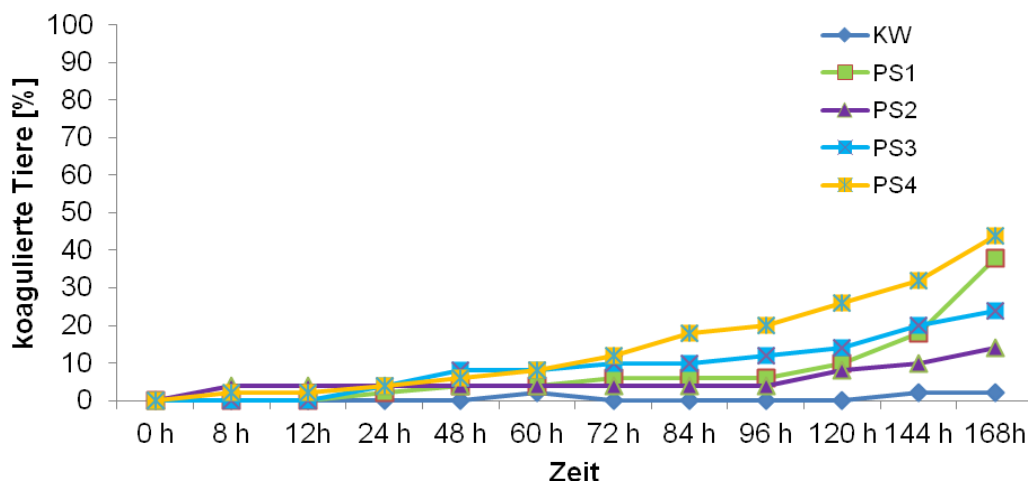


Abbildung 9: Anzahl der koagulierten Eier in % der eingesetzten. Proben vom Mai 2011.

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

7.2.3. Probenahme im September 2011

Bei dieser Probenahme waren vor allem bei der vierten Probestelle deutliche Effekte zu beobachten (Abb. 10). Die Wasser- und Sedimentproben verursachten Ödeme, schwache Pigmentierung, Entwicklungszögerungen und eine erhöhte Mortalitätsrate (Abb. 11) im Vergleich zur Kontrolle. Die anderen Proben der Probenahme führten zu keinen signifikanten Effekten. Eine interessante Frage ist, woher das saisonal wechselnde toxische Potenzial der vierten Stelle stammt. Eine Möglichkeit ist, dass es mit landwirtschaftlichen Maßnahmen zusammenhängt, da sich neben diesem Neckarabschnitt Getreidefelder befinden.

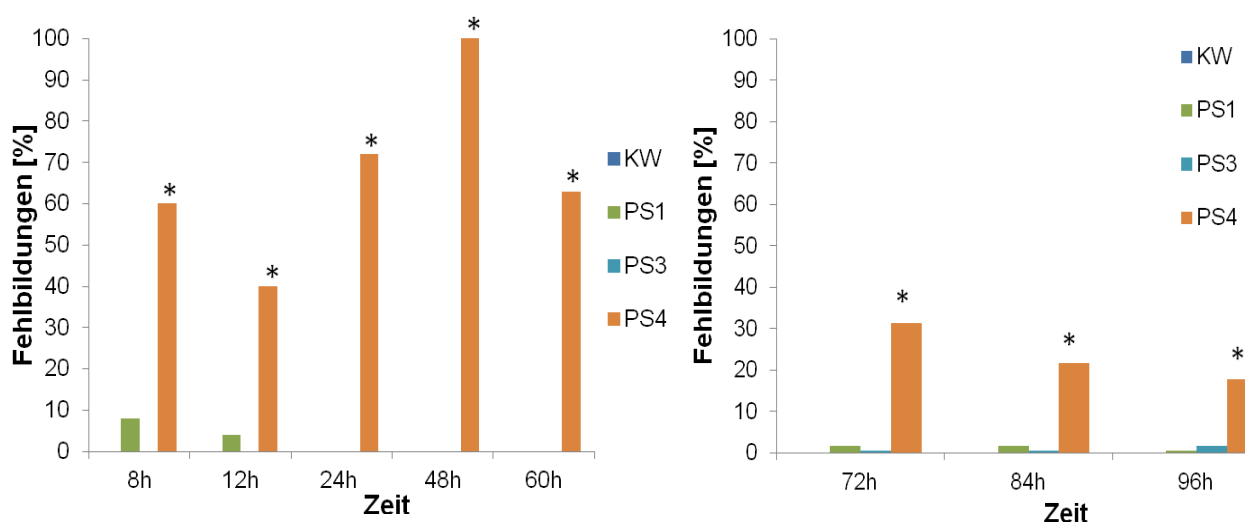


Abbildung 10: Fehlbildungen im ELS-Test bei Proben vom September 2011.

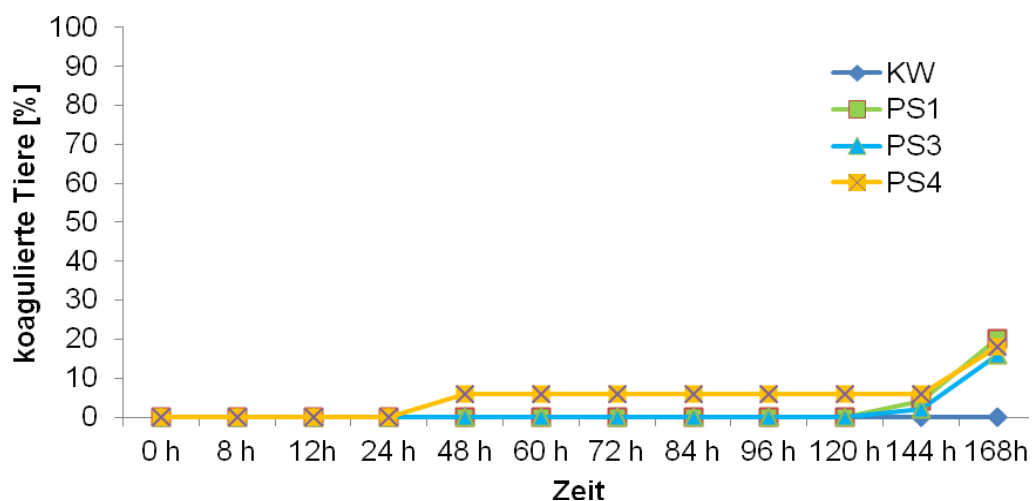


Abbildung 11: Anzahl der koagulierten Eier in % der eingesetzten. Proben vom September 2011.

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

7.3. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen bei Flohkrebse

Es wurden an allen Probestellen zusätzlich zu den Tieren für die Histologie fünfzig Flohkrebse gesammelt, um die Artzusammensetzung in den Neckarabschnitten zu beurteilen. Dabei stellte sich heraus, dass bei den ersten drei Probestellen überwiegend der Flussflohkrebs (*Gammarus roeseli*) (Abb. 12) und bei der vierten Probestelle ausschließlich der Gemeine Flohkrebs (*Gammarus pulex*) vorkommt. Für die histologische Analyse wurden jeweils 20 Tiere pro Stelle bearbeitet und ausgewertet. Dabei wurde bei allen Tieren die Länge gemessen, die Art und das Geschlecht bestimmt und weiterhin makroskopisch nach einer eventuellen Parasitierung geschaut. Es wurden an allen Probestellen mit Kratzern (*Acanthocephala*) parasitierte Tiere gefunden. Diese sogar makroskopisch erkennbaren Organismen nutzen Gammariden als Zwischenwirt und entwickeln sich in deren Leibeshöhle (Abb. 13) (Lucius & Loos-Frank, 2008). Der Parasitenbefall bedeutet eine erhebliche Belastung für den Wirt, daher war der Zustand solcher Flohkrebse generell schlecht.



Abbildung 12: Aufnahme eines fixierten Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*).



Abbildung 13: *Gammarus roeseli* parasitiert mit zwei *Acanthocephalen* (Pfeile). Gefärbt mit Richardson-Blau.

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

Bei der Bestimmung des Gesundheitszustandes wurden die generelle Gewebeorganisation sowie Mitteldarmdrüse, Mitteldarm und Anhänge, und die Gonade untersucht. Es wurde großer Wert auf die Mitteldarmdrüse als wichtiges Entgiftungsorgan bei Flohkrebse und auf die Gonade gelegt, die Rückschlüsse über endokrine Wirkungen geben können (Schirling, 2005). Die beobachteten Organe wurden auf einer fünf- (1: sehr gut, 5: sehr schlecht), bzw. bei der weiblichen Gonade sechsstufigen (Reifezustand der Eier) Skala bewertet. Die Daten wurden in SAS JMP 9. mittels des Wilcoxon-Tests statistisch analysiert. Die Signifikanzlevel wurden nach Bonferroni korrigiert. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Bewertungen der einzelnen Probestellen sind in den Abbildungen durch Sterne markiert.

7.3.1. Histologische Untersuchung der Mitteldarmdrüse bei Gammarus sp.

In der Mitteldarmdrüse waren z.T. starke Effekte zu erkennen (Abb. 14). Dieses Organ verfügt über zwei Blindsäcke und wird von vier verschiedenen Zelltypen (Blasen- (B), Resorptions- (R), Fibrillöse- (F) und Embryonale (E) -Zellen) aufgebaut (Correia et al., 2002). Durch Belastung zeigte sich verstärkte Vakuolisierung und Ablösung des Mikrovillisaumes der B- R- und F-Zellen, deformierte Zellkerne und teilweise Karyolyse bei allen Zelltypen, weiterhin waren Ablösungen der Zellen von der Basallamina zu beobachten (Abb.15). Im Mitteldarm und seinen Anhängen traten ebenfalls ähnliche Effekte auf, wobei diese nicht so deutlich waren, wie in der Mitteldarmdrüse.

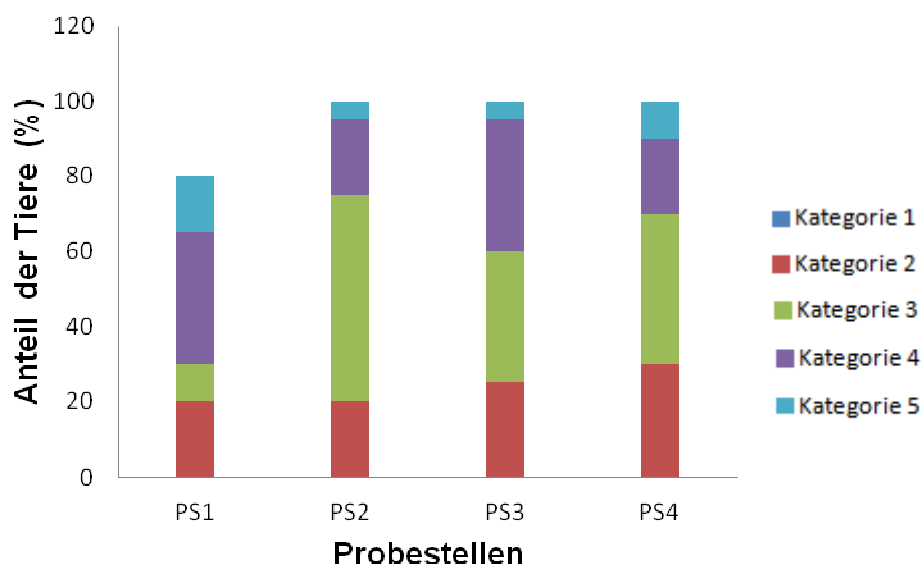


Abbildung 14: Bewertung der Mitteldarmdrüse von Gammariden. Probenahme im November 2010.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

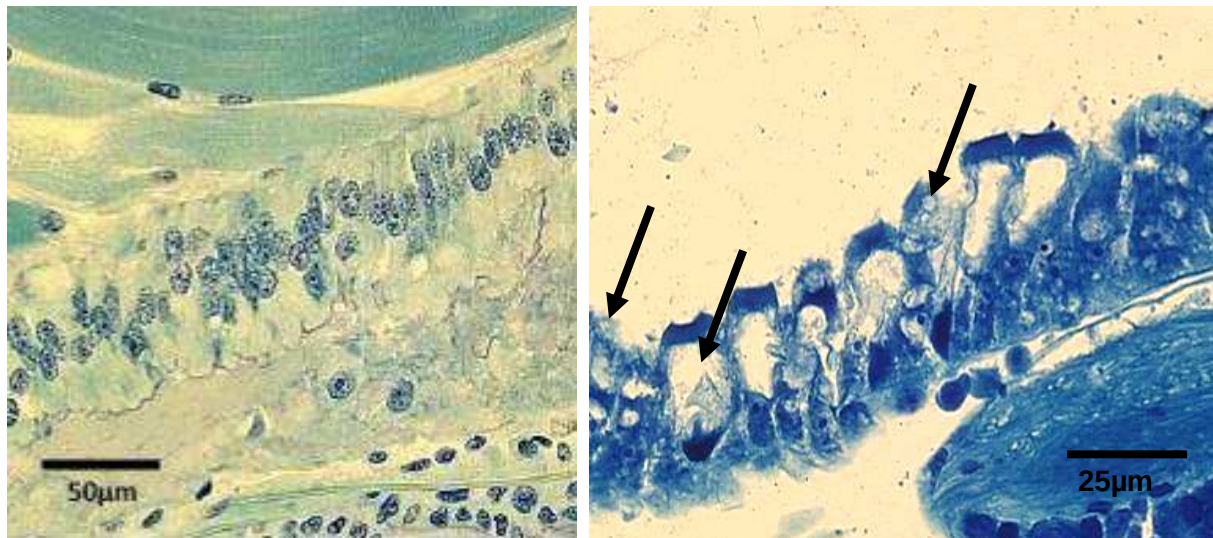


Abbildung 15: Unbeschädigte (links) (Photo: Johnas Geburzi) und beschädigte (rechts) Mitteldarmdrüse von *Gammarus roeseli*. Auf dem rechten Bild ist eine Hypertrophie von B-Zellen, Nekrose und Ablösungen des Mikrovillisaumes zu beobachten (Pfeile).

7.3.2. Histologische Untersuchung der weiblichen Gonade bei *Gammarus* sp.

Als wichtigen Monitororgane dienen auch die Gonaden. Die Gonaden befinden sich an der dorsalen Seite entlang des Körpers und sind meist gut erkennbar. Das weibliche Geschlechtsorgan der Gammariden eignet sich besonders zum Nachweis von Schadstoffbelastungen und endokrinen Wirkungen (Schirling, 2005). Man kann sechs Reifestadien der Oozyten unterscheiden: Vorvitellogenes-, Frühvitellogenes-, Spätvitellogenes-, Reifes-, Ruhe- und Intermediäres Stadium. Im Fall der untersuchten Probestellen kamen überwiegend Früh- oder Vorvitellogene Stadien und atretische (in Resorption befindliche) Oocyten vor (Abb. 16). Nach statistischer Analyse ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der ersten und dritten, weiterhin zwischen der ersten und vierten Probestelle. Die erste Probestelle (unterhalb der Kläranlage) wies die höchste Zahl vorvitellogener Eier auf. Atretische Oocyten kamen bei den Probestellen kaum vor. Die meisten Ovarien wiesen vorvitellogene und frühvitellogene Eier auf, was sich durch das Ende der Paarungszeit gut erklären lässt. Endokrine Effekte wurden bei keiner Probestelle detektiert.

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

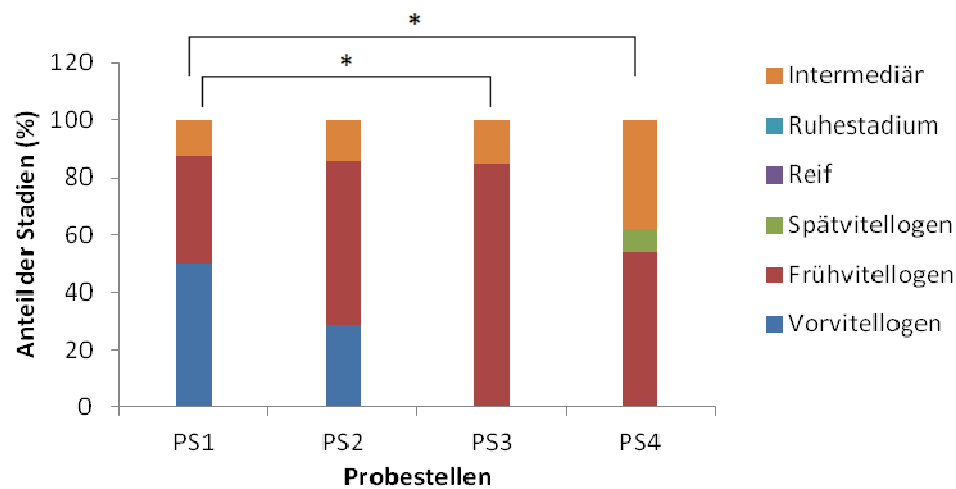


Abbildung 16: Bewertung der weiblichen Gonade von *Gammarus sp.* Proben vom November 2010.

7.4. Analyse des Stressproteins Hsp70 bei *Gammarus sp.*

Es wurden an allen Probestellen 20 Flohkrebse für Stressproteinanalysen gesammelt und untersucht. Während der Analyse stellte sich heraus, dass Hsp70 bei Gammariden relativ instabil ist und leicht zerbricht, was die Antikörpermarkierung schwierig macht. Aus diesem Grund sind die Endzahlen für die statistische Analyse niedriger als geplant (n=10-15). Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurden sie nichtparametrisch in SAS JMP 9. mittels Wilcoxon's Mehrfachvergleich getestet (Abb. 17). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Probestellen. Ein Grund dafür könnte der durchgehend hohen Parasitierungsgrad der Tiere sein, welcher durch die starke Belastung einen Einfluss auf die Stressproteinlevel haben kann (Sures, 2008).

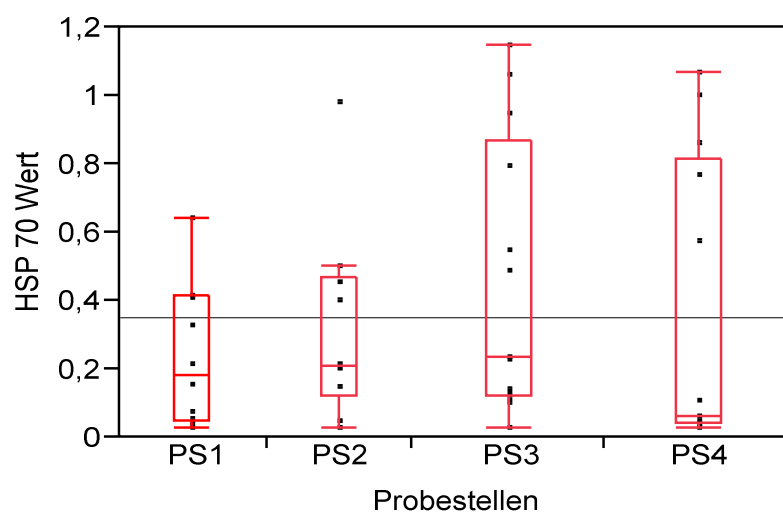


Abbildung 17: Ergebnisse der Hsp70 Analyse bei *Gammarus sp.*. Proben vom November 2010.

7.5. Gentoxizitätsuntersuchungen bei Döbeln

7.5.1. Mikrokern-Test mit Erythrozyten

Bei der Auswertung der Blutaufstriche wurden jeweils tausend Zellen pro Objektträger auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht. Die prozentuale Anzahl der Mikrokerne bei der Probestellen der zweite und dritte Probenahme ist auf Abbildung 18 dargestellt. Da bei den ersten drei Probestellen die Endzahlen für eine statistische Bewertung nicht ausreichen, entfällt diese. Die Ergebnisse zeigen bei allen Probestellen eine relativ geringe Mikrokernanzahl (0-2%) in den Blutproben. Als eine Referenz dient die Publikation von Al-Sabti & Metclafe (1994), dort liegen die Kontrollwerte für Fische zwischen 0 und 3 Prozent. Daher kann man davon ausgehen, dass die Probestellen am Neckar keine solche hohen toxischen Potenziale haben, dass sie die Zellteilung bei Fischen nachhaltig stören.

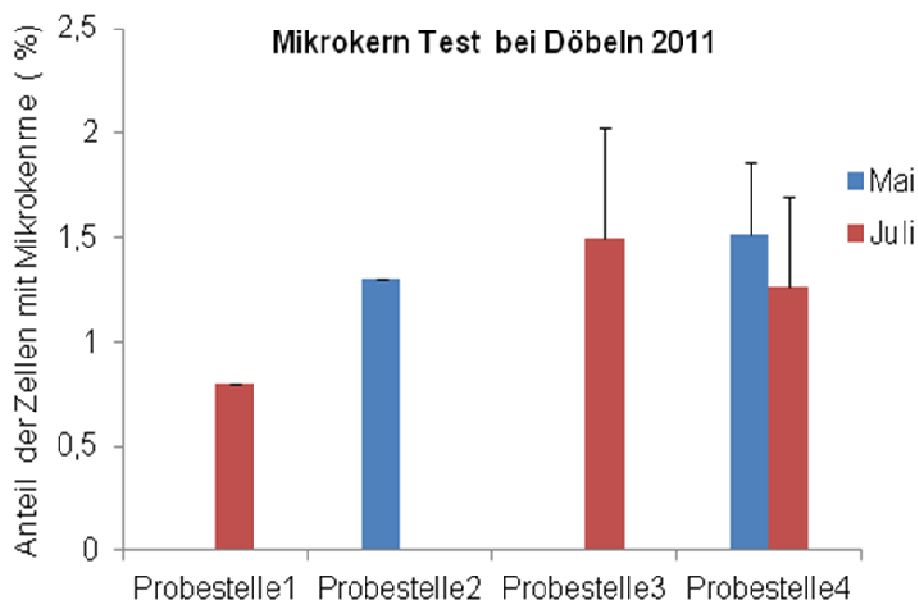


Abbildung 18: Anteil der Zellen mit Mikrokernen bei Döbeln aus dem Neckar. Probenahmen Mai und Juli 2011.

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

7.5.2. Komet-Assay mit Fischgeweben

Es wurden bis zur Berichtserstellung die Döbelproben der Probenahme vom Mai und Juli 2011 analysiert. Die Auswertung erfolgte an der Universität Heidelberg in Kooperation mit der Abteilung Aquatische Ökologie und Toxikologie. Mit Hilfe einer spezieller Software (Kinetic 5.5) wurden bei hundert Zellen pro Objektträger verschiedene DNA-Schädigungsparameter gemessen. Eine wichtige davon ist der sogenannte "Tail Moment", welcher die Länge und Intensität des Kometen-Schweifes charakterisiert. Eine weitere ist die "Head DNA", die der nach der Elektrophorese im Zellkern erhaltenen DNA entspricht. Da nur für die vierte Probestelle eine genügend große Probenanzahl vorlag, wurde nur diese statistisch analysiert. Dabei wurden die Daten der verschiedenen Organe in JMP 9. mittels Wilcoxon-Test miteinander verglichen. Die weibliche Gonade wurden nicht analysiert, da die Oozyten im reifen Stadien keine Zellkernmembran und keine kompakte DNA besitzen (Takashima & Hibiya, 1995). Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der DNA-Stabilität der Organe, sowohl hinsichtlich der Head-DNA, als auch beim Tail Moment. Eine starke Schädigung war im Mai und Juli 2011 bei der Hoden zu beobachten (Abb. 19). Die Zellen der männlichen Geschlechtsorgane verfügen einen großen Kometen-Schweif, während die Zellen von Kieme, Niere und Leber relativ unbeschädigt sind und kompakte Zellkerne besitzen. Dieser Unterschied kann wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Zellteilungsmechanismus erklärt werden. Bei der männlichen Gonade entstehen die Spermien durch Meiose der Spermatocyten. Bei den andern Organe teilen sich die Zellen durch Mitose. Die statistische Analyse zeigte auch Unterschiede bei den Effekten auf Kieme, Leber und Niere (Abb. 20-21, Tab. 5-6).

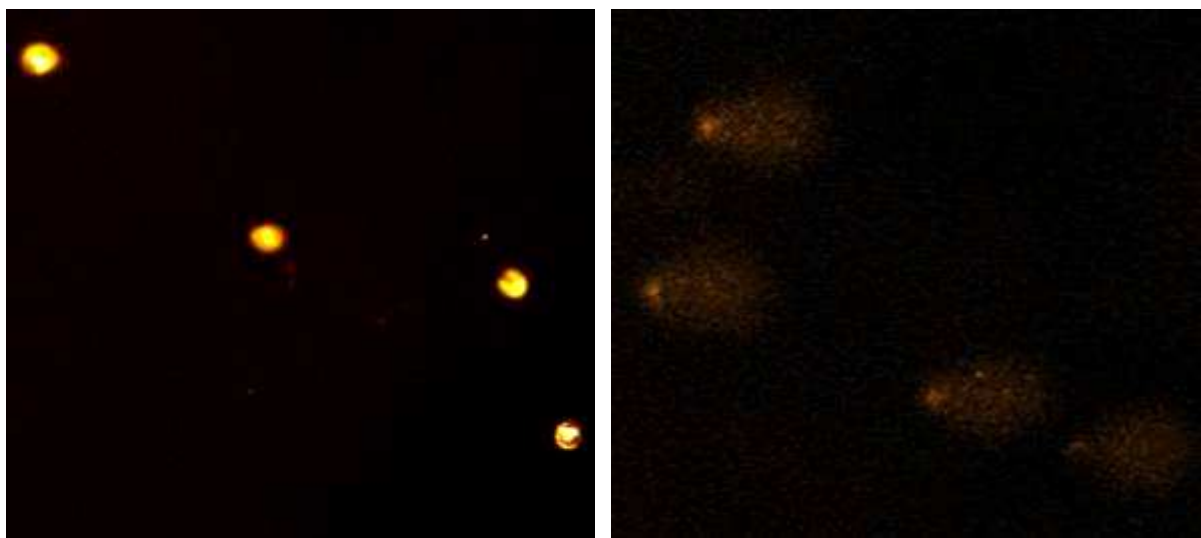


Abbildung 19: Unbeschädigte Zellen der Niere (links) und Spermien mit Kometen-Schweif (rechts) von Döbeln der vierten Probestelle der zweite Probenahme (Mai 2011).

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

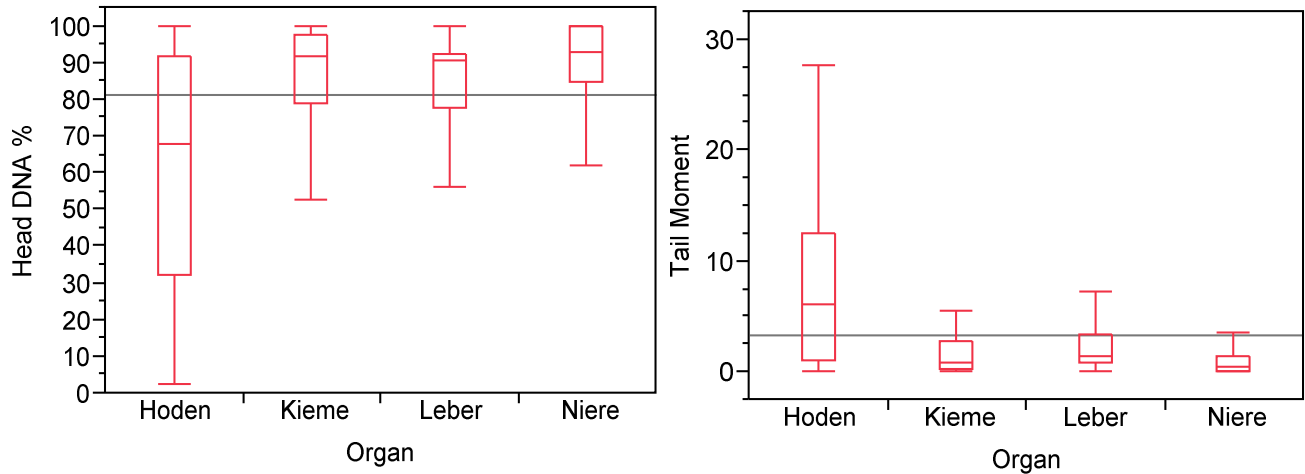


Abbildung 20: DNA- Schädigungen in vier verschiedenen Organe bei Döbeln der vierten Probestelle (Mai 2011).

Tabelle 5: Signifikante Unterschiede beim Komet-Assay zwischen den Organen der Döbel der vierten Probestelle (Mai 2011).

Level	- Level	p-Value Head DNA	p-Value Tail Moment
Niere	Hoden	<,0001*	<,0001*
Kieme	Hoden	<,0001*	<,0001*
Leber	Hoden	<,0001*	<,0001*
Niere	Leber	<,0001*	<,0001*
Niere	Kieme	0,2418	<,0001*
Leber	Kieme	0,0024*	<,0001*

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

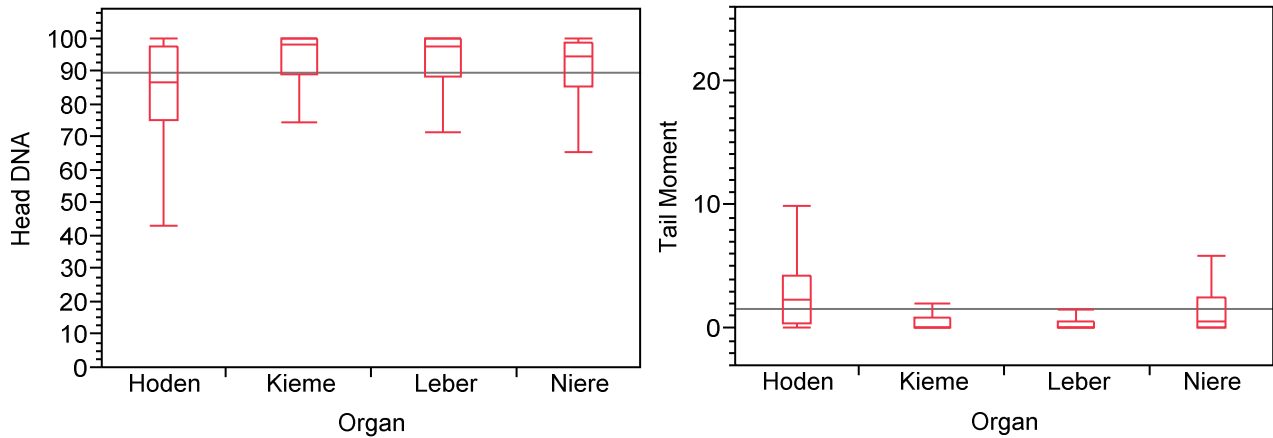


Abbildung 21: DNA- Schädigungen in vier verschiedenen Organe bei Döbeln der vierten Probestelle (Juli 2011).

Tabelle 6: Signifikante Unterschiede beim Komet-Assay zwischen den Organen der Döbel der vierten Probestelle (Juli 2011).

Level	- Level	p-Value Head DNA	p-Value Tail Moment
Niere	Hoden	<,0001*	<,0001*
Kieme	Hoden	<,0001*	<,0001*
Leber	Hoden	<,0001*	<,0001*
Niere	Leber	<,0001*	<,0001*
Niere	Kieme	<,0001*	<,0001*
Leber	Kieme	0,3726	0,2254

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

7.6. Histologische Untersuchung der Döbel

Alle gefangenen Fische wurden gemessen und gewogen. Nach Anästhesie und Tötung wurden Kieme, Leber, Niere und Gonade herauspräpariert. Während des Präparierens wurde bei beiden Probenahmen eine hohe Parasitierungsrate der Döbel festgestellt. Alle entnommenen Fische waren mit Kratzern (*Acanthocephala* sp.) infiziert (Abb. 22.). Diese Parasiten werden von den Fischen durch die Nahrung (Wirbellose) aufgenommen. In dem Körper des Endwirtes leben sie hauptsächlich im Verdauungssystem und nehmen durch ihr Synzytium Nährstoffe auf (Lucius & Loos-Frank, 2008). In den Organen der Freilandfische wurden diverse histopathologische Effekte beobachtet. Die Bewertung des Gesundheitszustandes erfolgte durch eine fünfstufige Skala bei Kieme, Leber und Niere, wo die Kategorie 1 den Kontrollzustand, der Kategorie 5 Destruktionszustand entsprach. Bei der Gonade wurde eine dreistufige Skala verwendet, wobei die Kategorie 1 unreifen, Kategorie 3 reife Geschlechtsorgane bedeuteten. Da wegen der kleinen Probenanzahl keine befriedigende statistische Analyse ausgeführt werden kann, entfällt diese.

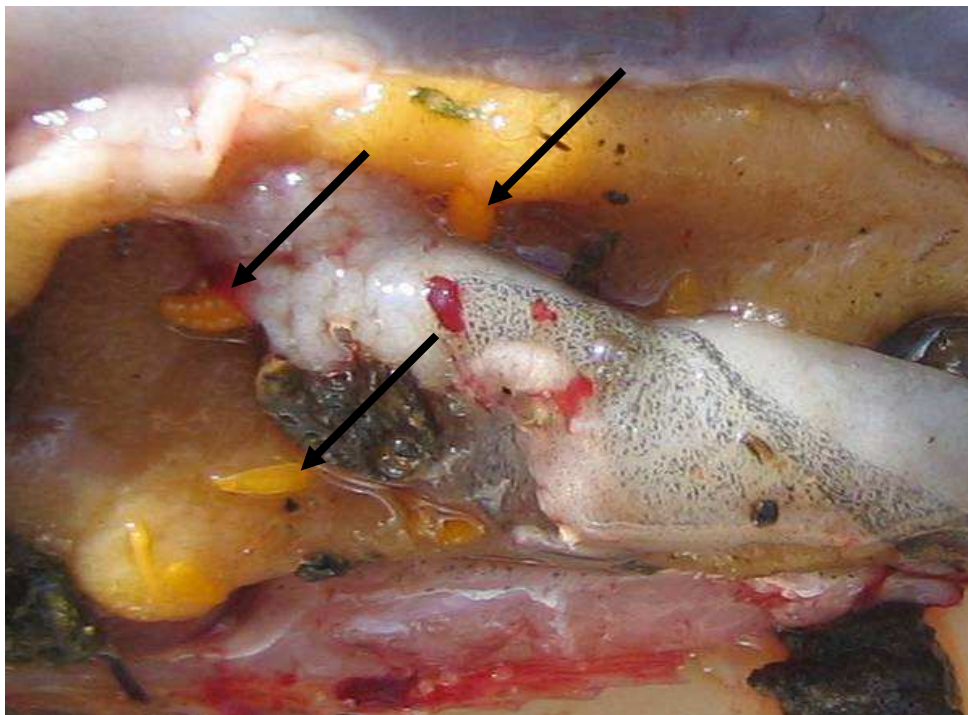


Abbildung 22: Kratzer im Magen eines Döbels (Pfeile).

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

7.6.1 Histopathologische Untersuchungen der Kieme

Der Kieme von Fische ist ein besonders empfindliches Monitororgan. Es wird von Primär und Sekundärlamellen aufgebaut, die Sekundärlamelle besteht aus Pflaster-, Pfeiler-, Chlorid- (an der Basis der Lamelle) und Schleimzellen (Amin et al., 1992). Die gefangenen Döbel weisen starke Effekte in der Kieme auf: Bei allen Probestellen sind Fusionen von Sekundärlamellen, Hyperplasie von Pflasterzellen, Hypertrophie und Hyperplasie von Schleimzellen und teilweise die Nekrose von Chloridzellen zu beobachten. Diese Fische befinden sich daher in einem Reaktions-, bzw. Destruktionsstadium (Abb. 23). Im Mai wiesen die Fische stärkere Schädigungen auf als im Juli. Auf Abb. 24-27. ist der Unterschied zwischen unbelasteten Fischen und Döbeln aus dem Neckar gut zu erkennen.

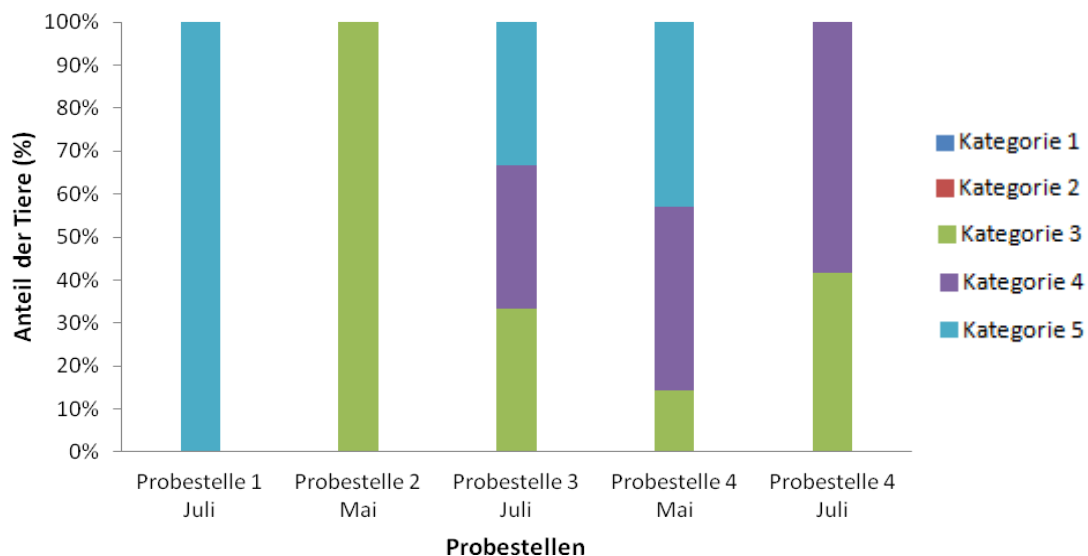


Abbildung 23: Histopathologische Bewertung der Kieme. Probenahme im Mai und Juli 2011.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

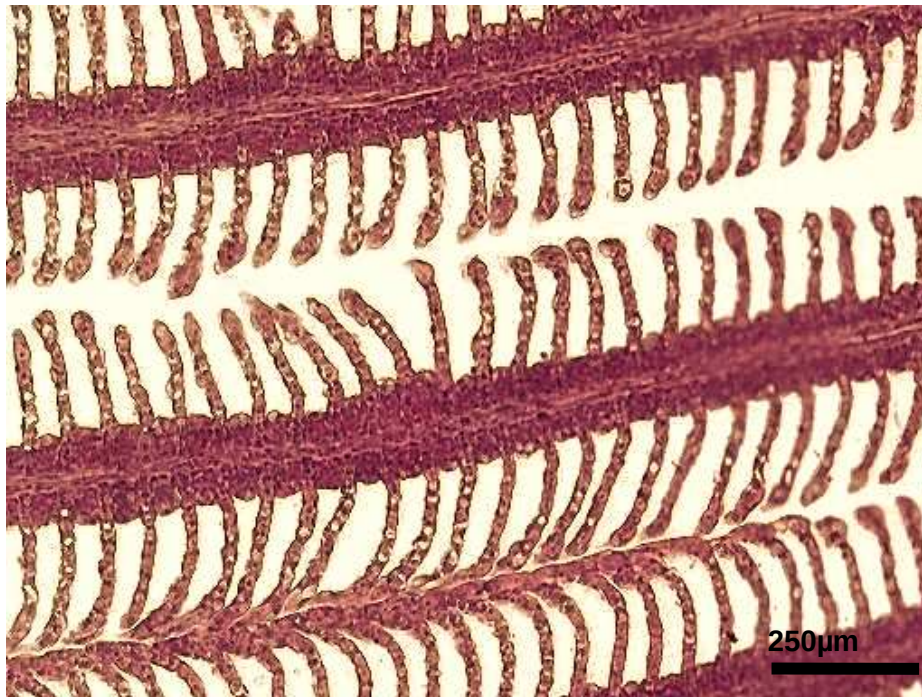


Abbildung 24: Kontrollkieme eines Döbels. Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Herkunft: Argen. (Diana Maier)



Abbildung 25: Kieme eines Döbels aus dem Neckar (PS4, Probenahme Mai 2011). Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Auf dem Bild sind Nekrosen und Epithelzellen-Hyperplasie zu erkennen (Pfeile).

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

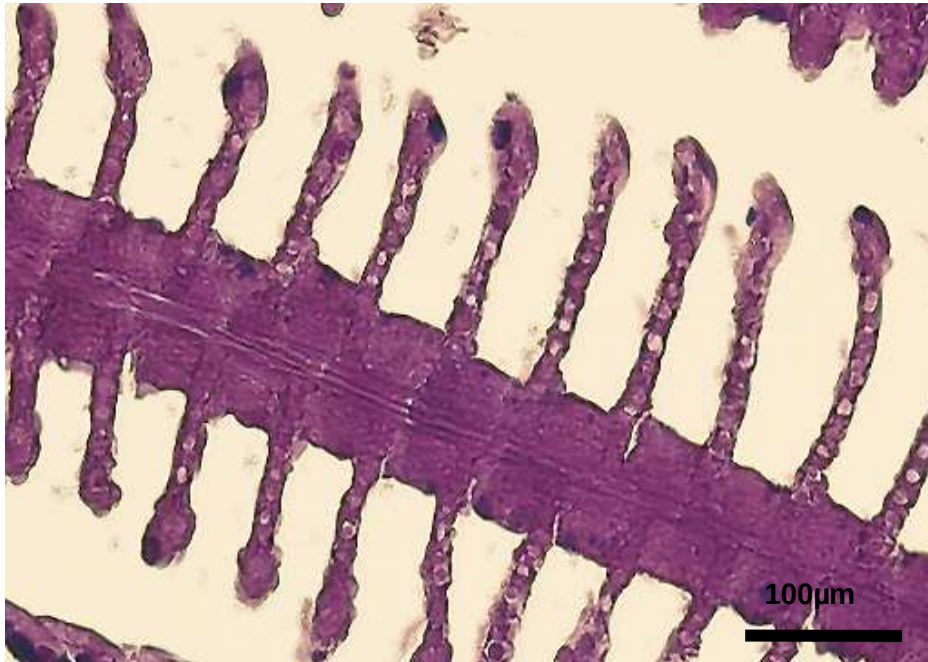


Abbildung 26: Kontrollkieme eines Döbels. Gefärbt mit PAS. Herkunft: Argen. (Diana Maier)

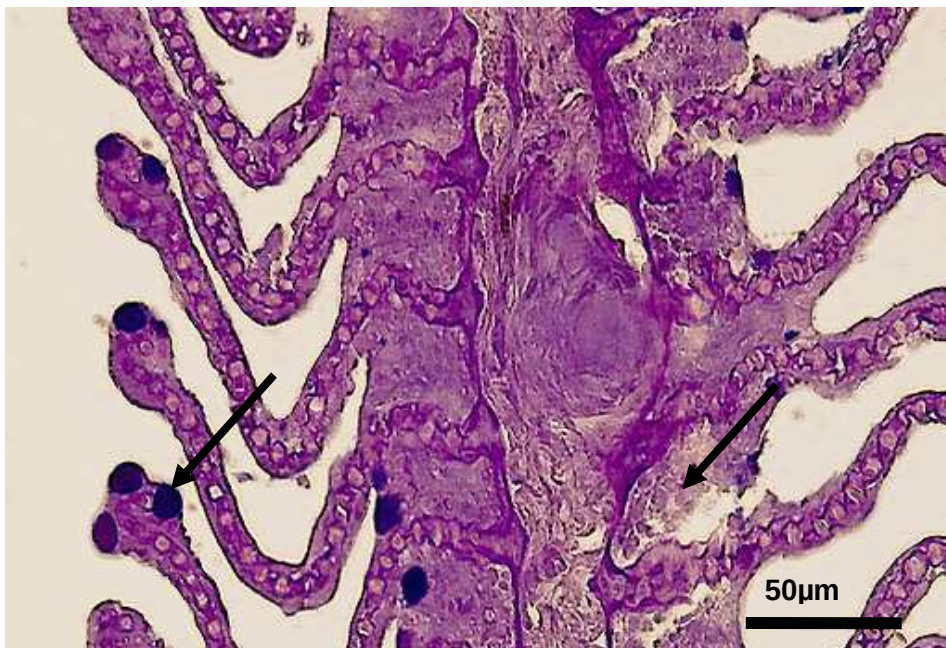


Abbildung 27: Kieme eines Döbels aus dem Neckar (PS4, Probenahme im Mai 2011). Durch die PAS-Färbung sind die Schleimzellen gut zu beobachten. Es sind Schleimzellen-Hyperplasie und Nekrosen zu erkennen (Pfeile).

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

7.6.2 Histopathologische Untersuchungen der Leber

Die Leber ist der zentrale Stoffwechselorgan. Sie verfügt über eine lobuläre Struktur, ihre Bausteine sind die Hepatozyten die sich konzentrisch entlang der Sinusoide (Blutkapillaren) befinden. Die Hepatozyten haben eine wichtige Funktion in der Detoxifikation, dem Protein-, Lipid- und Kohlenhydrat- Metabolismus, Speichern von Energiereserven (Fett und Glykogen) und in der Bildung von Galle (Takashima und Hibiya, 1995). Bei Stresseinflüssen können in der Leber diverse Veränderungen auftreten. Bei aus dem Neckar gefangenen Fischen konnte man deutliche Effekte beobachten (Abb. 28). In den Proben waren häufig Entzündungsherde, Veränderungen des Zellkerns und des Nukleolus, Nekrosen und dilatierte Kapillaren zu beobachten (Abb. 29-30). Durch die PAS-Färbung ist es möglich, den Glykogengehalt gut sichtbar zu machen (Abb 31). Die weiblichen Fische verfügen in der Regel über mehr Fett, während Männchen eher mehr Glykogen speichern. Die Menge der Energiereserven kann auch von der Jahreszeit abhängig sein. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Neckarfische in der Reaktionsphase befinden. Bei der vierten Probestelle wurden die Döbel von Juli etwas schlechter bewertet als im Mai. Deutliche Destruktion war aber bei keinem Fisch zu beobachten.

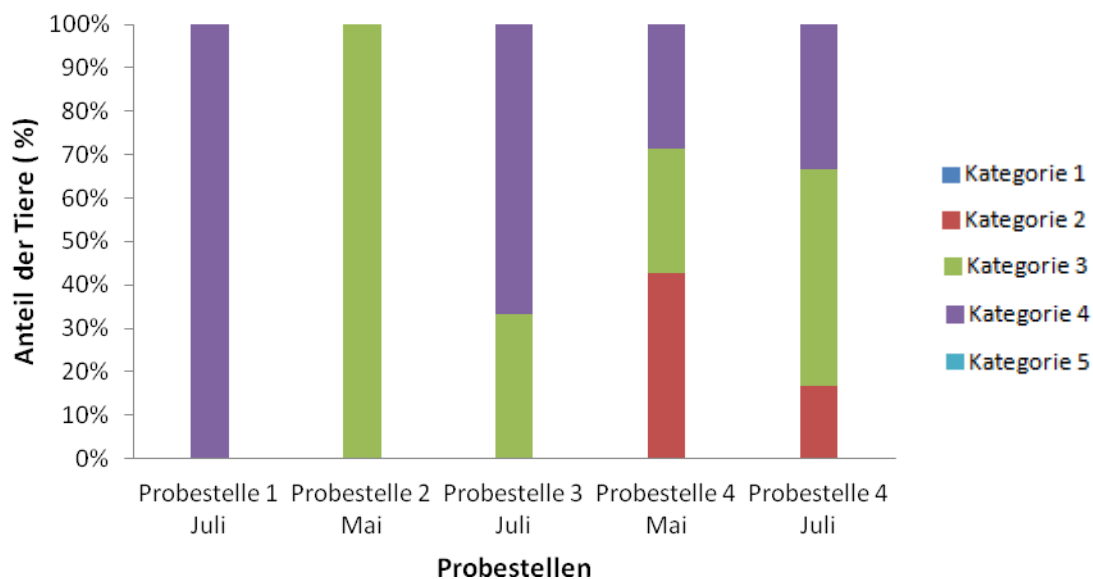


Abbildung 28: Histopathologische Bewertung der Leber. Probenahme im Mai und Juli 2011.

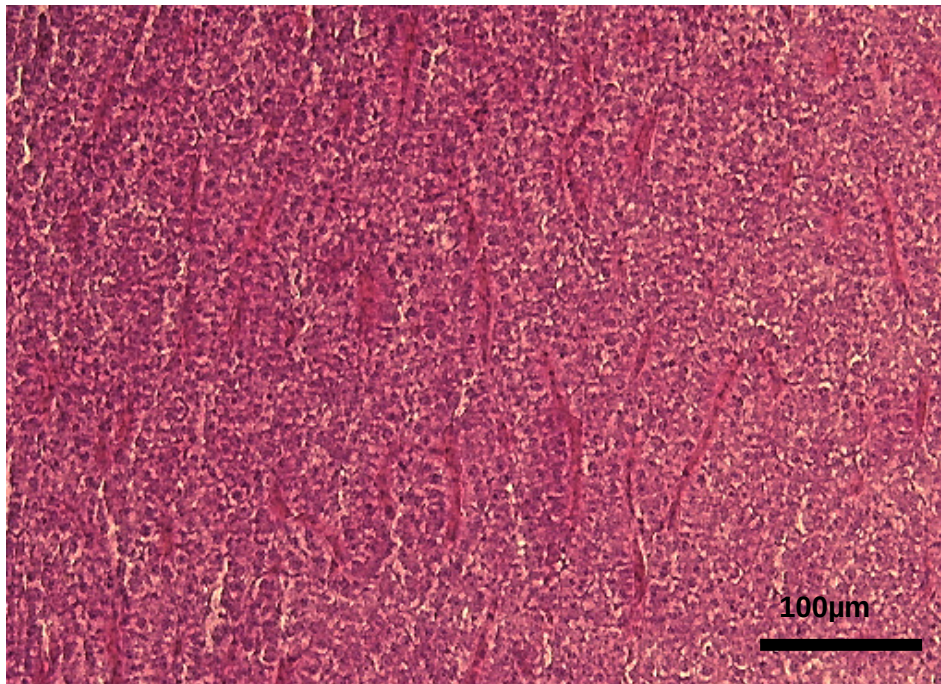


Abbildung 29: Leber eines Kontrolldöbels. Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Herkunft: Argen. (Diana Maier)

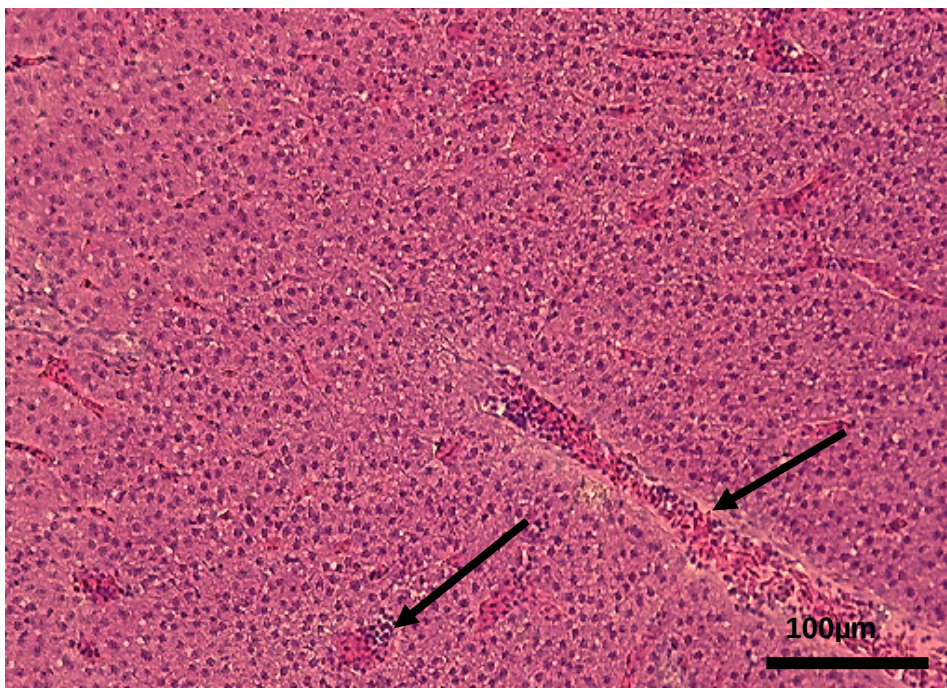


Abbildung 30: Leber eines Döbels aus dem Neckar (PS4, Probenahme im Mai 2011). Auf dem Bild sind dilatierte Kapillaren, Vakuolisierung und Lymphozyten-Aggregation (Entzündungshinweis) zu erkennen (Pfeile).

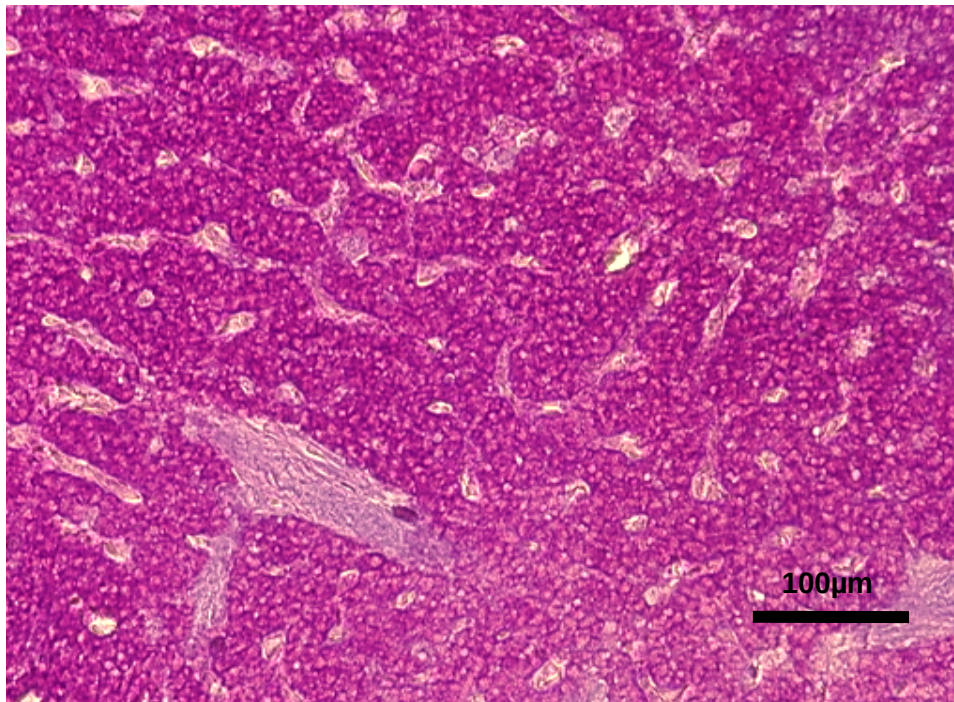


Abbildung 31: Leber eines Döbels aus dem Neckar gefärbt mit PAS. Durch die Färbung wurde der Glykogen-Gehalt der Hepatocyten sichtbar gemacht. PS4, Probenahme von Juli 2011

7.6.3. Histopathologische Untersuchungen der Niere

Die Niere der Fische besteht aus mehrere Gewebetypen: das sogenannte Hämatopoetische Gewebe ist für die Bildung von Blutzellen verantwortlich, während das aus den Nephronen aufgebaute Gewebe für die Ausscheidung sorgt. Die Nephronen sind aus zwei Hauptteilen aufgebaut: in der Bowmann-Kapsel wird das Blutplasma filtriert, im Tubulus (proximal und distal) werden Ionen und Flüssigkeit resorbiert (Takashima & Hibiya, 1995). Die Fischniere reagiert auf Schwermetalle besonders empfindlich, bei Belastung kann es zu Auflösung und Nekrose von Tubulizellen, und zu Dilatierung von Bowmann-Kapseln führen. Im Hämatopoetischen Gewebe können Entzündungen und Macrophagenaggregationen entstehen. Die Niere der Döbel aus dem Neckar zeigt ein großes Schädigungsspektrum (Abb. 32). Es wurden Entzündungen, starke Vakuolisierung und teilweise Nekrosen in den Tubuli, und Dilatierungen der Bowmann-Kapsel beobachtet (Abb. 33-34). Zwischen den Probestellen gibt es wenig Unterschiede. Die meisten Fische befinden sich in der Reaktionsphase, es kommen jedoch auch sehr geschädigte Exemplare vor. Im Mai wurden bei den Fischen der vierten Probestelle stärkere Effekte detektiert als im Juli.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

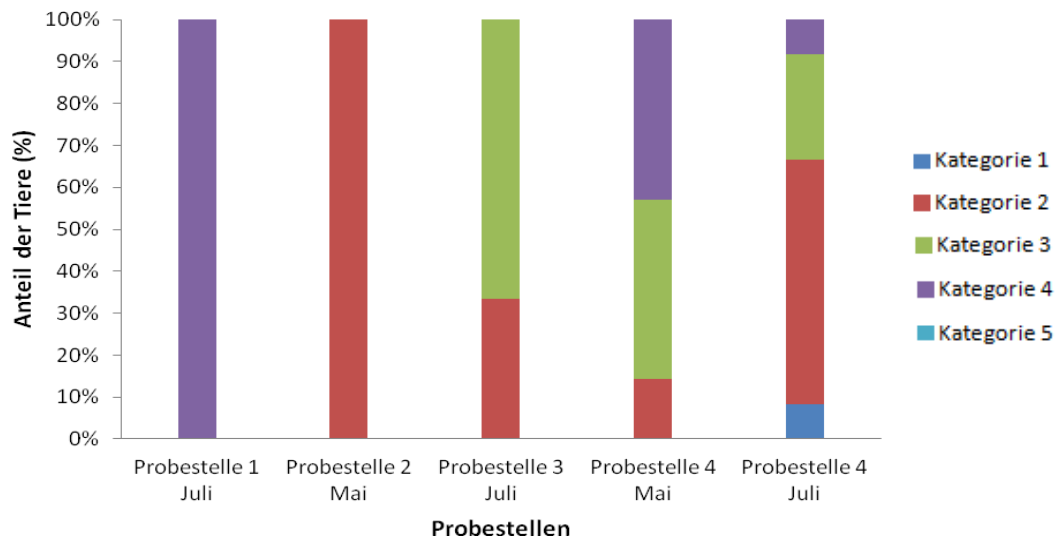


Abbildung 32: Histopathologische Bewertung der Niere. Probenahme im Mai und Juli 2011.

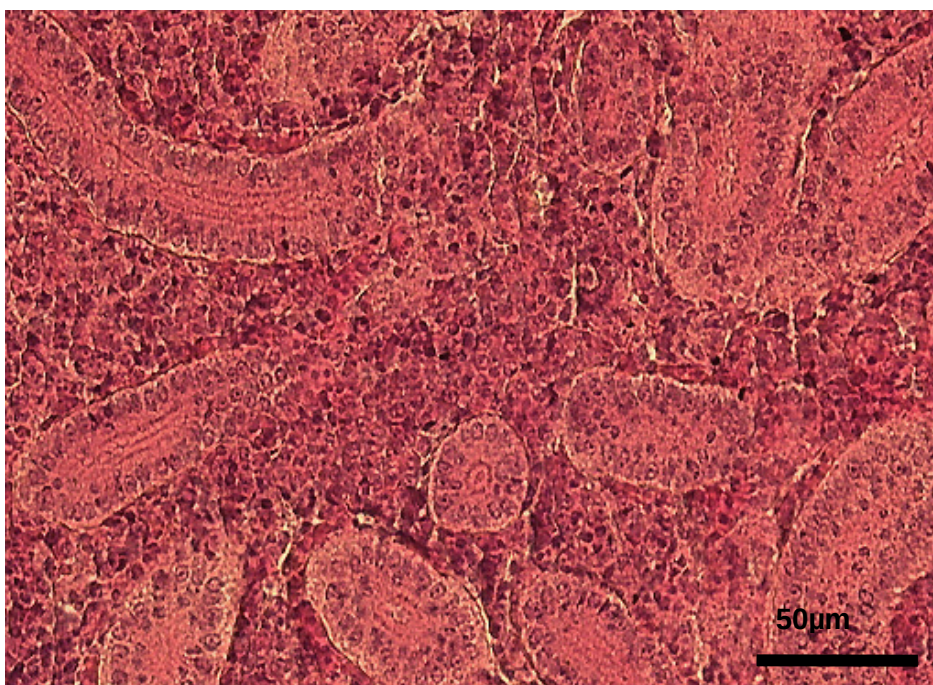


Abbildung 33: Ungeschädigte Niere eines Döbels. Gefärbt mit Hämatoxinilin-Eosin. Herkunft: Argen. (Diana Maier)

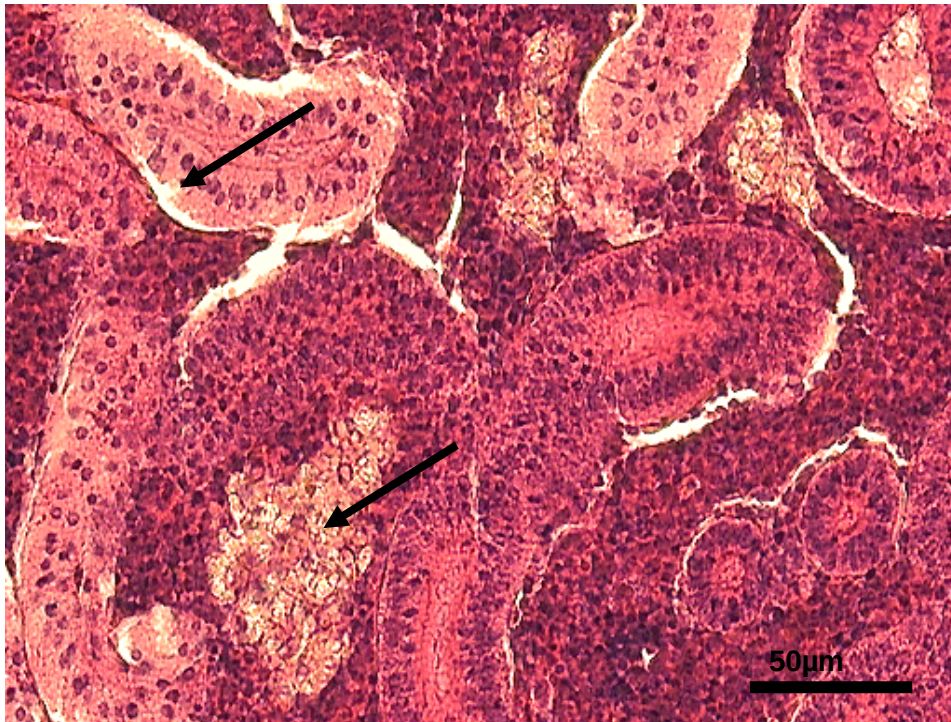


Abbildung 34: Niere eines Döbels aus den Neckar. (PS4, Probenahme Juli) Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Auf dem Bild ist die Destruktion einer Bowmann-Kapsel und Ablösungen bei den Tubuli zu beobachten. (Pfeile)

7.6.4 Histopathologische Untersuchungen von männlichen Gonaden

Der Hoden der Fische weist eine tubuläre Struktur auf. Es besteht hauptsächlich aus Bindegewebe, germinativem Epithel und aus Spermatogonien und Spermatocyten, die nach der Meiose Spermatiden und schließlich Spermien bilden. Durch endokrine Einwirkung von östrogenähnlichen Substanzen kann es zu einer Verweiblichung der männliche Gonade kommen (Leino et al., 2005). In diesem Fall kommen Oozyten im spermatogenen Gewebe vor. Die Bewertung erfolgte diesmal auf einer dreistufigen Skala, wobei der Anteil an reifen Spermien betrachtet wurde. Diese variiert nach Jahreszeit und Alter. Die untersuchten Gewebeproben der Freilandfische zeigen keine endokrinen Veränderungen (Abb. 35). Die Gonaden waren kompakt und es wurden keine Schädigungen beobachtet (Abb. 36). An den ersten zwei Probestellen wurden keine männlichen Döbel gefangen, die Probestellen drei und vier zeigten im Juli unreifere Gonaden als im Mai. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Paarungszeit von Döbel im Juli schon zum Ende kommt.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

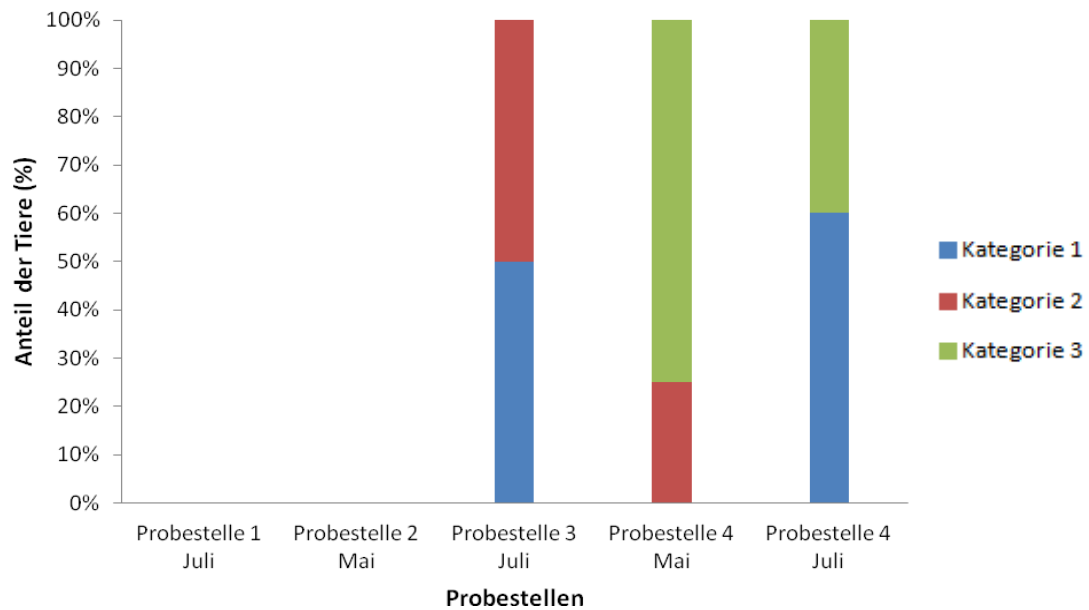


Abbildung 35: Histopathologische Bewertung der männlichen Gonade von Döbeln der zweiten und dritten Probenahme (Mai und Juli 2011).

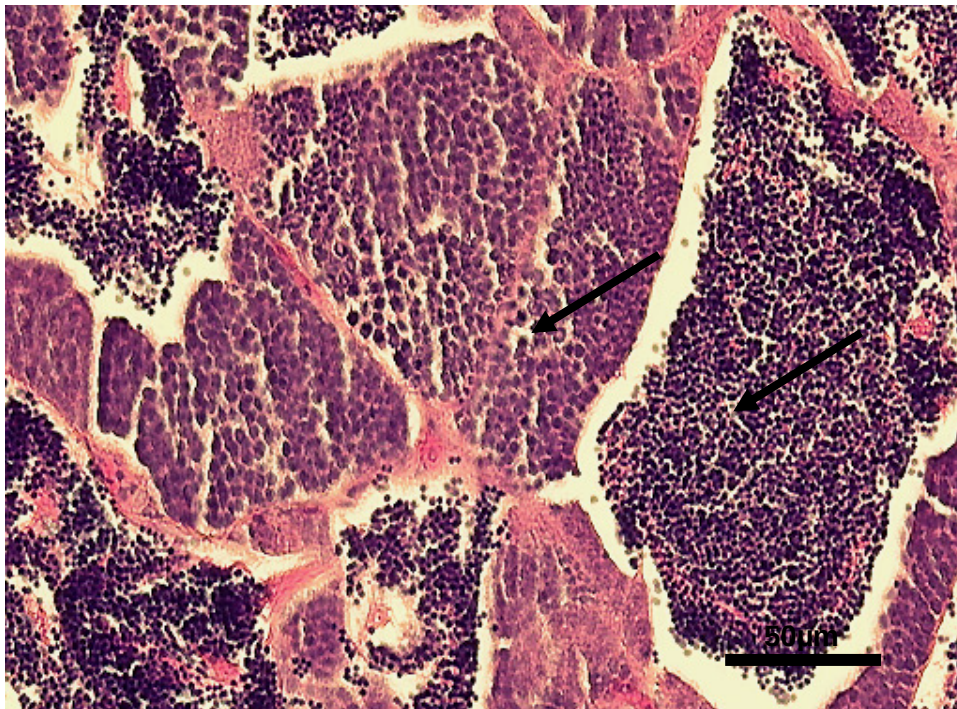


Abbildung 36: Hoden eines Döbels. (PS4, Probenahme im Mai 2011) Gefärbt mit Hämatoxilin-Eosin. Auf dem Bild sind Spermatocyten als große lila Zellen, Spermien als kleine dunkelblaue Zellen zu erkennen (Pfeile).

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

7.6.5. Histopathologische Untersuchungen der weiblichen Gonaden

Das Ovar der Fische ist eine paarige Struktur das sich dorsal entlang des Körpers zieht. Es besteht aus Bindegewebe, germinativem Epithel, Oogonien und Oocyten. Die Oogonien befinden sich peripher und bilden durch Meiose Oocyten (Eizellen). Durch die Reifung wird in die primären Oocyten Vitellogenin, Fett und Dotter in die Eizellen eingelagert, während sich die Zellkernmembran auflöst und sich zu den sogenannten Germinalen Vesikeln umwandelt. Auf diese Weise entstehen sekundäre Oocyten. Die nicht abgelegten reifen Eierzellen werden atretisch und anschliessend abgebaut. Dotter, Fett und weitere Nährstoffe werden von dem Körper wieder aufgenommen (Takashima & Hibiya, 1995). Bei Belastung kann die Anzahl von atretischen Oocyten zunehmen. Durch Einwirkung von androgenähnlichen Substanzen können Mischgonaden vorkommen. Das Ovar der Neckarfische hat keine Schädigungen aufgewiesen (Abb. 37-39). Atretische Eierzellen kamen kaum vor. Es war ein saisonaler Unterschied zwischen den Reifungsstufen zu erkennen: im Mai verfügten die Fische über mehr reife Oocyten als im Juli, was auch mit der Reife der männlichen Gonade korreliert.

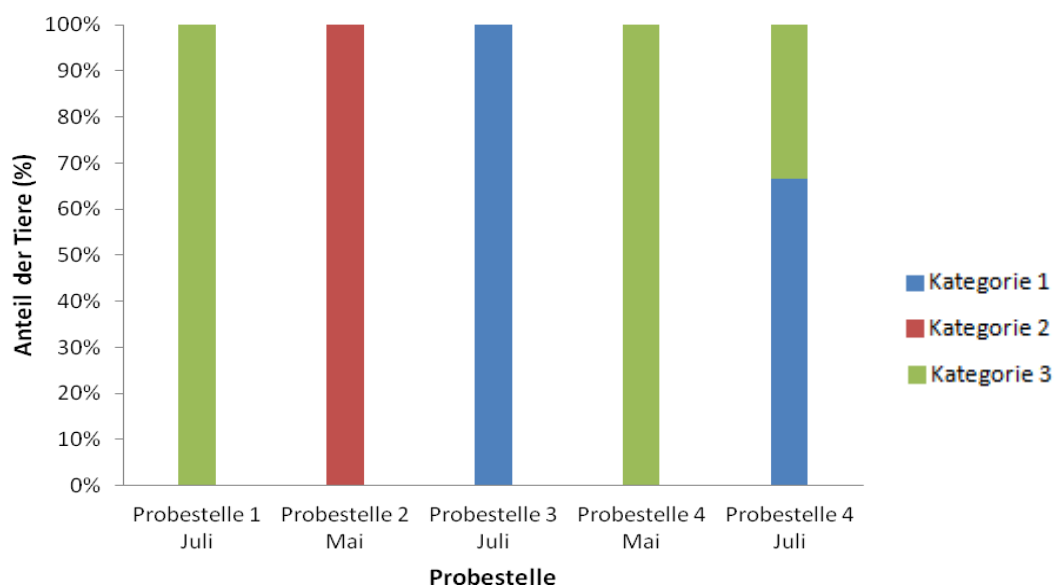


Abbildung 37: Histopathologische Bewertung der weiblichen Gonade von Döbeln der zweiten und dritten Probenahme (Mai und Juli 2011).

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

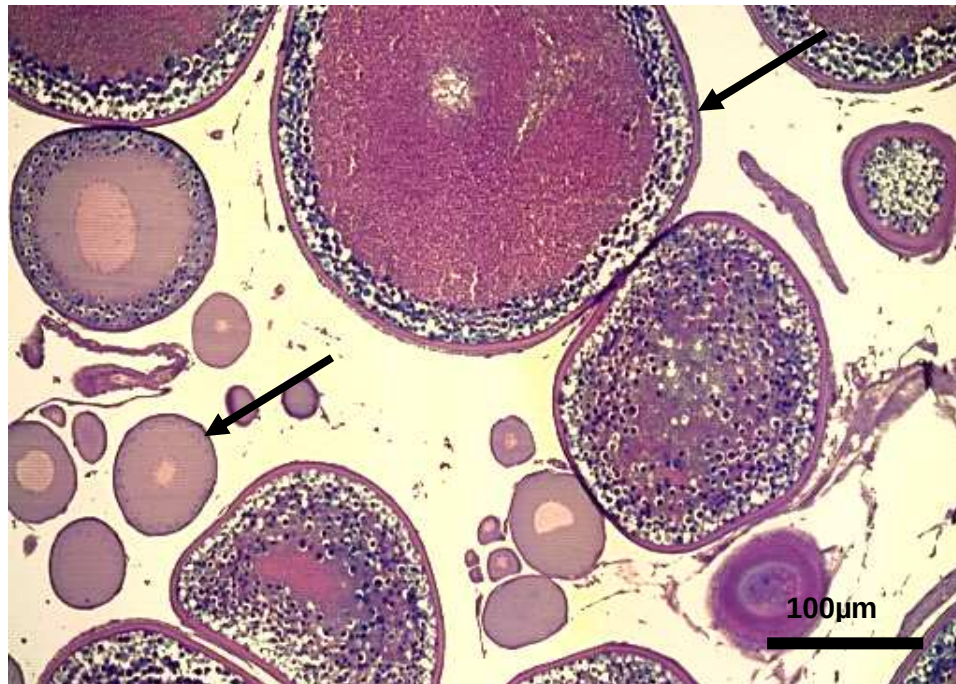


Abbildung 38: Primäre und sekundäre Oocyten im Ovar eines Döbels.
(Pfeile)(PS4, Probenahme im Mai 2011) Gefärbt mit PAS.

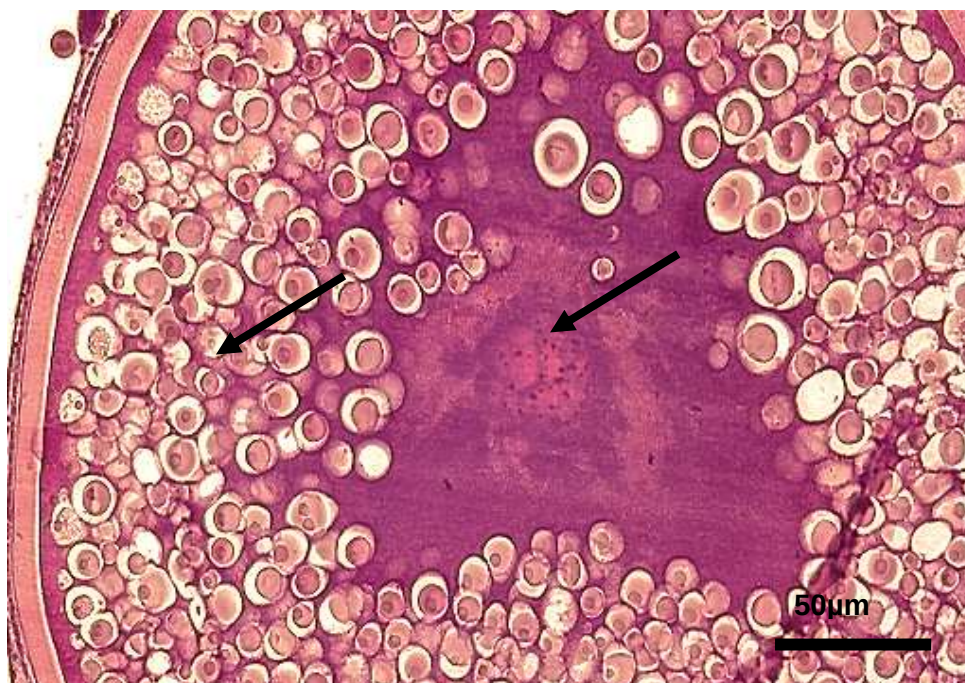


Abbildung 39: Sekundäre Oocyten im Ovar eines Döbels. Germinale
Vesikel und Dotter sowie Vakuolen sind auf dem Bild gut zu
beobachten.(Pfeile) (PS4, Probenahme im Mai 2011) Gefärbt mit
Hämatoxilin-Eosin.

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

7.7. Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Döbel

Die Stressproteinanalyse erfolgte bisher sowohl für die Fische der zweiten, als auch der dritten Probenahme. Da die Fangzahlen bei den ersten drei Probestellen zu gering waren, konnte eine statistische Analyse nur im Fall der vierten Probestelle ausgeführt werden. Statistisch wurden die jahreszeitlichen Unterschiede der Effekte in den Organen paarweise durch Wilcoxon's Methode in JMP 9. verglichen. Die signifikanten Unterschiede sind auf der Abbildung 40 durch Sterne markiert. Die Ergebnisse zeigen die Tendenz, dass die Organe der Döbel im Mai ein höheres Stressproteinlevel besitzen als im Juli. Ein signifikanter Unterschied wurde nur im Fall der Niere nachgewiesen.

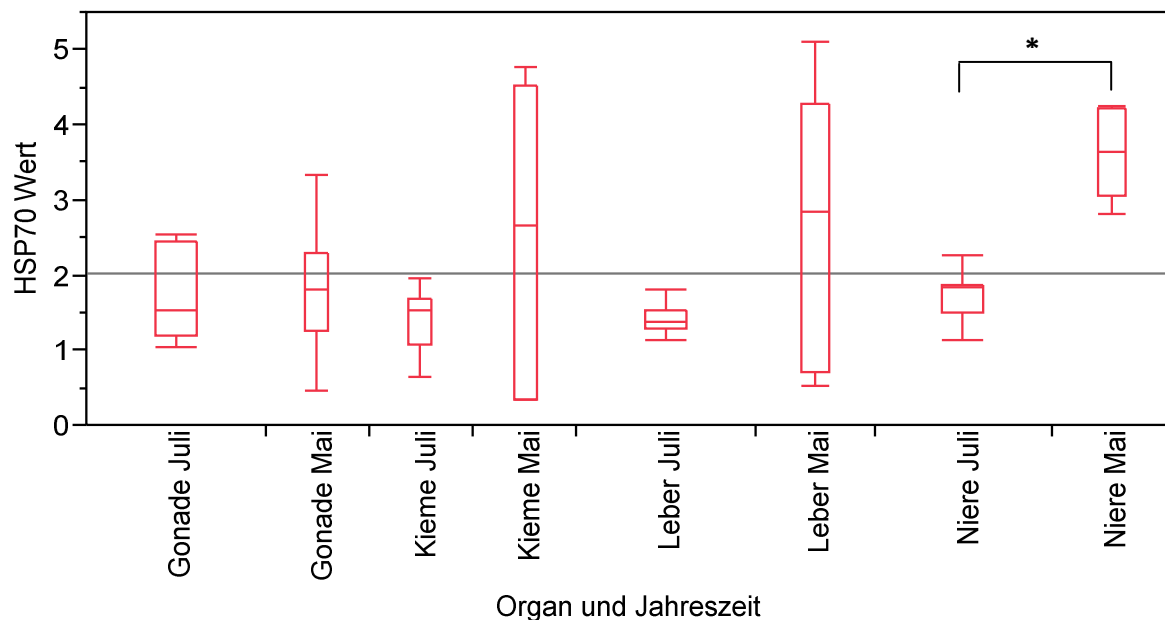


Abbildung 40: Stressproteinanalyseergebnisse (Hsp70) bei Döbeln der vierten Probestelle (Probenahmen vom Mai und Juli 2011).

8.0. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde eine Batterie von Biomarkern eingesetzt um den Gesundheitszustand der Neckar zu charakterisieren. Die diversen Methoden haben eine unterschiedliche Empfindlichkeit und detektieren unterschiedlichen Schädigungsarten. Die Messung von chemischen und physikalischen Wasserparameter lieferte Grundlageninformationen über die Wasserqualität. Die im Neckar gemessenen Werte liegen bei allen Probestellen in jeder Jahreszeit unter den Grenzwerten (DWGV, 2011). Der Early Life Stage Test mit dem Zebraabärbling liefert

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

Ergebnisse über die toxischen Potenziale des Wassers und Sediments. Der Test zeigte, dass bei alle Probestellen teratogene Effekte auftreten können, nicht nur bei der erste Probestelle, die sich unterhalb der Tübinger Kläranlage befindet. Die beobachteten Entwicklungsdefizite waren niedrige Herzschlagfrequenz, Ödeme, schwache Pigmentierung, Schwanz- und Augendeformation, viele Embryonen konnten sich jedoch innerhalb der ersten drei Tage erholen und normal weiterentwickeln. Man konnte auch saisonale Aspekte in der Belastung beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die Witterungsbedingungen und die landwirtschaftliche Aktivität im Bereich der vierten Probestelle sein. Bei niedrigem Pegel (November 2010) hat man vor allem unterhalb der Kläranlage stärkere Effekte gemessen, da in diesem Fall das Abwasser nicht besonders stark durch Regen verdünnt wurde. Im Herbst 2011 gab es starken Regen, welcher eventuell bei der vierten Probestelle Rückstände aus der Landwirtschaft in den Neckar waschen konnte. Die Empfindlichkeit des ELS-Test ist relativ hoch, es besteht allerdings wegen der Barrierfunktion der Eihülle die Besonderheit, dass manche Substanzen den Organismus erst nach den Schlupf erreichen (Henn & Braunbeck, 2011). Zudem ist der Zebrafisch ein Modellorganismus welcher in warmen Gewässer Indiens heimisch ist, insofern können Unterschiede in der Reaktion auf Belastung zwischen diesen Labortiere und einheimischen Fische existieren. Aus diesem Grund war es wichtig auch die Freilandorganismen zu untersuchen. Eine interessante Frage war, wie Invertebraten wie Flohkrebse auf Umweltstress reagieren.

Die Arbeiten mit Gammariden zeigen, dass diese Tiere als Indikatoren zur ökotoxikologischen Gewässercharakterisierung dienen können, da sie eine hohe Sensitivität und gut erkennbare physiologische Antworten auf unterschiedliche Belastung zeigen. Bezüglich der Stressproteinanalysen zeigten die Gammariden an jeder Probestelle ein ähnliches HSP70-Level. Man hätte unterhalb der Kläranlage einen Effekt erwarten können, aber anscheinend sind die Flohkrebse an allen Probestellen einer ähnlichen Gesamtbelastung ausgeliefert. Saisonale Effekte konnten bisher leider nicht untersucht werden, da die Proben von 2011 noch in Bearbeitung sind. Um zu beurteilen, ob die gemessenen Stressproteinwerte höher oder niedriger sind als die von unbelasteten Flohkrebse, wurden ab November 2011 an der Universität Tübingen Flohkrebse unter Kontrollbedingungen gehalten, die Bearbeitung der Proben steht noch aus. Da der Stressproteinlevel der Organismen bei Destruktion abnehmen kann, können sowohl im Kontrollzustand als auch unter starker Belastung niedrige Werte gemessen werden. Aus diesem Grund sind neben der Stressproteinanalyse zusätzliche Biomarkermethoden wie die Histopathologie notwendig, um umweltrelevante Aussagen treffen zu können. Durch die histopathologische Untersuchungen konnten bei Gammariden aus dem Neckar starke Schädigungen festgestellt werden. Es war sowohl oberhalb, als auch unterhalb der Tübinger Kläranlage eine deutliche Belastung festzustellen, insofern unterstützen diese Ergebnisse die Stressproteinresultate. Die Mitteldarmdrüse und

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

die weibliche Gonade erwiesen sich dabei als sensitive Monitororgane. Bei der Mitteldarmdrüse wurden allerdings stärkere Effekte detektiert als bei weiblicher Gonade, diese ist durch die Funktion der Mitteldarmdrüse als Metabolismuszentrale zu erklären. In der Literatur gibt es bisher nur wenige ökotoxikologischen Studien mit Gammariden aus dem Freiland. Diese Tiere verfügen nicht nur über eine hohe Bedeutung als Fischnährtiere, sondern sie können auch Zwischenwirte von Fischparasiten wie z.B. Kratzern sein. Aus diesen Gründen ist es wichtig zu wissen, was für einen Gesundheitszustand diese Tiere aufweisen. Die angewandten Biomarkertests eignen sich dafür, diese zu charakterisieren und weisen auch eine entsprechende Sensitivität auf, daher ist es zu empfehlen, Biomarkertests mit Flohkrebse bei ökotoxikologischen Freilandstudien einzusetzen.

Bei der Freilandfischen gibt es mehr Untersuchungsoptionen als bei Flohkrebse, da die möglichen zu untersuchenden Zielorgane zahlreicher sind als bei Gammariden. Die histologische Untersuchungen zeigten bei den meisten Fischen aus dem Neckar starke Effekte, dabei waren Kieme, Niere und Leber besonders empfindlich, bei der Gonade wurden keine Schädigungen und keine endokrine Effekte festgestellt. Diese Ergebnisse liefern genauere Informationen über die toxischen Potenziale des Gewässers als die Studien mit Flohkrebse, die Vergleichbarkeit ist aber bei den zwei Organismen noch immer relativ gut, sowohl im Bezug auf endokrine Potenziale, als auch bei generellen Schädigungen. Wegen der geringen Fangzahlen war bei den Neckarfischen leider der Vergleich der Probestellen nicht möglich, es wurde aber festgestellt, dass der Gesundheitszustand der Fische im Frühling schlechter war als im Herbst. Diese Beobachtung wird auch durch die Stressproteinanalyse unterschiedlicher Fischorgane unterstützt. Es ist schwer zu sagen warum sich diese Unterschiede ergaben, der Stressproteinlevel und Organintegrität der Fische kann durch viele biotische und abiotische Parameter wie Paarungszeit, Temperatur, Nahrungsangebot usw. beeinflusst werden, es ist aber auch nicht auszuschließen, dass im Frühling die Wasserqualität des Neckars schlechter war und die Effekte durch Umweltbelastung verursacht wurden. Ein gentoxischer Einfluss liegt im Fall des Neckars allerdings nach unseren Untersuchungen nicht vor.

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

Die zwei angewandten Assays können unterschiedliche Erbmaterial-Schädigungsmechanismen detektieren, beim Mikrokern Test können Zellteilungsfehler identifiziert werden, während beim Komet Assay Chromosomenbrüche nachgewiesen werden. Die zwei Tests lieferten ähnlichen Ergebnissen. Es waren lediglich bei der männlichen Gonade Chromosomenbrüche zu sehen, alle anderen Organe wiesen eine kompakte DNA auf. Dieses Phänomen kann wahrscheinlich durch die unterschiedliche Zellteilungsmechanismen erklärt werden: im Gegensatz zu Mitose erfolgt bei der Entstehung von Gameten während der Meiose in der Prophase der Austausch von DNA-Fragmente zwischen der Chromatiden (Crossover).

Als Fazit zeigt sich, dass im Neckar die Organismen an allen untersuchten Abschnitten belastet sind. Die Biomarkeruntersuchungen zeigen, dass sich diese Tiere bereits im Reaktionszustand befinden. Die Belastungsquelle ist nicht nur die Kläranlage, da die Tiere auch weiter oberhalb deutliche Effekte zeigen. Die angewandten Methoden ergänzen sich sehr gut, mit ihrer Hilfe können kurz- und langfristige Schädigungen sowohl bei Invertebraten, als auch bei Vertebraten detektiert werden. Im Gegensatz zu etablierten Gewässergütekriterien wie die Messung von physikalischen und Strukturparametern oder Makrozoobenthos-Untersuchungen, liefern die Studien mit Biomarkern detaillierte Informationen über den Gesundheitszustand von Organismen und über mögliche toxische Potenziale im Gewässer. Auf diese Weise ist es möglich, chronische Effekte rechtzeitig zu detektieren und dadurch komplexe Umweltprobleme besser zu verstehen. Das Verwenden von Biomarkern in der Umweltforschung ist ein relativ neues Thema, aber zurzeit hochaktuell, und auf jedem Fall empfehlenswert.

9.0. Zusammenfassung der Arbeit

Ziele des Projektes:

- Charakterisierung des Gesundheitszustandes des Neckars durch Biomarkertests mit Fischen und Invertebraten.
- Bewertung und Vergleich der angewandten Biomarkermethoden.

Untersuchungsmethoden:

- Limnologische Messungen.
- Untersuchung von Wasser und Sedimentproben durch einen Entwicklungstest mit dem Zebrafisch.
- Histologische und Stressproteinanalyse bei Flohkrebse aus dem Neckar.
- Histologische, genotoxische und Stressproteinanalyse bei Döbeln aus dem Neckar.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

Evaluierungstabelle der Probestellen:

gut: ***, mittel:**, schlecht:*, leere Zellen: keine, oder unbearbeitete Proben

Probestellen	Probestelle 1			Probestelle 2		Probestelle 3			Probestelle 4		
Probenahme	Nov. 2010	Mai 2011	Sept. 2011	Nov. 2010	Mai 2011	Nov. 2010	Mai 2011	Sept. 2011	Nov. 2010	Mai 2011	Sept. 2011
Limnologie	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
ELS Test	*	*	**	***	***	*	**	***	**	*	*
Gammarus Histologie Mitteldarmdrüse	*			*		*			*		
Gammarus Histologie Ovar	***			***		***			***		
Gammarus Hsp70	**			**		**			**		
Döbel Mikrokern Test			***		***			***		***	***
Döbel Komet Assay			***		***			***		***	***
Döbel Histologie Kieme			*		**			*		*	**
Döbel Histologie Leber			*		**			*		**	**
Döbel Histologie Niere			*		**			**		*	**
Döbel Histologie Ovar			***		***			***		***	***
Döbel Histologie Hoden			***		***			***		***	***
Döbel Hsp70			**		*			*		*	**

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

Ergebnisse:

- Der Neckar weist bei Tübingen toxischen Potenziale auf.
- Die Belastung ist an allen Probestellen vorhanden, nicht nur unterhalb der Tübinger Kläranlage, die untersuchten Flohkrebse und Fische befanden sich im Reaktionszustand.
- Es ergaben sich saisonale Unterschiede im Gesundheitszustand der Freilandorganismen, im Mai 2011 war er schlechter als im Juli 2011.
- Die angewandte Biomarkerbatterie war effektiv, sowohl bei Labor- als auch bei Freilandorganismen.
- Die Ergebnisse von Tests mit Wirbellosen und Wirbeltieren sind vergleichbar, obwohl die Wirbeltiertests mehr Informationen über eine mögliche Umweltbelastung liefern.
- Die Methoden mit Biomarkern haben mehrere Vorteile im Vergleich zu etablierten Gewässergütetests: sie sind sensitiver, spezifischer, effektbezogen und ermöglichen die frühzeitige Detektion von chronischen Wirkungen.
- Der Einsatz von Biomarkertests zur ökotoxikologischer Charakterisierung des Gesundheitszustandes der Gewässer ist in jedem Fall empfehlenswert.

10.0 Ausblick

Das Monitoring des Neckars wird auch im Jahr 2012 fortgesetzt. Es werden im Frühling und im Herbst limnologische Parameter gemessen, für den ELS-Test Wasser und Sedimentproben gesammelt und es erfolgt ebenfalls die Stressprotein- und histopathologische Analyse an Flohkrebse. Die drei Probestellen bleiben die gleichen wie im Jahr 2011, so erhält man wichtige Daten über einen längeren Zeitraum. Die niedrige Fanganzahl unterhalb der Kläranlage wie auch an Probestelle 3 ist ein großes Problem im Rahmen der bisherigen Projektplanung. Während der Elektrofischung hat man bei dieser Probestelle fast keine Fische gefangen, obwohl die Strömungs- und Strukturbedingungen auch für Weißfische geeignet sind. Um dieses Problem zu umgehen, ist für die Fische statt des passiven Monitorings (Entnahme von vorhandenen Fischen) ein aktives Monitoring (einsetzen von Fischen in durchströmbare Käfige an zumindest zwei Probestellen) geplant. Im Rahmen des Projektes werden männlichen Bachforellen (*Salmo trutta fario*) in Schwimmkäfigen (Abb. 41-42) oberhalb und unterhalb der Kläranlage Tübingen exponiert um den

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

Einfluss des Klärwassers auf den Gesundheitszustand der Fische abzuschätzen und in Folge ggf. erklären zu können, weshalb im Neckar unterhalb der Kläranlage nur noch sehr wenige Fische leben. Geplant ist eine achtwöchige Exposition. Um mögliche toxischen Effekte des Gewässers zu beurteilen, werden die Forellen mithilfe der oben beschriebenen Biomarkern untersucht. Der Bau der Expositionskäfige ist bereits erfolgt, eine Genehmigung für die Studie liegt ebenfalls vor.

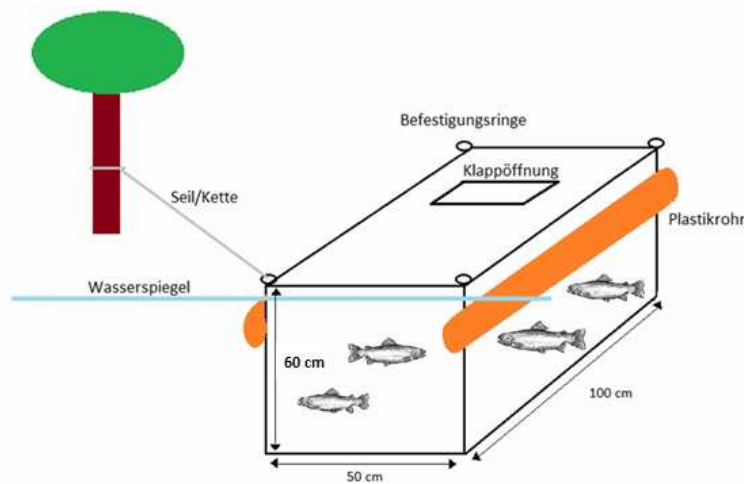


Abbildung 41: Entwurf der Schwimmkäfige.

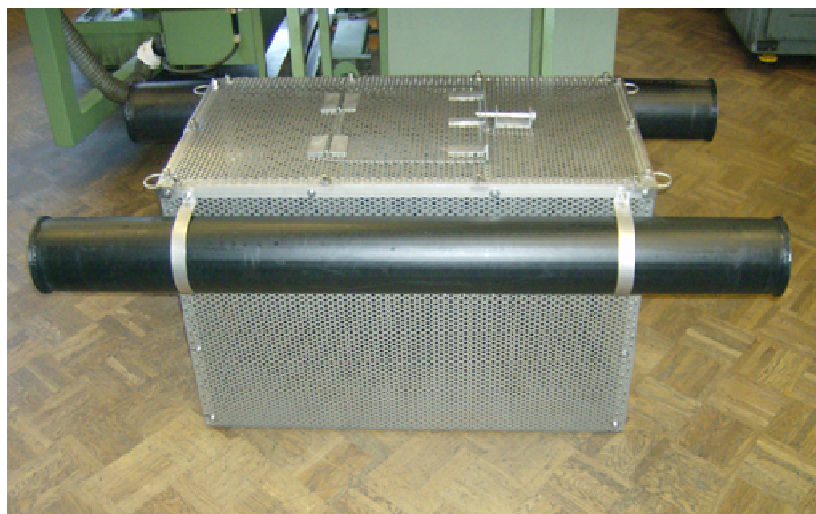


Abbildung 42: Schwimmkäfig.

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

11. Literatur

- Al-Sabti, K. & Metcalfe, C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343: 121-35.
- Amin, A. B., Mortensen, L., Poppe, T. (1992): Histology Atlas. Normal structure of Salmonids. Offset Nord AS. First Edition.
- Böttcher, M., Hollert, H. (2005): Mikrotucleus-Test mit RTL-W1-Zellen und Fischerytrocyten. SOP Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg
- Correia, A. D., Pereira, A. L., Costa, M. H., Carrapico, F. (2002): Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda), *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 82:1-4
- DWGV, (2011): Erste Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung.
http://www.dvgw.de/fileadmin/dvgw/wasser/recht/trinkwv1aendv_volltext.pdf
Zugriff am 10. Jan 2011.
- 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.
- Fent, K. (2003): Ökotoxikologie, Georg Thieme Verlag.
- Henn, K., Braunbeck, T. (2011): Dechoriation 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
- Leino, L. R., Jensen, M. K., Ankley, T. G. (2005): Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19:85-98
- Lucius, R. & Loos-Frank, B. (2008): Biologie von Parasiten. Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage.
- Nagel, R. (2002): DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*. 19:38-48.

**Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung
des Gesundheitszustandes des Neckars bei Tübingen**

- 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.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Tribskorn, R., Köhler, H.-R. (2005): Endocrine Effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of Wastewater Effluents, Temporal Variability and Spatial Aspects on Natural Populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 53-61.
- 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
- Sibley, P. K., Benoit, D. A., Balcer, M. D., Phipps, G. L., West, C. W., Hoke, R. A., Ankley, G. T. (1999): In situ bioassay chamber for assesment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18:2325-2336.
- Sures, B. (2008): Host–parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology*, 73: 2133–2142
- Takashima, F., & Hibiya, T. (1995): *An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features*. Kodansha Ltd. Second Edition.