

Technische Universität München

Lehrstuhl für Tierhygiene

Zum „Bachforellensterben in Bayern“:  
Beurteilung der Gewässergüte mit  
Zellkultursystemen

Thomas Schützeneder

Vollständiger Abdruck der von der Technischen Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. J. Bauer

2. Univ.-Prof. Dr. A. Melzer

Die Dissertation wurde am 05.03.2010 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan am 12.07.2010 angenommen.

---

© 2010 by Lehrstuhl für Tierhygiene

Alle Rechte, auch die der Übersetzung und des Nachdruckes sowie jede Art der photomechanischen Wiedergabe oder der Übernahme auf Datenträger, auch auszugsweise, bleiben vorbehalten.

Selbstverlag im Eigenvertrieb:  
Technische Universität München  
Lehrstuhl für Tierhygiene  
Weihenstephaner Berg 3  
D-85354 Freising  
Telefax: 08161 – 71 – 4516

**Danksagung:**

An dieser Stelle möchte ich denjenigen recht herzlich danken, die zur Erstellung dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Danken möchte ich Hr. Prof. Bauer für die fachliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Melzer für das Koreferat und bei Prof. Meyer für den Prüfungsvorsitz.

Ebenfalls danken möchte ich dem Landesfischereiverband Bayern e.V. für die Finanzierung und Hr. Dr. Oliver Born und Frau Dr. Julia Schwaiger für die fachliche Unterstützung. Danken möchte ich auch Hr. Jörg Ruppe für die angenehme Zusammenarbeit.

Zu großem Dank bin ich auch den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene, besonders Herrn Mamet und Frau Schott, für die fortwährende Unterstützung verpflichtet.

Besonderer Dank gilt dabei auch Frau Andrea Kolm, die mit Ihrem Eifer und Zuverlässigkeit dieses Projekt unterstützt hat.

Ebenfalls großer Dank gilt Hr. Jörg Steinhilber für die Betreuung der Versuchsfische und den Mitarbeitern der AG Fischbiologie, die an diesem Projekt konstruktiv mitgewirkt haben.

Dank gebührt den ansässigen Fischereivereinen an der Iller und ihren Zuflüssen für die zuverlässigen und regelmäßigen Wasserprobennahmen. Besonders danken möchte ich Hr. Schugg und Hr. Bucher vom Fischereiverein Kempten, sowie den Probenehmern des Fischereivereins Oberstdorf und des Fischereivereins Kleinwalsertal Hr. Hänel und Hr. Sarcher. Zusätzlich möchte ich mich bei Hr. Dr. Klotz für die herzliche Gastfreundschaft und seine Mithilfe bei den Kartierungsarbeiten bedanken.

Bei den Diplomanden und Praktikanten Matthias Ruff, Henrik Hufgard, Danae Barendt, Markus Helfer, Margit Grazi, Florian Schötz und bei den Mitarbeitern des Landes Vorarlberg und des Wasserwirtschaftsamtes Kempten, bedanke ich mich auf diesem Weg für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Projektes.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an meine Familie richten, die mich im Studium unterstützt hat. Bei Karin und Sonja Kronawitter möchte ich mich für ihr soziales Engagement während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

*„Generelle Ansichten erhöhen den Begriff von der Würde und der Größe der Natur. (...) Generelle Ansichten gewöhnen uns, jeden Organismus als Teil des Ganzen zu betrachten, in der Pflanze und im Tier minder das Individuum oder die abgeschlossene Art, als die mit der Gesamtheit der Bildungen verkettete Naturform zu erkennen“*

*Alexander von Humboldt, Kosmos (1845)*

*-Meiner Familie-*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>9</b>
<b>B</b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b>11</b>
1	ANATOMISCHE UND PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER BACHFORELLE (SALMO TRUTTA FORMA FARIO)	11
2	BACHFORELLENSTERBEN	12
2.1	KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD UND PATHOLOGIE	12
2.2	VORKOMMEN	13
2.3	STAND DES WISSENS ZUR ÄTIOLOGIE	14
3	BEURTEILUNG VON OBERFLÄCHENGEWÄSSERN	17
3.1	ÖKOLOGISCHER ZUSTAND VON GEWÄSSERN	18
3.2	PHYSIKALISCH-CHEMISCHER ZUSTAND VON GEWÄSSERN	23
<b>C</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>35</b>
1	MATERIAL	35
2	METHODEN	41
2.1	HERSTELLUNG VON TOXIN-STANDARDLÖSUNGEN	41
2.2	GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DER WASSERPROBEN	41
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	43
2.3.1	GEWINNUNG PRIMÄRER BFL-ZELLEN	44
2.3.1.1	HERSTELLUNG VON BACHFORELLENBLUTSERUM	44
2.3.1.2	GEWINNUNG VON LEBERZELLEN NACH LAVILLE ET AL. (2004)	44
2.3.1.3	ISOLIERUNG DER LEBERZELLEN NACH FRESHNEY (1987)	45

---

2.3.2	KULTIVIERUNG VON VERO-ZELLEN	46
2.3.3	KULTIVIERUNG VON HEP2-ZELLEN	46
2.3.4	BEURTEILUNG DES EINFLUSSES VON ISOLIERUNGS- UND KULTIVIERUNGSSCHRITTEN AUF BACHFORELLENLEBERZELLKULTUREN	47
2.3.5	DURCHFÜHRUNG DES MTT-TESTS	47
2.3.5.1	BACHFORELLENLEBERZELLEN (BFL-ZELLEN)	47
2.3.5.2	VERO-/HEPZELLEN	48
2.3.5.3	AUSWERTUNG	48
2.4	ERFASSUNG ANTHROPOGEN BEDINGTER EINFLUSSFAKTOREN IM PROBENRELEVANTEN WASSEREINZUGSGEBIET	49
<b>D</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
1	ETABLIERUNG DES TESTSYSTEMS	52
2	WIRKUNG UNTERSCHIEDLICHER VERBINDUNGEN IM MTT-TEST MIT BFL-ZELLEN	65
2.1	FUSARIANTOXINE	66
2.2	ASPERGILLUS TOXINE	68
2.3	PENICILLIUM TOXINE	69
2.4	WEITERE MYKOTOXINE	70
2.5	MICROCYSTIN LR	71
2.6	WEITERE UMWELTRELEVANTE VERBINDUNGEN	72
3	WIRKUNG VON TOXINEN IM MTT-TEST MIT HEP2- BZW. VEROZELLEN	74
4	UNTERSUCHUNG VON WASSERPROBEN DER ILLER MIT DEM MTT-TEST	76
4.1	RESULTATE MIT BFL-ZELLEN	76
4.2	RESULTATE MIT VERO- UND HEP2-ZELLEN	81
4.3	DARSTELLUNG „ÖKOLOGISCHER UND ANTHROPOGEN BEDINGTER PARAMETER“ AN DER ILLER BZW. IM ILLEREINZUGSGEBIET	86

---

4.3.1	OBERLAUF DER ILLER	86
4.3.2	ILLERZUFLÜSSEN: TRETTACH, STILLACH, BREITACH	90
4.3.3	GEBIETS- UND ABWASSERDATEN DES LANDES VORARLBERG – KLEINWALSERTAL (2004)	91
4.3.4	GEBIETS- UND ABWASSERDATEN DES LANDES VORARLBERG– KLEINWALSERTAL (2005)	92
4.3.5	GEWÄSSERDATEN WWA KEMPTEN UND LAND VORARLBERG	94
<u>E DISKUSSION</u>		<u>96</u>
1	METHODISCHES VORGEHEN	96
2	AKUTE ZYTOTOXIZITÄT AUSGEWÄHLTER VERBINDUNGEN IM MTT-TEST MIT BFL- ZELLEN	98
3	FELDPROBEN	106
<u>F ZUSAMMENFASSUNG</u>		<u>108</u>
<u>G SUMMARY</u>		<u>110</u>
<u>H LITERATURVERZEICHNIS</u>		<u>111</u>
<u>I ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>		<u>132</u>
<u>J TABELLENVERZEICHNIS</u>		<u>135</u>
<u>K ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND BEGRIFFSERKLÄRUNG</u>		<u>136</u>

---

L ANHANG	138
----------	-----

---

M LEBENSLAUF	142
--------------	-----

---

## A Einleitung

Seit mehr als 15 Jahren ist ein starker Rückgang von rheophilen Fischarten in bayerischen Gewässern zu beobachten (Burkhardt-Holm et al., 2005). Neben Äsche und Nase ist auch die Bachforelle von dieser Populationsdegression stark betroffen. Insbesondere in Ober- und Mittelläufen kalkalpiner Flüsse Bayerns, aber auch in Österreich und der Schweiz, wird ein saisonales Bachforellensterben beobachtet (Born, 2003; Escher, 2003; Haunschmid et al., 2003; Bernet, 2002; Moser, 2000).

Beginnend in den späten Sommermonaten sterben in einem Zeitfenster von circa vier Wochen 70 – 100 % einer gesamten Bachforellenpopulation (Born, 2003). Fische mit ähnlichen Habitatansprüchen wie Regenbogenforellen, Bachsaiblinge, Mühlkoppfen oder Äschen sind nicht betroffen. In der Teichwirtschaft wurde ein vergleichbares Geschehen bislang nicht festgestellt (Hanfland & Ruppe, 2003). Durch diese Krankheit wurden Bachforellenpopulationen in den letzten Jahren derart reduziert, dass in vielen Abschnitten der betroffenen Gewässer keine arterhaltende Populationsdichte mehr existiert.

Die Ursache dieses „Bachforellensterbens“ ist bis dato weitestgehend unklar. Versuche, das Krankheitsgeschehen von erkrankten auf gesunde Bachforellen zu übertragen verliefen negativ, was eine infektiöse Genese eher unwahrscheinlich erscheinen lässt (Baath, 2003). Darüber hinaus werden u. a. fehlende Gewässervernetzung, Verschlammung der Laichgründe, sowie Gewässerverbauung als Gründe für den Rückgang vieler Populationen diskutiert; diese Faktoren wirken sich bekanntermaßen negativ auf die Entwicklung von Bachforellenpopulationen aus (Burkhardt-Holm et al., 2005). Auch die steigende Belastung der Gewässer mit unerwünschten Stoffen, z.B. Schwermetalle und Arzneimittel, werden als Ursache für den Fischrückgang in Erwägung gezogen (Klimmek, 2003; Schwaiger, 2003). Allerdings wurden bei den toxikologischen Untersuchungen bislang nur konventionelle Wassergüteparameter (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Nitratkonzentration, Blei-, Zink-, Cadmiumkonzentration, Karbonat-Gesamthärte) berücksichtigt und keine Auffälligkeiten festgestellt (Baath, 2003).

---

Da der gezielte Nachweis weiterer „unerwünschter Stoffe“ zwar möglich ist, aber durch die Fülle unterschiedlichster Substanzen limitiert wird, sollte mit einem wirkungsbezogenen zellbiologischen Screening untersucht werden, ob „Toxizität“ in Proben aus betroffenen Gewässern festzustellen ist.

Zielsetzung dieser Studie ist daher:

- Entwicklung eines Testsystems auf der Basis von Bachforellenhepatozyten („MTT-Test auf der Basis von BFL-Zellen“) zur Beurteilung von „bachforellenspezifischer Gewässertoxizität“.
- Validierung des MTT-Tests auf der Basis von Bachforellenleberzellen (BFL-Zellen) mit verschiedenen Toxinen und umweltaktiven Substanzen.
- Weiterer Einsatz des MTT-Test`s auf der Basis von Vero- und Hep2-Zellen. Diese haben sich in anderen Untersuchungen zur Beurteilung komplexer Gewässerbelastungen bewährt (Tribskorn, 2003; Segner, 2004).
- Etablierung eines Verfahrensablaufes zur Entnahme und Präparation von Wasserproben aus betroffenen Gewässern (Iller, Breitach, Trettach und Stillach).
- Untersuchung der Wasserpräparationen aus den Freilanduntersuchungen hinsichtlich „Toxizität“.
- Korrelation der Ergebnisse mit anthropogen bedingten Randparametern aus dem Projektgebiet.

## **B Literatur**

### **1 Anatomische und physiologische Grundlagen der Bachforelle (*Salmo trutta forma fario*)**

Die Bachforelle (siehe Abbildung 1) ist eine standorttreue Süßwasserform der lachsartigen Fische (Salmoniden). Sie besitzt einen lang gestreckten, torpedoförmigen und seitlich etwas zusammengedrückten Körper. Die Oberseite der Bachforelle ist dunkel grünbraun bis schwarzblau, die Unterseite heller bis weiß gefärbt. An den Seiten und auch an Rücken- und Fettflosse treten neben schwarzen Punkten vor allem oft hellgelb bis bläulich umrandete, rote Punkte auf. Um über steinigem Grund gut in der Strömung stehen zu können, sind die Brust- und Bauchflossen der Bachforelle besonders breit. Juvenile Tiere haben sechs bis neun dunkle, ovale bis längliche oder unregelmäßig geformte Jugendflecken an den Seiten. Die Schwanzflosse ist bei juvenilen Fischen gegabelt, bei Erreichen der Geschlechtsreife fast gerade bis nach außen gewölbt (Sterba, 1990).



**Abbildung 1: Die Bachforelle (*Salmo trutta forma fario*)**

Die Fortpflanzung der Bachforelle findet im Herbst bzw. Winter statt. Zur Laichzeit wandert sie ab August kurze Strecken in die Nebenbäche bzw. Quellgebiete ihres Gewässersystems.

Dort bevorzugt sie kiesigen oder sandigen Untergrund in schneller fließenden Gewässern. Pro Kilogramm Körpergewicht des Rogners werden circa 2000 Eier in einer selbstgeschlagenen Laichgrube von Milchneern befruchtet und zur Erbrütung im Interstizial (Sedimentzwischenräume) deponiert. Die Fischlarven schlüpfen nach 350 T° (Tagesgrade, z.B. 35 Bruttage bei ca. 10 °C Wassertemperatur), verbleiben dann als Larven einige Zeit in den Sedimentzwischenräumen am

Gewässergrund und suchen dann strömungsberuhigte Flachwasserzonen auf. Dort erfolgt die weitere Entwicklung der Fische, bis ihre Kondition ausreicht, um ein eigenes Territorium im Gewässersystem zu besetzen. Die Nahrung der juvenilen Bachforellen sind Makroinvertebraten, adulte Tiere ernähren sich vorwiegend von Insekten, Insektenlarven, Kleinkrebsen und kleineren Fischen (Bone & Marshall, 1995).

Die Bachforelle kommt in ganz Europa, in fast allen sommerkühlen, sauerstoffreichen Bächen und Flüssen vor. Sie bevorzugt stark strukturierte Gewässerabschnitte mit vielen Unterständen und Versteckmöglichkeiten. Da die Bachforelle sehr weit bis in die Oberläufe von Flüssen einwandert und dort als dominierende Art anzusehen ist, wurde bei der Fließgewässerzonierung die Forellenregion nach ihr benannt. Sie kann aber auch, künstlich eingesetzt, in kleineren Seen bis in eine Höhe von 2500 m N. N. überleben (Hauer, 2007; Sterba, 1990).

Die Bachforelle ist eine Fischart, die bekannt ist für eine hohe Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Gewässerverunreinigungen, besonders durch Abwasserreinigungsanlagen (Belden et al., 2007; Keiter et al., 2006; Rodriguez-Cea et al., 2003).

## **2 Bachforellensterben**

### **2.1 Klinisches Erscheinungsbild und Pathologie**

Das Erscheinungsbild des „Bachforellensterbens“ kann keiner bekannten Fischkrankheit direkt zugeordnet werden. Äußerliche Merkmale sind zunehmende Apathie, Verweigerung der Nahrungsaufnahme, Abmagerung, Dunkelfärbung der Haut und teilweise Erblindung sowie Exophthalmus. Als auffälliges pathologisches Merkmal zeigt sich die Anämie in blass erscheinenden Kiemen. Die fortgeschrittene Abmagerung äußert sich im vollständigen Fehlen von Fetteinlagerungen in den Pylorusanhängen. In der Leibeshöhle sowie im Verdauungstrakt finden sich Flüssigkeitsansammlungen sowie gallertartig-wässrige, teilweise gelbliche Ablagerungen. Der Magen-Darmtrakt und die Leber weisen makroskopisch sichtbare Veränderungen auf (Schwaiger & Ferling, 2003).

Histologisch sind die Leberveränderungen durch massive Blutungen, Entzündungsherde, Zellnekrosen sowie einen kompletten Verlust des Speicherstoffes Glykogen charakterisiert. In der Milz dominieren ebenfalls Blutungen sowie eine deutliche lymphozytäre Depletion. In der Niere war neben Blutungen eine Zunahme interstitieller Zellen im Sinne einer Nierenentzündung zu beobachten. An den Kiemen sind Blutungen, Teleangiektasien sowie degenerative Veränderungen des Kiemenepitels nachweisbar. Auch im Bereich des Magen-Darm-Traktes waren Veränderungen in Form von Ödematisierungen zu beobachten (Schwaiger & Ferling, 2003).

Die klinisch-chemische Untersuchung des Blutes der Fische ergab keine besonderen Befunde. Die Werte für Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), Triglyceride, Glukose, Bilirubin, Gesamteiweiß, Kreatinin, Harnstoff und Kalzium lagen alle im physiologisch geltenden Bereich (Schwaiger et al., 2006).

## **2.2 Vorkommen**

In Bayern führte der Landesfischereiverband Bayern e.V. unter Mitwirkung von Fischereiberechtigten ein Monitoring durch, dass das Auftreten des Sterbens in Bayern räumlich einordnen sollte. Grundlage war die raumbezogene Erfassung von Daten mittels gezielter Elektro- und Hamenbefischungen sowie eine Befragung von Fischereiberechtigten. Dieser Studie zufolge tritt das „Bachforellensterben“ in den südlichen Donauzuflüssen Ammer, Iller, Isar, Kalten (Zufluss der Mangfall), Lech, Loisach, Mangfall, Ramsach, Salzach und Wertach auf; auch die Niederungsbäche Schleiferbach, Sempt und Floßbach, wurden als Gefährdungsgewässer eingestuft (Hanfland & Ruppe, 2003). Die betroffenen Gewässer sind ausnahmslos typische Salmonidengewässer, die gute Lebensbedingungen für die Bachforelle bieten.

Gleichzeitig stellten diese Autoren ein Ausbleiben des Phänomens in Fischzuchten fest.

Auch in der Schweiz ist ein erheblicher Rückgang der Bachforellenfänge um bis zu 70 % zu verzeichnen. Ein multifaktorielles Einflusspektrum mit regional

unterschiedlicher Gewichtung wird als Rückgangsursache dafür gesehen (Burkhardt-Holm et al., 2005). In der Diskussion sind Reproduktionsstörungen, unausgewogenes Fischereimanagement, höhere Wassertemperaturen, vermehrt auftretende Hochwassersituationen, proliverative Nierenerkrankung und mangelnde Nahrungsversorgung der Bachforellen.

In Österreich wurde das „Proliverative Darkening Syndrom“ in der Traun, Trattnach und in der Ager festgestellt. Ein starkes Auftreten wurde auch im Salzkammergut in den Seeausläufen registriert. Diese Gewässer weisen einen hohen pH-Wert auf. Von dortigen Fischereiberechtigten wurden die verendenden Bachforellen meist unterhalb von Abwasserreinigungsanlagen festgestellt (Bundesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde, 2007).

### **2.3 Stand des Wissens zur Ätiologie**

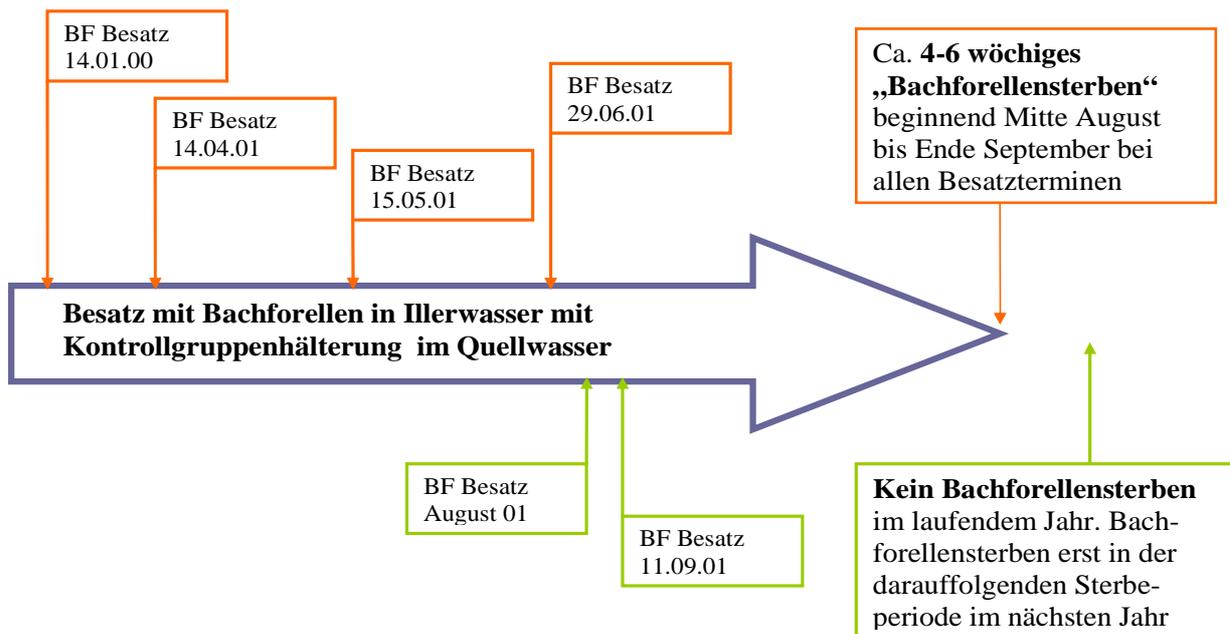
#### *Physikalisch-chemische Ursachen*

Die Auswertung der Messwerte von sogenannten physikalisch-chemischen Grundparametern (Wassertemperatur; Leitfähigkeit; Trübungsgrad; pH-Wert; Konzentrationen von Sauerstoff, Ammonium, Nitrit und Nitrat; BSB<sub>5</sub>-Wert) betroffener Gewässer ergab keine Hinweise für eine unmittelbare oder mittelbare Beteiligung am Krankheitsgeschehen (Hanfland & Ruppe, 2003; Baath, 2003). Ebenso scheint die natürliche UV-Strahlung keinen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen zu haben (Born, 2003). Allerdings wurde im Jahr 2005 festgestellt, dass eine Bestrahlung des Illerwassers mit UV-Licht (UVC I > 400 J/m<sup>2</sup>) das Bachforellensterben verhinderte (Ruppe, 2006, persönliche Mitteilung). Dieser Sachverhalt kann einerseits dahingehend gewertet werden, dass möglicherweise dem Bachforellensterben doch eine infektiöse Ursache zugrunde liegt, andererseits können UV-Strahlen Moleküle und damit deren Wirkung in biologischen Systemen verändern (Cleaves & Miller, 1998).

#### *Besatzzeitpunkt*

Der Zeitpunkt des Besatzes von Bachforellen in die Versuchsanlage scheint eine wesentliche Rolle für das Auftreten des Bachforellensterbens zu spielen. In einer

Versuchsreihe, die im Jahr 2001 an der Versuchsstation an der Iller (Kempten) durchgeführt worden ist, erkrankten nur Fische, die am 29.06 und früher eingesetzt wurden. Bachforellen, die am 01.08 und am 11.09 dem Illerwasser ausgesetzt wurden, zeigten in diesem Jahr keine Krankheitssymptome (Born, 2003). Da das Bachforellensterben im Jahr 2001 bereits Mitte August auftrat, war möglicherweise die Expositionsdauer der Tiere für die Manifestation klinischer Symptome zu kurz (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Einfluss des Besatzzeitpunktes auf die klinische Manifestation des Bachforellensterbens an der Versuchsanlage Iller in Kempten (2000/2001)**

### *Speziesspezifität*

Den bislang vorliegenden Untersuchungen zufolge scheint das (die) Sterben auslösende(n) Agens (Agentien) entweder sehr Bachforellen-spezifisch zu sein oder diese Fischart ist dafür besonders empfänglich. Während unterschiedliche Bachforellenstämme bzw. -typen (Bachforelle, Seeforelle (*Salmo trutta lacustris*), Brown trout, „Rotgetupfte“, „Mischlinge“) nach Exposition im Illerwasser erkrankten und die typischen Symptome aufwiesen, war dies bei parallel gehaltenen Äschen (*Thymallus thymallus*), Nasen (*Chondrostoma nasus*), Barben (*Barbus barbus*) oder Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nicht der Fall (Born, 2003).

### *Viraler, bakterieller, parasitärer Einfluss*

Hinweise auf virale, bakterielle und/oder parasitäre Ursachen des Bachforellensterbens konnten bislang nicht gefunden werden (Baath, 2003). Darüber hinaus wurde bei Kontakthälterung von Kontrollfischen mit erkrankten Fischen keine Infektion der Kontrollfische festgestellt (Born, 2003; Baath, 2003).

### *Ökotoxikologische Untersuchungen*

Untersuchungsansätze zur Feststellung eines toxischen Einflusses auf das Bachforellensterben mit dem Early Life Test (Schubert, 2001) lieferten keinen signifikanten Hinweis auf eine Schädigung der Bachforellen.

Als wissenschaftlicher Ansatz zur näheren „Charakterisierung des Bachforellensterbens“ wurde in dieser Studie die Beurteilung des Fließgewässers anhand von Gewässerproben gewählt. Ausgewählte Möglichkeiten zur Beurteilung von Oberflächengewässern werden im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3 **Beurteilung von Oberflächengewässern**

Zur Beurteilung des Gewässerzustandes werden in Anlehnung an die EG-Wasserrahmenrichtlinie (EG-WRRL; EU, 2000) verschiedene ökologische und chemisch-physikalische Komponenten herangezogen (siehe Abbildung 3).

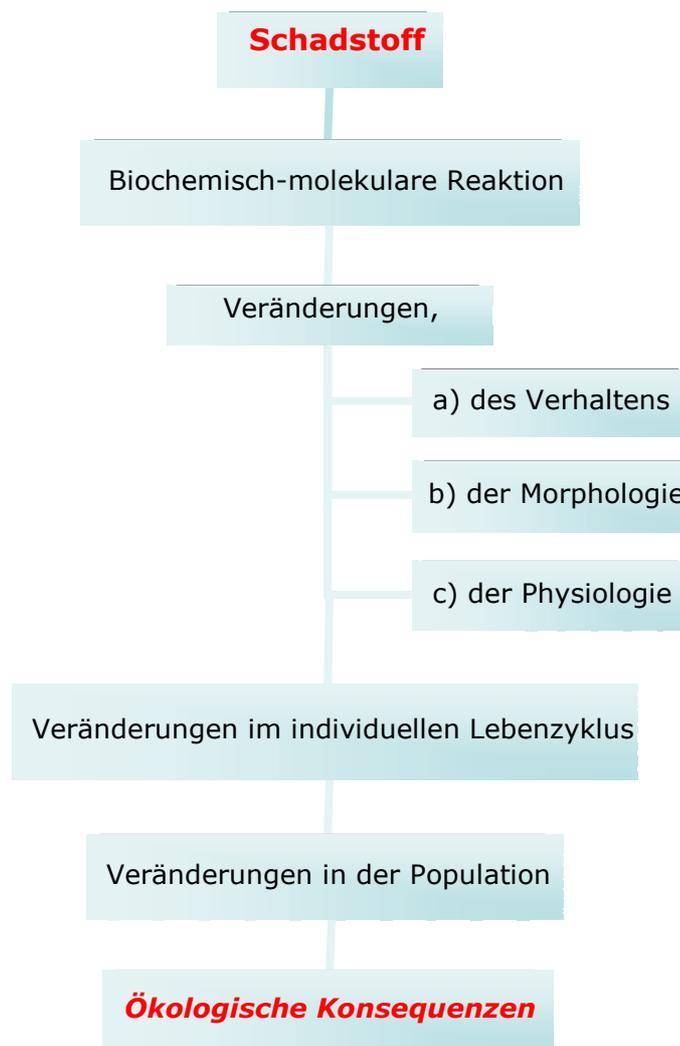
<b>GEWÄSSERZUSTAND</b>	<p><b><u>Ökologische Komponenten</u></b></p> <p>Beurteilung von</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydromorphologie</li> <li>- Phytobenthos / Makrophyten</li> <li>- Phytoplankton</li> <li>- Makrozoobenthos</li> <li>- Fische</li> </ul>
	<p><b><u>Chemisch-physikalische Komponenten</u></b></p> <p>Messung von Temperatur, pH-Wert, Leitfähigkeit, Sichttiefe bzw. Trübungsgrad (NTU)</p> <p>Nachweis von spezifischen Substanzen</p>

**Abbildung 3: Kriterien zur Beurteilung des Gewässerzustandes (angelehnt an EG-WRRL; EU, 2000)**

Die Gesamtbetrachtung dieser einzelnen Komponenten gibt den Zustand des Gewässers wieder.

### 3.1 Ökologischer Zustand von Gewässern

Die Wirkung von Noxen (Schadstoffe) beruht auf der Auslösung verschiedener biochemischer Reaktionen, als deren Folge es zu Veränderungen der Morphologie, des Verhaltens und anderer physiologischer Lebensabläufe kommt (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Wirkungsvernetzung von umweltaktiven Stoffen auf verschiedenen biologisch-ökologischen Ebenen (abgeändert nach Fent, 2007)**

Veränderungen im individuellen Lebenszyklus können zu Verschiebungen innerhalb der Populationen von Phytobenthos, Phytoplankton bzw. Makrophyten, Makrozoobenthos und Fischen führen. Dabei können Verschiebungen innerhalb

einer Population auch Folgen für andere Populationen nach sich ziehen, wodurch sich ökologische Konsequenzen ergeben können (Schmutz et al., 2000). So kann es z.B. durch Staurationsspülung im Gewässer oberlauf (Kolmation der Sohle) zu einem Rückgang von Makroinvertebraten führen; da diese Nahrungsquelle für juvenile Fische sind, hat dies eine Auswirkung auf die Fischpopulation (Schmutz et al., 2000). Aus diesem Beispiel geht hervor, dass die Erfassung der ökologischen Komponenten zur Beurteilung des Gewässerzustandes von großer Bedeutung sind, auch wenn dies einen hohen zeitlichen und personellen Aufwand mit sich bringt. Im Einzelnen können folgende Parameter berücksichtigt werden:

Zur Beurteilung des **hydromorphologischen Zustandes** eines Gewässers werden dessen Morphologie und Hydrologie, die Substratverhältnisse, die Ausbildung der Ufervegetation, das gewässergeprägte Umland sowie die Konnektivitätsverhältnisse im Wasserkörper herangezogen (Ward & Stanford, 1995a). Obwohl diese Daten auch physikalische Parameter beinhalten, gehen diese dennoch in die Gesamtbeurteilung des ökologischen Gewässerzustandes ein (Jungwirth et al., 2003).

Als biologische Qualitätskomponenten für Fließgewässer gelten das Phytobenthos, Makrophyten, Phytoplankton, das Makrozoobenthos, sowie die Fischfauna.

Diese können nach den bewohnten Habitaten im Gewässer eingeteilt werden. Dabei lassen sich die bodennahen Zönosen und die Freiwasserzönosen separat gruppieren. Unter Benthos versteht man dabei die Gesamtheit aller am Grund eines Gewässers (dem Benthos) lebenden „Pflanzen“ (Phytobenthos und Makrophyten) und „Tiere“ (Zoobenthos).

Die Arten von Gefäßpflanzen, die sich an das Leben im Wasser angepasst haben, sowie alle mit bloßem Auge sichtbare Pflanzen werden als **Makrophyten** bezeichnet. Dabei unterscheidet man submerse Pflanzen (Unterwasserpflanzen) und Schwimmblattpflanzen (z.B. Seerosen).

Auch die Makrophytenflora wird zur Beurteilung des trophischen bzw. saprobiellen Zustandes eines Gewässers herangezogen (Rott et al., 1997), und hat sich vor allem bei stehenden Gewässern bewährt. Grundlage hierfür sind die sogenannten „Makrophyten – Trophieindices“ für stehende und fließende Gewässer (Melzer, 1988; Melzer et al., 1985; Schneider, 2000).

Als pflanzliche Organismen sind Makrophyten dabei vor allem sehr gute Trophie-Indikatoren (Cook et al., 1974; Casper & Krausch, 1980; 1981).

Sie reagieren aber auch deutlich auf andere anthropogen bedingte Veränderungen der natürlichen Bedingungen im Fließgewässer. So können Eingriffe in das Abflussregime, wie z.B. Potamalisierung und Stau hervorragend indiziert werden. Die Ausprägung der Makrophytenvegetation spiegelt deutlich die strukturellen Bedingungen im Gewässer, wie z.B. Substratdiversität und -dynamik, oder den Verbauungsgrad der Ufer und zum Teil auch der Gewässersohle wider (Rothmaler, 2002).

Zwei Eigenschaften machen Makrophyten zu besonders wertvollen Indikatoren. Dies ist zum einen ihre Langlebigkeit. Sie bleiben meist über mehrere Vegetationsperioden an denselben Standorten und können somit die Standortbedingungen über einen erheblich längeren Zeitraum integrieren als die kurzfristig reagierenden Komponenten. Es werden somit keine Momentaufnahmen bewertet. Zum anderen sind Makrophyten ortskonstant und können dadurch Belastungen und anderen Umwelteinflüssen nicht ausweichen. Belastungsquellen können somit sehr genau lokalisiert und deren Wirkungsbereich entlang einer Fließstrecke ausgewiesen werden.

Daneben können Aussagen zur Versauerung abgeleitet werden (Mooser & Pall, 2008).

Unter **Phytobenthos** versteht man die Pflanzen der Gewässerböden (Benthal). Dieser Bewuchs wird hauptsächlich von Algen gebildet, aber auch höhere Pflanzen wie die Kormophyten werden dazugezählt. Aus der Zusammensetzung von Phytobenthos kann auf den trophischen und saprobiellen Status eines Gewässers geschlossen werden (Rott et al., 1997).

Neben dem Makrophytobenthos, das sich aus den Vertretern der Abteilungen Chlorophyta (Grünalgen), Rhodophyta (Rotalgen) und Phaeophyta (Braunalgen) zusammensetzt, gibt es noch ein Mikrophytobenthos aus mikroskopisch kleinen Cyanobakterien ("Blualgen") und Kieselalgen (Diatomeen). Innerhalb des Makrophytobenthos unterscheidet man nach ihrer Lebensform die perennierenden ("ausdauernden") Algenarten, die meist eine komplexe Thallustruktur aufweisen und mehrere Jahre leben, von den ephemeren Spezies, die recht einfach aufgebaut sind und gewöhnlich mehrere Generationen pro Jahr entwickeln. Semiperennierend sind die teilweise überdauernden Formen wie

beispielsweise die *Cystoseira*-Arten, die nach der Fortpflanzungszeit ihre Äste abwerfen und nur mit den basalen Teilen überwintern (Rott et al., 1997).

Grundsätzlich eignet sich Phytobenthos gut, um stoffliche Belastungen in einem Gewässer anzuzeigen (sowohl organische als insbesondere auch Nährstoffbelastungen). Auch Eingriffe in das hydrologische Regime (Ausleitung, Schwall, Rückstau) lassen sich bis zu einem gewissen Grad abbilden, während Eingriffe in die Morphologie eines Gewässers (im Wesentlichen Verbauungen) offensichtlich nur sehr bedingt bzw. in extremen Fällen maßgeblichen Einfluss auf die Artenzusammensetzung der Aufwuchsalgen ausüben (Rott et al., 1997).

Als Zoobenthos wird die bodenlebende, tierische Lebensgemeinschaft in Gewässern bezeichnet. Hierbei wird zwischen Makrozoobenthos und Mikrozoobenthos unterschieden.

Unter **Makrozoobenthos** werden die tierischen Organismen bis zu einer definierten Größe (mit dem Auge noch erkennbar) zusammengefasst. Diese Gruppe umfasst Gewässerorganismen, wie z.B. Schwämme, Hohltiere, Krebse, Muscheln, Schnecken, Strudelwürmer, Egel und Insektenlarven.

Makrozoobenthoserhebungen liefern Anhaltspunkte zu Versauerung und organischer Belastung, sowie quantitativen Schadeinflüssen (z.B. Dezimierung der Fauna aufgrund von Schwalleinflüssen).

Die Makrozoobenthosfauna wird weltweit für gewässerökologische Gutachten am häufigsten verwendet. Grund dafür ist, dass die Makrozoobenthosfauna Störungen anderer Populationen (z.B. Bakterien, Pilzen und Algen), die der Nahrungskette angehören, widerspiegelt. Das Vorkommen von *Austropotamobius torrentium* zeugt beispielsweise von sehr guter Wasserqualität hinsichtlich dessen Trophie. Die Resultate einer Makrozoobenthosaufnahme können durch Gewässerbewirtschaftung (z.B. ordentlicher Betrieb einer Laufwasserkraftanlage) kaum beeinflusst werden (Jungwirth et al., 2003).

Das **Mikrozoobenthos** (< 63 µm) umfasst die mikroskopisch kleinen und nur mit besonderen optischen Hilfsmitteln wahrnehmbaren Organismen wie Ciliaten und Rotatorien (Tümpling, 1999). Rotatorien werden, z.B. für die

Charakterisierung der Nährstoffbelastung in Seen oder für Toxizitätstests herangezogen (Scholz et al., 2005).

Organismen, die sich im Freiwasser von Gewässern aufhalten, werden hinsichtlich ihres Fortbewegungstypes unterschieden.

Das **Nekton** umfasst dabei die aktiv schwimmenden Organismen, die auch gegen Wasserströmungen anschwimmen können. Es umfasst nur Tiere, wie Fische, Meeressäuger und pelagische Cephalopoden.

Zum **Plankton** zählen alle Organismen, die im Pelagial leben und deren Eigenbewegungen im Vergleich zu den Bewegungen des Wasserkörpers unbedeutend sind. Das heißt, sie werden passiv durch Strömungen verfrachtet und schweben im Wasserkörper. Ihre Eigenbewegungen dienen dem Erhalt des Schwebezustandes und in einigen Fällen zur Höhenregulierung in der Wassersäule.

Als **Phytoplankton** wird photoautotrophes Plankton bezeichnet. Hierzu zählen vor allem Kieselalgen (z.B. *Bacillariophyta*), Grünalgen, Goldalgen, Dinoflagellaten und Cyanobakterien. Phytoplankton baut als Primärproduzent mit Hilfe der Photosynthese aus Kohlenstoffdioxid und Nährstoffen seine Körpersubstanz (Biomasse) auf. Das Phytoplankton ist damit die Basis der autochtonen Nahrungspyramide in stehenden und langsam fließenden Gewässern und ist direkte Nahrungsgrundlage von Zooplankton (Sommer, 1997).

Zusammenfassend spiegeln das Phytoplankton und die Makrophyten die trophische Situation des Gewässers wider.

Alle planktischen Organismen, die keine Photosynthese betreiben, sondern sich von anderen Organismen ernähren, werden zum **Zooplankton** gezählt. Dabei wird zwischen herbivoren und carnivoren Zooplanktern unterschieden. Zum herbivoren Zooplankton zählen jene Arten, die sich direkt vom Phytoplankton ernähren. Zooplankter, die sich von anderem Zooplankton ernähren, werden als carnivor bezeichnet. Diese Fraßbeziehungen sind in der Nahrungskette miteinander gekoppelt (Sommer, 1997).

Als Besonderheit gibt es einige Organismen, die die Fähigkeit besitzen, sowohl Partikel oder Organismen aufzunehmen als auch Photosynthese zu betreiben. Diese werden als mixotroph bezeichnet (z.B. Flagellaten). Wie groß ihr Anteil im Nahrungsgefüge ist, hängt von der Beschaffenheit des Gewässers ab.

Durch die Analyse der **Fischfauna** können wertvolle Rückschlüsse auf hydrologische und strukturelle Defizite eines Gewässers und zu Vernetzung und Durchgängigkeit gezogen werden. Die Daten einer Fischbestandserhebung werden dabei nach verschiedenen Kriterien (z.B. Abundanz, Dominanz und Populationsaufbau) beurteilt. Diese Ist-Bestandsdaten werden mit Referenzdatensätzen von gleichen Ökoregionen verglichen, Abweichungen werden ermittelt und der fischökologische Zustand des untersuchten Gewässerbereiches festgestellt. Beispielsweise zeugt eine natürliche Population von Lachsen in einem Binnengewässer von einer ungehinderten Migrationsmöglichkeit zwischen dem Meer und dem Süßwasser (Jungwirth et al., 2003).

Bei der Beurteilung des Gewässerzustandes werden die verschiedenen Qualitätskomponenten miteinander verknüpft. Im Rahmen der integrativen Zustandsbewertung des ökologischen Zustandes gilt das „worst case“ Prinzip. Dies bedeutet, dass die biologische Komponente mit dem schlechtesten Zustand ausschlaggebend für die Gesamtbewertung des zu beurteilenden Wasserkörpers ist.

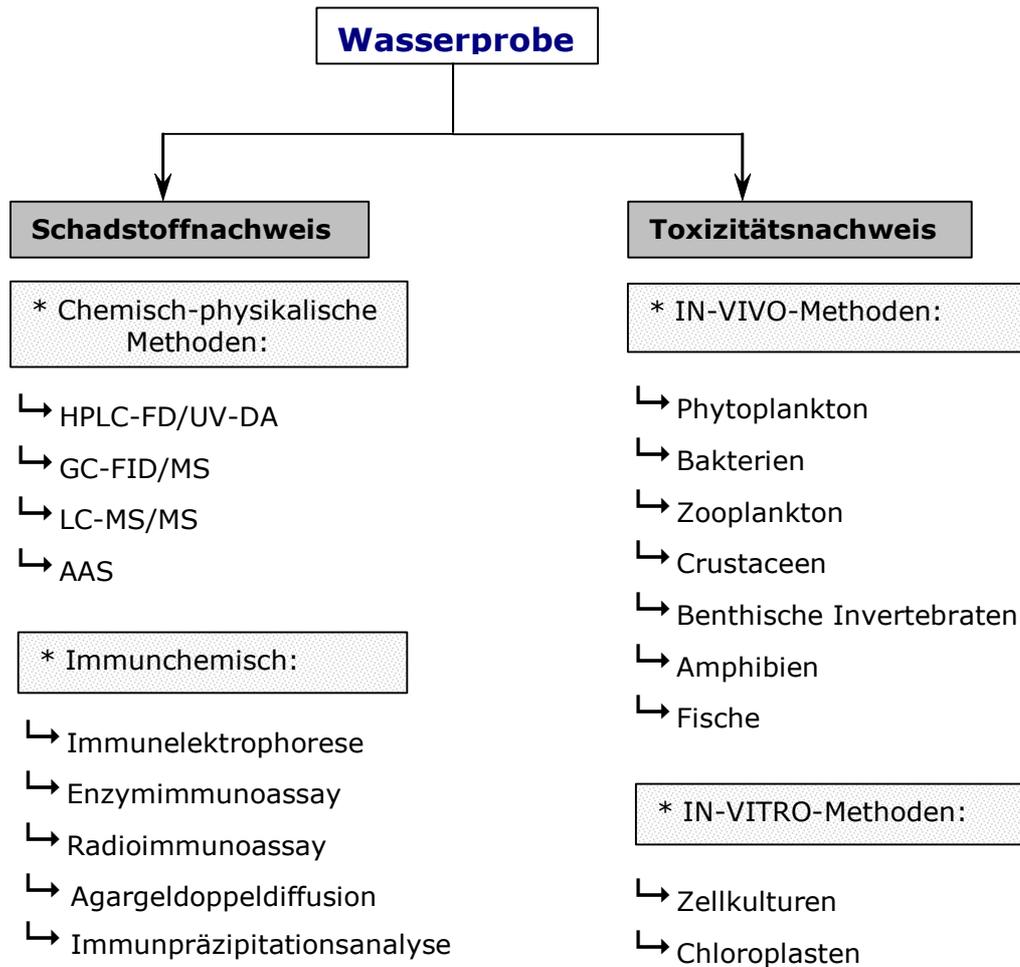
### **3.2 Physikalisch-chemischer Zustand von Gewässern**

Zur Beurteilung des physikalisch-chemischen Zustandes von Gewässern werden physikalische, chemisch-analytische und biologische Methoden herangezogen. Während die beiden erstgenannten Verfahren exakte Messwerte liefern, die bestimmten Parametern (z.B. Temperatur, definierter Schadstoff) zuzuordnen sind, erzielt man mit biologischen Methoden Ergebnisse, die die integrale Wirkung unterschiedlichster Faktoren auf Testorganismen (z.B. Wachstumshemmung) widerspiegeln.

In die Gesamtbeurteilung eines Gewässers müssen die Meßwerte von Wassertemperatur, elektrischer Leitfähigkeit, pH-Wert und Sichttiefe einfließen. Einzelmessungen haben dabei nur geringe Aussagekraft, vielmehr ist eine kontinuierliche Aufzeichnung erforderlich. Der Wassertemperatur kommt dabei eine nicht unerhebliche Bedeutung zu. Um beispielsweise eine gesunde Population von Flusskugelmuscheln (*Sphaerium rivicola*) oder Edelkrebsen (*Astacus astacus*) nachhaltig zu erhalten, sind im Jahresverlauf Gewässertemperaturen von über 20 °C erforderlich, um die Fortpflanzung zu gewährleisten (Jungwirth et al., 2003).

Als weitere wichtige Beurteilungskriterien werden der Sauerstoffgehalt, der Biologische Sauerstoffbedarf (innerhalb 5 Tagen), der Phosphatgehalt, der Nitratgehalt, und die Wasserhärte herangezogen. Während die meisten dieser Parameter bereits vor Ort bestimmt werden können, sind für den Nachweis bestimmter unerwünschter Stoffe oder von „Toxizitäten“ zum Teil sehr aufwändige Laboruntersuchungen notwendig. Welche Möglichkeiten gegeben sind, ist in Abbildung 5 zusammengefasst. Zum exakten Stoffnachweis werden heute vor allem physikalisch-chemische (LC-MS/MS) und enzymimmunologische Verfahren eingesetzt. Die erhaltenen Konzentrationen von Inhaltsstoffen werden mit Literaturangaben bzw. mit festgelegten Konzentrationsgrenzen verglichen, um die Toxizität der Wasserprobe zu beurteilen. Nachteilig bei derartigen Analysen ist die mangelnde Erfassung der Wirkung von einzelnen Stoffkomponenten auf biotische Systeme. Kumulierende Wirkungen von nicht grenzwertigen Einzelstoffen werden nicht erfasst (Fent, 2007).

Zur Bestimmung des „Toxizitätsgrades“ eines Gewässers mit biologischen Methoden werden unterschiedliche Testorganismen (*In-vivo*-Systeme) oder Zellsysteme (*In-vitro*-Systeme) eingesetzt.



**Abbildung 5: Auswahl an Labormethoden zur Erfassung von Gewässergüten**

Bei den *in-vivo*-Methoden werden Organismen gezielt der zu untersuchenden Wasserprobe ausgesetzt und dann beobachtet, ob sich ihr Verhalten ändert bzw. ob dadurch Krankheiten hervorgerufen werden. *In-vitro*-Methoden erfassen das toxische Geschehen auf zellulärer Ebene. Nach Behandlung der Zellen mit dem Wasser oder Wasserextrakten werden die Zellmorphologie oder/und Zellstoffwechsellleistungen als Kriterium zur Beurteilung der „Toxizität“ herangezogen. Beide Methoden können auch additive Effekte erfassen. Allerdings liegen die Nachweisgrenzen für den Einzelstoff deutlich höher als bei chemisch-physikalischen Verfahren (Fent, 2007).

Die Tabelle 1 stellt eine Auswahl von Organismen vor, die für biologische Toxizitätstests verwendet werden. Die aufgeführten Prüfparameter dienen als

---

Kriterien zur Beurteilung der „Toxizität“. Die Ausprägung und Stärke einer Wirkung hängt dabei vom Wirkstoff bzw. von den Wirkstoffen und vom Organismus und deren Wechselwirkung mit der abiotischen und biotischen Umwelt zusammen (Pestemer & Pucelik-Günther, 1997; 1999; Pestemer et al., 1998; Brandao et al., 1992). Der Grad der Wirkung steht hierbei in einer komplexen Abhängigkeit zwischen verschiedenen Parametern, wobei häufig Dosis und Expositionsdauer ausschlaggebend sind. Beispielhaft sind in Tabelle 1 EC<sub>50</sub>- und/oder LC<sub>50</sub>-Werte für Cadmium und Atrazin aufgeführt. Diese sind nur als grobe Richtwerte zu betrachten, da im natürlichen Gewässer verschiedene physikalische und/oder chemische Parameter (z.B. pH-Wert) deren Wirkung beeinflussen (Fent, 2007).

**Tabelle 1: Sensibilität ausgewählter Testorganismen gegenüber Cadmium und Atrazin (angelehnt an Oros & Werner, 2005; Burton, 1991)**

Biologische Stufe/Testobjekt	Prüfparameter	LC <sub>50</sub> [mg/L] bzw. EC <sub>50</sub>		LC <sub>50</sub> [mg/L] bzw. EC <sub>50</sub>	Literatur
		<b>Cadmium</b>	<b>Literatur</b>	<b>Atrazin</b>	
		(Expositionsdauer)		(Expositionsdauer)	
<b>Phytoplankton</b>					
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Wachstum, ( <sup>14</sup> C-Aufnahme, Chlorophyll-Fluoreszenz)	0,6 [mg/L] (48h)	Pardos et al. (1998)	0,235 [mg/L] (96h)	Fairchild et al. (1997)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Wachstum, ( <sup>14</sup> C-Aufnahme, Chlorophyll-Fluoreszenz)	0,039 [mg/L] (72h)	Muysen (2001)		
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Wachstum, ( <sup>14</sup> C-Aufnahme, Chlorophyll-Fluoreszenz)	0,44 [mg/L] (96h)	Burhenne (2000)	0,021 [mg/L] (96h)	Kirby & Sheahan (1994)
<b>Bakterien</b>					
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Lumineszenz	0,38 [mg/L] (48h)	Thomulka et al. (1993)		
<i>Pseudomonas putida</i>	Wachstum	0,72 [mg/L] (6h)	Slabbert (1986)	>40 [mg/L] (24h)	Koutny & Zaoralkova (2005)
<i>Vibrio fischeri</i>	Biolumineszenz	15,2 [mg/L] (48h)	Schmitz et al. (1998)	0,040 [mg/mL] (48h)	Tchounwou et al. (2000)
<b>Zooplankton</b>				~ 0,1 - 0,5 [mg/l] (96h) Fent (2007)	
<i>Colpidium campylum</i>	Wachstum	0,205 [mg/L] (24h)	Madoni et al. (1992)		
<i>Brachionus spec.</i>	Letalität	0,240 [mg/L] (24h)	McDaniel & Snell (1998)		
<b>Kleinkrebse/Crustaceen</b>					
<i>Daphnia magna</i>	Letalität	0,005 [mg/L] (48h)	Bossuyt & Janssen (2003)	6,9 [mg/L] (48h)	Mark & Solbe (1998)
<i>Daphnia pulex</i>	Reproduktionstest			1-5 [mg/L] (28 days)	Schooper & Lampert (1977)
<i>Gammarus pulex</i>	Letalität,	1,41 [mg/L] (48h)	Stuhlbacher & Maltby (1992)	1,5 [mg/L] (48h)	Munn & Gilliom (2001)
<i>Asellus aquaticus</i>	Letalität	0,8 [mg/L] (96h)	Wicklum et al. (1997)		

Biologische Stufe/Testobjekt	Prüfparameter	LC <sub>50</sub> [mg/L] bzw. EC <sub>50</sub>		LC <sub>50</sub> [mg/L] bzw. EC <sub>50</sub>	
		<b>Cadmium</b>	<b>Literatur</b>	<b>Atrazin</b>	<b>Literatur</b>
		(Expositionsdauer)		(Expositionsdauer)	
<b>Benthische Invertebraten</b>					
<i>Tubifex tubifex</i>	Letalität	6,8 [mg/L] (48h)	Fent (2007)		
<i>Dreissena polymorpha</i>	Letalität	388 [mg/L] (48h)	Kraak et al. (1992)		
<i>Polycelis felina</i>	Letalität	36 [mg/L] (48h)	Fent (2007)	1,05 [mg/L] (48h)	Munn & Gilliom (2001)
<i>Ephemerella ignita</i>	Letalität	19 [mg/L] (48h)	Fent (2007)		
<i>Dinocras cephalotes</i>	Letalität	1500 [mg/L] (48h)	Fent (2007)		
<i>Calopteryx splendens</i>	Letalität	3800 [mg/L] (48h)	Fent (2007)		
<b>Amphibien</b>					
		LC <sub>50</sub>			
<i>Xenopus laevis</i>	Letalität - Embryonen/Larven	0,012 [mg/L] (2d)	Nebeker et al. (1995)	25,6 [mg/L] (24h)	Fort et al. (2004)
<b>Macrophyten</b>					
		EC <sub>50</sub>			
<i>Lemna minor</i>	Wachstum (Blattzahl, Chlorophyll a, Biomasse, Trieblänge)	< 1,0 [mg/L] (96h)	Uysal (2007)	0,153 [mg/L] (96h)	Fairchild et al. (1997)
<b>Fische</b>					
		LC <sub>50</sub>			
<i>Pimephales promelas</i>	Letalität der Embryonen/Larven, Teratogenität	0,4 [mg/L] (7d)	Baer et al. (1999)	15 [mg/L] (96h)	Munn & Gilliom (2001)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Akuter Toxizitätstest	0,11 [mg/L] (96h)	Castano et al. (1996)	11,5 [mg/L] (96h)	Munn & Gilliom (2001)
<i>Poecilia reticulata</i>	Chronische Toxizität über Lebenszyklus			4,3 [mg/L] (96h)	Munn & Gilliom (2001)
<b>Zellkulturen</b>					
		LC <sub>50</sub>			
<i>Adrenocortical cells (Rainbow trout)</i>	Letalität			4,5 – 8,8 [mg/L] (96h)	Bisson & Hontela, 2002
<i>RTG-2-cells Rainbow trout</i>	Letalität	6,2 [mg/L] (48h)	Castano et al., 1995		

### *Bakterien*

Schnelle Umsatz- und Wachstumsraten führten zum Einsatz von aquatischen Bakterien als Testobjekt in Ökotoxizitätstests. Neben einfachen Wachstumshemmtests werden Reaktionen der Stoffkreisläufe (z.B. Abbau von Glucose, ATP-Produktion, Sulfatreduktion, Denitrifikation) zur Objektivierung toxischer Wirkungen genutzt (Goatcher et al., 1984; Capone et al., 1983; Fenchel & Blackburn, 1979; D`Eustachio & Johnson, 1968). Allerdings spiegeln die mit Bakterientestsystemen erhaltenen Ergebnisse nur bedingt den Zustand eines Gewässers wider. Dies hängt damit zusammen, dass Bakterien als Prokaryoten andere zelluläre Strukturen aufweisen als Eukaryoten, was sie einerseits gegenüber bestimmten Stoffen (z.B. Antibiotika) empfindlicher macht; andererseits eine vergleichsweise hohe Tenazität gegenüber anderen Stoffen aufweisen. Aus diesen Gründen sind Resultate von Toxizitätstests, die mit Bakterien erzielt worden sind, nur sehr bedingt auf Eukaryoten übertragbar.

### *Protozoen*

Protozoen sind eine wichtige Komponente in der Nahrungskette von Süßwassersystemen. Sie tragen zur Umwandlung von organischem Material, insbesondere auch Schadstoffen (polycyclische Verbindungen), in der Wassersäule und des Sediments bei (Bringmann & Kühn, 1980; Fenchel & Blackburn, 1979; Dive et al., 1971). Andererseits reagieren Protozoen auch sehr sensitiv auf bestimmte Schadstoffe. Deviller et al. (1995) konnten dies bei 59 umweltaktiven Stoffe nachweisen.

Der meist genutzte Protozoentest ist der „*Colpidium campylum* bioassay“ (Curds & Cockburn, 1968), der ein breites Anwendungsspektrums besitzt. Philippo (1990) zum Beispiel konnte in verschiedenen natürlichen Oberflächengewässern die Wirkung der Schwermetalle Kupfer, Cadmium, Nickel und Zink bis zu einer Konzentration von 0,125 mg/mL nachweisen. Der Bioassay wurde dabei nach den Anleitungen von Dive et al. (1989b) und Vasseur et al. (1988) durchgeführt.

### *Phytoplankton*

Das Phytoplankton stellt die Basis für die Nahrungskette pelagischer und litoraler Systeme dar. Das Phytoplankton gilt als besonders sensitiv auf eine Vielzahl von umweltaktiven Stoffen, insbesondere auf Herbizide (Fent, 2007). Deshalb kommt den Phytoplanktontests eine besondere Bedeutung zu.

Die Hemmung von Stoffwechselfvorgängen, wie zum Beispiel störende Wirkungen auf die Photosynthese wird für Toxizitätstests auf der Basis von Phytoplankton, als Parameter verwendet. Auch die Reduktion der Verwertung von radioaktiv markierter  $^{14}\text{C}$ -Glucose, oder die Chlorophyll-a-Fluoreszenz dient zur Objektivierung einer potentiellen Schädigung.

Glutaraldehyd, das in verschiedenen Bereichen (z.B. Medizin, Ölderivatisierung) eingesetzt wird, hemmt das Wachstum von *Pseudokirchneriella subcapitata* bereits bei einer Konzentration von 1 mg/L und stellt laut Sano et al. (2005) einen potentiellen Umweltschadstoff dar.

### *Fische*

Fische werden schon seit einigen Jahrzehnten für Toxizitätstests herangezogen. Dabei wird zwischen dem „akuten Fischtoxizitätstest“, dem „chronischen Fischtoxizitätstest“, dem „Early Life Stage Test (ELST)“ und dem „Life Cycle Test“ (ganzer Lebenszyklus) unterschieden (Fent, 2007).

#### - Akute Fischtoxizität (OECD Guideline 203, DIN 38412)

Das Prinzip des akuten Fischtoxizitätstests besteht in der Ermittlung der lethalen Wirkung abgestufter Konzentrationen von Prüfsubstanzen auf juvenile Fische nach 24, 48 bzw. 72 Stunden. Der prozentuale Anteil der Fische wird aufgenommen und der  $\text{LC}_{50}$ -Wert (lethale akute Konzentration) berechnet (Fent, 2007).

#### - Chronische Fischtoxizität

Im verlängerten Fischtest wird die chronische Wirkung von Stoffen während einer mindestens 14-tägigen Exposition studiert. Ziel ist es, das sogenannte „no observed effect level“ (NOEL) zu ermitteln. Untersucht werden dabei das Aussehen der Probanden (Farbänderungen), sowie die Futteraufnahme und das Schwimmverhalten (Lethargie). Ein Hauptaspekt bei derartigen Toxizitätstests ist die Generationszeit, welche unterschiedlich lange andauern kann (z.B. Dickkopfelritze = 275–300d). Die Exposition erfolgt wie beim „Life cycle test“ vom Ei über das Larvenstadium zum Juvenil- und Adulttier bis zu dessen Reproduktion (Fent, 2007).

#### - Early life stage test (OECD Guideline 210)

Besonders Fische im frühen Entwicklungsstadium reagieren sehr sensibel auf Umwelttoxine (McKimm, 1977). Aus dieser Erkenntnis entstanden die sogenannten „Early life stage tests“, die bereits in den 70er Jahren von Schimmel et al. (1974) mit der Fischart „longnose killifish“ (*Cyprinodon variegatus*) angewandt wurden, um die Wirkung von Umwelttoxinen einzuschätzen.

Der „Early life stage test“ nutzt die Wachstums-, Mortalitäts- und Schlupfrate und die Analyse von Deformationen an Fischlarven, um Aussagen zur Toxizität der Prüfsubstanz zu erhalten. Im „early – life – test“ (Fent, 2007; Oros & Werner, 2005; Schubert, 2001) zeigte die Spezies Regenbogenforelle bei der Konzentration von 2,5 µg/mL Glutaraldehyd schlagartig einen 97 %igen Aktivitätsverlust (Sano et al., 2005).

#### - Life cycle test

Der „Life cycle test“ objektivierte die chronische Wirkung einer umweltaktiven Substanz über den ganzen Lebenszyklus einer Fischart. Mit diesem Test lassen sich Rückschlüsse auf die Fortpflanzung und Qualität der Nachkommen ziehen. Aus der Befruchtungsquote, der Eiproduktion, den Schlupf- und Überlebensraten, sowie aus den Längen- und Gewichtsentwicklungen eines vollständigen Lebenszyklus werden die NOEL-Werte (No observed effect level) bestimmt. Wegen des großen Aufwandes werden solche Tests nur bei ökotoxikologisch relevanten Chemikalien durchgeführt. (Fent, 2007)

#### *Zellkulturen*

Zellkultursysteme zur Untersuchung der Wirkung von umweltaktiven Stoffen haben sich aus toxikologischer sowie aus ökonomischer und ethischer Sicht bewährt. In-vitro Systeme bieten zudem Vorteile in der direkten Erfassung der Wirkung auf molekularer Ebene (Fent, 2007).

Fischzellkulturen wurden ursprünglich entwickelt, um Fischviren (z.B. VHS; IPN; IHN) zu untersuchen. Dieser Anwendungsbereich hat auch heute noch große Bedeutung. Die meisten bekannten Fischzellkulturen wachsen adhärent, d.h. die Zellen haften sich zum Wachsen an den Boden des Kulturgefäßes. Nur wenige Linien werden in Suspension kultiviert. Die verwendeten Nährmedien für

Fischzellen entsprechen in vielen Bestandteilen den für Säugerzellen entwickelten Nährmedien. Auch das Passagieren erfolgt analog den Verfahren bei Säugetierzellkulturen. Der größte Unterschied zwischen Fisch- und Säugetierzellen besteht in der Wachstumstemperatur (Lannan & Winton, 1984). Die meisten Fischzellkulturen haben ein niedrigeres Temperaturoptimum (15 – 20 °C) und wachsen daher auch langsamer als Säugerzellen (Lindl, 2002). Bei Zellkulturen unterscheidet man allgemein primäre und permanente Kulturen, die für unterschiedliche Zwecke verwendet werden.

### *Permanente Zellkulturen*

Subkultivierbare Zellen von Fischen können über längere Zeit in Kultur gehalten werden und eignen sich wegen ihrer leichten Handhabbarkeit für ökotoxikologische Untersuchungen. Diese permanenten bzw. kontinuierlichen Zelllinien besitzen gegenüber primären Zellkulturen den Vorteil der bestehenden Identität und erhöhten Stabilität der Zellen. Eine erhöhte Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten aus den darauf basierenden Tests resultiert daraus.

Eine der ältesten permanenten Zelllinien ist die RTG-2 Zelllinie, die aus den Gonaden der Regenbogenforelle gewonnen wurde und sich gut für ökotoxikologische Tests mit estrogen wirksamen Stoffen (Vitelogenin-Nachweis) einsetzen lässt (Fent, 2007).

### *Primäre Zellkulturen*

Primäre Fischzellkulturen werden aus frisch isolierten Zellen, z.B. aus der Fischleber, direkt angezüchtet. Diese Zellen besitzen oft noch die volle metabolische Kapazität des Ausgangsorgans und eignen sich daher gut für Metabolismusstudien. Aus diesen Eigenschaften resultiert, dass primäre Zellkulturen immer frisch angezüchtet werden müssen (Lindl, 2002).

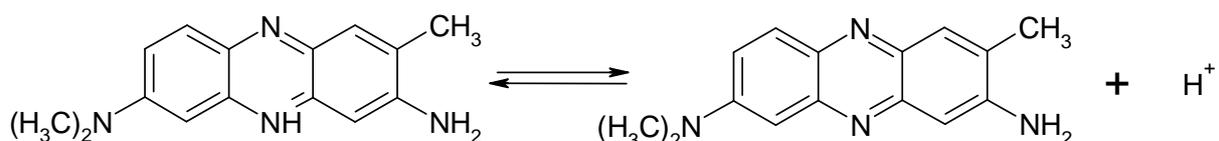
Es gibt verschiedene Wege zur Entwicklung von Primärzellkulturen: Zum einen über die mechanische oder enzymatische Teilung von Gewebe in Einzelzellen, zum anderen durch das Auswachsen von Einzelzellen aus Gewebe- oder Organstücken auf geeignetem Substrat. Während es für Primärkulturen aus normalem Gewebe entscheidend ist, dass diese ein geeignetes Substrat für die Anheftung vorfinden müssen, können Tumorzellen in Suspension überleben. Eine Ausnahme stellen die Zellen des Blutes dar, die bis auf die Monocyten nur in Suspension wachsen (Fent, 2007).

### Ausgewählte zellbiologische Testsysteme zur Beurteilung von Gewässergütern

Die mikroskopische Beurteilung der „Zellvitalität“ ist insbesondere in quantitativer Hinsicht problematisch, da die optische Beurteilung eines Zellschadens nicht selten subjektiv beeinflusst wird. Deshalb sind objektivierbare Kriterien (z.B. intrazelluläre Aufnahme von Farbstoffen; Transformation von Farbstoffen) zur Prüfung der „Zellvitalität“ heranzuziehen. Im aquatischen Bereich werden häufig der Neutralrottest und der MTT-Test verwendet. (Lindl, 2002).

#### Neutralrottest

Der Neutralrottest wurde als in-vitro-Zytotoxizitätstest erstmals von Borenfreund & Puerner (1985) an einer Mäusezelllinie angewandt. Der Test beruht auf einer Aufnahme des wasserlöslichen, leicht basischen Farbstoffes Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7 dimethylaminophenazin) in die Lysosomen intakter Zellen. Die Anreicherung des Farbstoffes in den Zellen entsteht durch Deprotonierung des Farbstoffes im sauren Milieu der Lysosomen (siehe Abbildung 6), oder aus einer Bindung des Farbstoffes an saure Moleküle der lysosomalen Matrix (Barile, 1994). Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran führen zu einer verringerten Farbstoffretention während eines Waschvorganges, die mittels einer photometrischen Messung bestimmt werden kann (Mosmann, 1983).

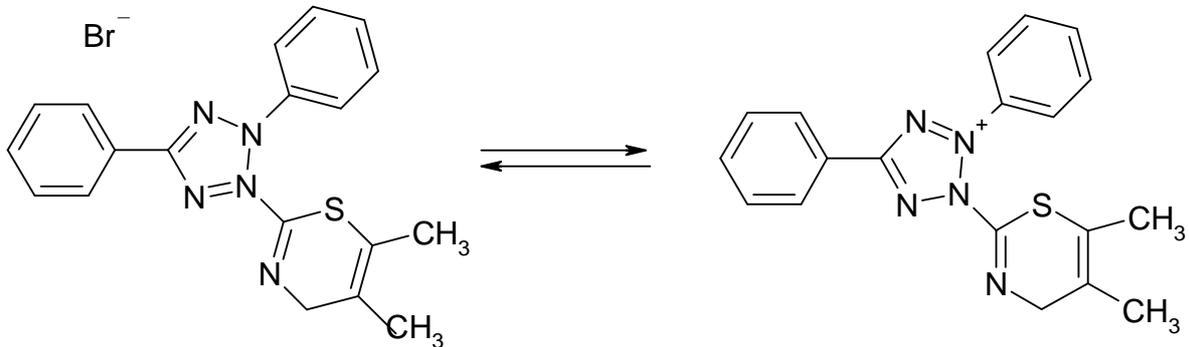


**Abbildung 6: Deprotonierung von 3-Methyl-3-amino-7 dimethylaminophenazin durch pH – Wert Veränderung (blaurote Färbung – pH 6,8 zu orangegelber Färbung – pH 8)**

#### MTT-Test

Zur Bestimmung der „Vitalität“ von Zellen wird häufig der MTT-Test verwendet. Basis dafür ist die Reduktion (siehe Abbildung 7) des gelben Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethyl-diazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) zu einem

blauviolettgefärbten, wasserunlöslichen Formazanderivat (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan).



**Abbildung 7: Reduktion eines Tetrazoliumsalzes (MTT-(3-(4,5-Dimethyldiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid,  $R_{1,2,3}=\text{C}_6\text{H}_6$ ) zu Formazan**

Diese Reaktion wird durch NADPH oder NADH ausgelöst, welches von Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen produziert wird (Berndt et al., 1987). Tote Zellen verursachen keine Umsetzung. Die Menge an gebildetem Farbstoff wird am Photometer gemessen (492 nm) und ist somit ein Indiz für die Zellaktivität („Vitalität“ der Zellen, relative Spaltungsaktivität) (Lindl, 2002).

## C Material und Methoden

### 1 Material

Nachfolgend sind in den Tabellen die für die Arbeit benötigten Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien sowie Gebrauchslösungen, Chemikalien und Nährmedien zusammengestellt. Der besseren Übersicht wegen wurden diese den jeweiligen Arbeitsschritten zugeordnet.

### Aufbereitung der Wasserproben

**Tabelle 2: Verwendete Geräte für die Aufbereitung der Wasserproben**

Geräte / Verbrauchsmittel	Hersteller
Lyophilisator	Christ
Sterilfilter (0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Kassel

### Zellisolierung und -anzucht

**Tabelle 3: Gebrauchsmaterial**

Technisches Gerät	Hersteller, Typ, Bezeichnung
Kühlbrutschrank	Tritec
Plate reader (Photometer)	Dynex Technologies, MRX revelation
Umkehrmikroskop mit Kamera	Hund, Wetzlar, Wilovert S mit Leica Wild MPS48
Zentrifuge	Heraeus, Megafuge 1.0R
Zentrifuge	Heraeus, Minifuge
Tiefkühlschrank	Bosch / Liebherr
Wasserbad	GFL, Typ 1002

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterial**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Bestellnummer</b>
PP-Röhrchen (50 mL)	Greiner, Nr. 227.261
PP-Röhrchen (15 mL)	Greiner, Nr. 188.271
Messzylinder	VWR
Petrischalen	Greiner, Nr. 633180
Filterpipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Brand, Nr. 702-100; 702-104; 702-108
Skalpell mit Klängen	BayHa
Pinzetten, Scheren	Heiland
Präparierwannen	VWR
Perfusionsnadel (Injektionsnadeln, Ecoflo)	Heiland (DM 0,5 mm; 370-421)
Spritzen (30 mL)	Heiland
Zellkulturflaschen (50, 160, 220 mL)	Greiner Bio-one
Erlenmeyerkolben	VWR
Steriles Metallsieb (V2A)	Küchenfachhandel

**Tabelle 5: Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Artikelnummer</b>
PBS	Biochrom, L182-50
Aceton	VWR, 1.00014
Eisessig	VWR, 1.00063
2-Propanol (Isopropanol)	VWR, 1.09634
Dimethylsulfoxid	VWR, 8.02912
Earle`s MEM	PAA, Austria, E15-024
Hank`s Balanced Salt solution	PAA, Austria, H15-010
Alpha modification of Eagles MEM	PAA, Austria, E14-032
Neutralrotlösung	Biochrom, Berlin, L-6313
RPMI - 1640	PAA, E15-840
D` MEM/Ham F12	PAA, Austria, E15-813
Non essential amino acids	Biochrom, E15-815

Collagen	Sigma Aldrich, C9879
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich, P 7280
Fibronectin	Sigma Aldrich, F 2518
Laminin	Sigma Aldrich, P 7280

Gebrauchslösungen:

**Puffer 1:**

**D-PBS (ohne Ca und Mg)**

- Dulbecco´s Phosphat Puffer	1000 mL	Biochrom, L182-50
mit den Zusätzen:		
- Albumin	10 g/L	Merck, Nr. 1.2018
- Natriumcitrat	5,357 g/L	Merck, Nr. 1.06448.050
- pH 7,5		

**Puffer 2:**

**D-PBS (mit Ca und Mg)**

- Dulbecco´s Phosphat Puffer	1000 mL	Biochrom, L182-50
mit den Zusätzen:		
- Albumin	5 g/L	Merck, Nr. 1.2018
- Natriumcitrat	5,357 g/L	Merck, Nr. 1.06448.050
- CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O:	0,132 g/L	Merck, Nr. 2388
- MgCl <sub>2</sub> (wasserfrei):	0,10 g/L	Merck, Nr. 05833
- NaCl	7,02 g/L	Merck, Nr. 6404
- pH 7,5		

**Puffer 3:**

**D-PBS (mit Ca und Mg)**

- Dulbecco´s Phosphat Puffer	1000 mL	Biochrom, L182-50
mit den Zusätzen:		
- CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O:	0,132 g/L	Merck, Nr. 2388
- MgCl <sub>2</sub> (anhydrid) :	0,10 g/L	Merck, Nr. 05833
- EDTA	1,8612 g/L	Sigma, Nr. E-4884
- pH 7,5		

**Puffer 4:****PBS ( ohne Zusätze )**

- Dulbecco 's Phosphat Puffer                      1000 mL                      Biochrom, L182-50

**MTT – Lösung:**

5 mg/mL in PBS                      Merck, Nr. 04737

**Tabelle 6: Verwendete Toxine und umweltaktive Stoffe**

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Sigma	A-6636
Desoxynivalenol	Sigma	D-0156
Ergotamin D-Tatrat	Fluka	45510
17-β-Estradiol	Sigma	E-2257
Fumonisin B <sub>1</sub>	Sigma	F-1147
Gliotoxin	Sigma	G-9893
Glyphosat (N-Phosphonomethyl)glycin	Sigma	P-9556
Kojisäure	Sigma	60890
Monacolin (K <sub>S</sub> )	Merck	L-154819
Microcystin LR	Sigma, USA	M-2912
Ochratoxin A	Supelco	46912
Roquefortin	Eigene Herstellung	
Sterigmatocystin	Makor Chemikals Ltd.	0.0760
T-2-Toxin	Sigma	T-4887
Trypanblau 0.5 %	Biochrom, Berlin	L6323
β-Zearalenol, β- ZOL	Sigma	Z-0417
α-Zearalenol, α - ZOL	Sigma	Z-0292
Zearalenon	Sigma	Z-2125

**Tabelle 7: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel zur Herstellung der Toxinlösungen**

Geräte/ Verbrauchsmittel	Hersteller
Stickstoffevaporator TCS	Barkley
Pipetten	Eppendorf

**Tabelle 8: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Toxinlösungen**

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	VWR	1.00014
DMSO ( Dimethylsulfoxid )	VWR	8.02912
Acetonitrile	J.T.Baker	9017

**Tabelle 9: Verwendete Medien und Zusätze zur Herstellung der Toxinlösungen**

Medien/Zusätze	Firma	Artikelnummer
MEM with Earl ´s Salts	PAA	E15-825
Fischserum	Eigene Herstellung	/
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom	A2213
FCS (Fätales Kälberserum)	PAA	E 23-193
Gentamycin	Fluka	46305
Amphotericin	Sigma Aldrich	A 9528

**Tabelle 10: Verwendete Geräte für die Etablierung des Testsystems**

Geräte / Verbrauchsmittel	Hersteller
Pipettensatz	Scientific Industries, Genie 2
Zentrifuge mit Plattenrotor	Heraeus Megafuge 1.0 R
Mikrotiterplatten 96 w	Greiner bio-one
Pipette	Eppendorf
Transferpipetten/Multipetten	Brand
Schüttler für Mikrotiterplatten (Horizontal)	GFL, Burgwedel
Sterile Werkbank	Kendro laboratories, Hera safe

## Erhebung des Fischbestandes

Für die Erhebung der Fischbiozönose an der Iller und zur geografischen Einordnung der Untersuchungsstandorte wurden folgende Gerätschaften verwendet.

**Tabelle 11: Geräte für die Elektrofischerei und zur Erhebung der ökologischen Randparameter**

Geräte / Verbrauchsmittel	Hersteller
Elektrofischfanggerät (11kW) mit Zubehör	Grassl, Berchtesgaden
Fangkescher	Fa. Kronawitter, Wallersdorf
Transporteimer, Wannen	Baumarkt OBI
Fangboot	Konstruktion TUM
GPS	Magellan MAP 500

## **2 Methoden**

### **2.1 Herstellung von Toxin-Standardlösungen**

Für die Herstellung der Standardlösungen wurde folgende Vorgehensweise gewählt.

Für Toxinstammlösungen wurden die kristallinen Toxinsubstanzen in definierten Volumina gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Diese Stammlösungen wurden im weiteren Versuchsverlauf zur Herstellung von Standardlösungen verwendet. Hierzu wurden diese toxin- bzw. umweltrelevanten Stammlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut und vermischt. Ein adäquates Volumen der Stammlösung wurde in eine weitere Schraubflasche ( $V=2\text{ mL}$ ) überführt. Am Stickstoffevaporator ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ) erfolgte die Abdampfung des Lösungsmittels aus der Toxinlösung in inerten Glasreagenzgläsern. Zum Resuspendieren des Toxins wurden  $25\text{ }\mu\text{L}$  eines Lösungsvermittlers (Gemisch Aceton/DMSO – 4:1) hinzugefügt. Nach der Lösung des Toxins im Lösungsvermittler wurde das Probengefäß mit  $975\text{ }\mu\text{L}$  Zellkulturmedium aufgefüllt und bis zur Verwendung bei  $4^{\circ}\text{C}$  dunkel gelagert.

### **2.2 Gewinnung und Aufarbeitung der Wasserproben**

In den Jahren 2004 und 2005 wurden von Juni bis Oktober (genauer Zeitraum siehe Ergebnisteil) täglich Wasserproben aus der Iller, im Zulaufbereich der Versuchsanlage Kempten/Durach (Übersicht siehe Kartenanhang), von ortsansässigen Fischereiberechtigten gezogen. Dazu wurden sterile und im Leerzustand verwogene Glasflaschen ( $V=1\text{ L}$ ) bis circa zur Hälfte mit Wasser gefüllt und bei  $2^{\circ}\text{C}$  dunkel gelagert. Einmal pro Woche wurden die Proben zur Weiterverarbeitung in die Laboratorien der Technischen Universität München nach Weihenstephan transportiert. Dort wurde das Endgewicht bestimmt und die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverwendung liegend gelagert. Dieselbe Vorgehensweise wurde für die Referenzwasserproben aus den Illerzuläufen Breitach, Stillach und Trettach gewählt.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben im gefrorenen Zustand bei 2 °C und niedrigem Luftdruck (circa 50 hPa) lyophilisiert. Nach fünf Tagen war das Volumen auf unter 1/10 des Ausgangsvolumens reduziert. Mit sterilem destilliertem Wasser wurde das Lyophilisat auf 10 % des Ausgangsvolumens eingestellt und homogenisiert. Unter aseptischen Bedingungen wurden adequate Mischmengen abpipettiert, sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.3 Zellbiologische Methoden

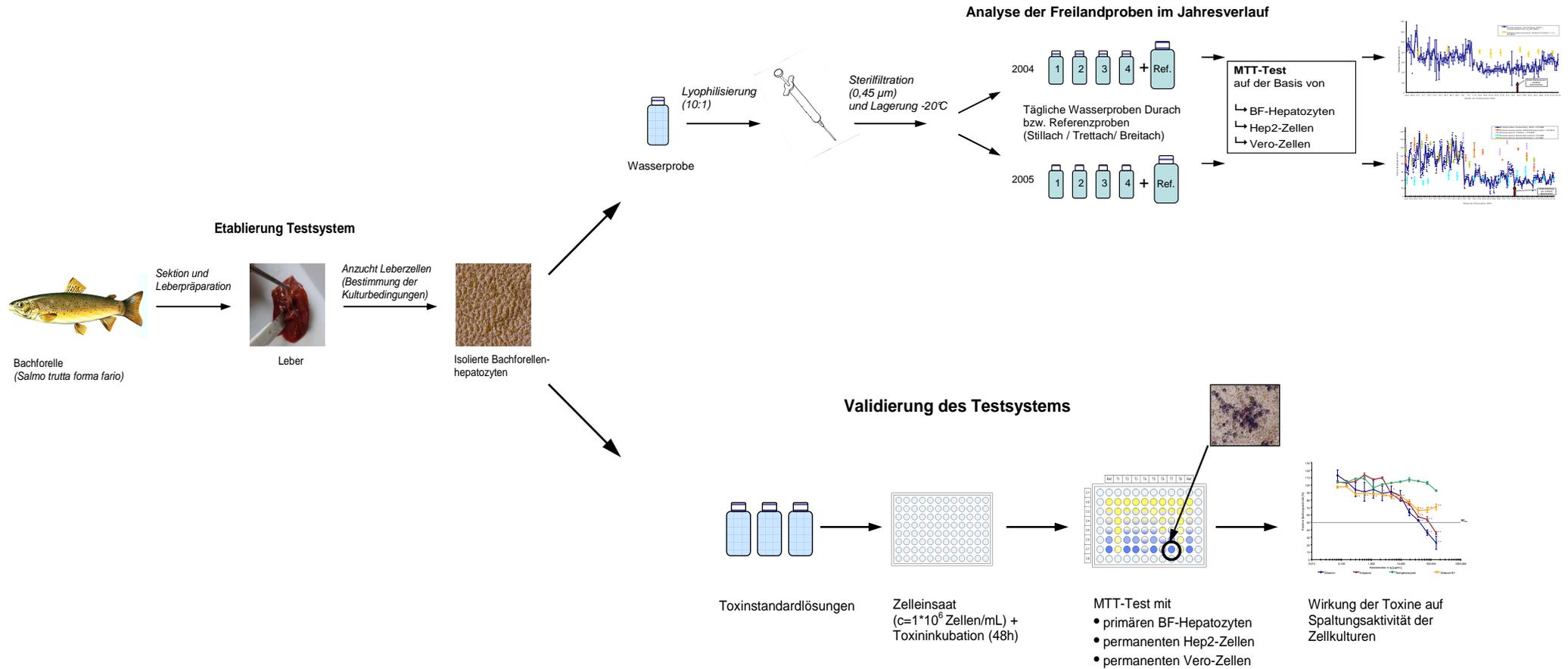


Abbildung 8: Vorgehensweise der angewandten Methodik

Die Abbildung 8 gibt einen schematischen Überblick über die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Etablierung des MTT-Testsystems auf der Basis von Bachforellenhepatozyten (BFL-Zellen) und die anschließende Bewertung der Toxizität von umweltrelevanten Stoffen, standardisierten Toxinpräparationen und Freilandproben.

### **2.3.1 Gewinnung primärer BFL-Zellen**

#### **2.3.1.1 Herstellung von Bachforellenblutserum**

Die Gewinnung von Bachforellenblutserum erfolgte in Anlehnung an DeKoning & Kaattari (1992). Dazu wurde Blut aus der *Vena caudalis* von betäubten Bachforellen (Betäubungslösung: Nelkenöl  $c=0,1\%$ ) gewonnen. Nach der Entnahme wurde das Blut in sterilen Gefäßen auf Eis circa 10 min gelagert und nach der Blutgerinnung zentrifugiert (389 g, 8 min). Das dickflüssige Serum wurde anschließend abpipettiert und in einer PBS-Lösung (1:20) verdünnt und sterilfiltriert (0,45  $\mu\text{m}$ ). Die Lagerung erfolgte bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.1.2 Gewinnung von Leberzellen nach Laville et al. (2004)**

Zur Gewinnung von Leberzellen dienten klinisch gesunde Bachforellen mit einem Gewicht von circa 350 – 500 g. Vor der Organentnahme wurden die Fische drei bis sieben Tage genüchert, um bei der Sektion eine Verunreinigung mit Darminhalt zu vermeiden. Anschließend wurden die adulten Bachforellen mit einem Schlag auf dem Kopf betäubt und mittels Durchtrennung der Kiemenbögen ausgeblutet.

Zu Beginn der Organentnahme wurde die Oberfläche und das Maul des Fisches mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Bauchdecke des Fisches unter einer sterilen Werkbank geöffnet und entfernt. Zur Verhinderung einer Verunreinigung der Leber mit Galle wurde die Gallenblase mit einem sterilen Faden abgebunden und abgetrennt.

Um die Anzahl an Erythrozyten in der Zellkultur zu reduzieren, wurde die Leber mit Puffer 1 perfundiert. Dazu wurden die *Vena portae* (Pfortader) und die *Vena hepatica* (Lebervene) freigelegt. Um einen besseren Zugang zur *Vena portae* zu

erhalten, wurde diese circa einen Zentimeter vor der Leber durchtrennt. Anschließend wurde das Organ aus der Bauchhöhle entfernt und in einer sterilen Edelstahlwanne zurechtgelegt. Eine Infusionskanüle wurde in die verbliebene Pfortader eingeführt und die Leber mit jeweils 30 mL Puffer 1 bis zur Entfärbung (dunkelrot nach hellbraun) gespült.

Anschließend wurde die Leber unter aseptischen Bedingungen in einer Glaspetrischale in Stücke mit einer durchschnittlichen Kantenlänge von 2-3 mm geschnitten und das Bindegewebe vollständig entfernt. Die Leberstückchen wurden in 50 mL PBS suspendiert und anschließend durch Zentrifugation (389 g, 8 min, 10 °C) separiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Gewebestücke in 30 mL D-PBS (Puffer 2) bei 4 °C für 30 min inkubiert, anschließend durch ein feinporiges Edelstahlsieb gedrückt und durch einen Filter aus Mullgaze in ein steriles Behältnis pipettiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (693 g; 4 min; 10 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zweimal mit je 15 mL Puffer 2 gewaschen und nach einer Zentrifugation (693 g; 4 min; 10 °C) mit 5 mL Puffer 1 resuspendiert.

Die Einstellung der Zelldichte erfolgte mittels Anwendung der Trypanblaumethode. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau eingefärbt. Anschließend erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer die Zellzahlbestimmung (Lindl, 2002) vitaler Zellen, die Konzentrationseinstellung von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL und die Aussaat in Mikrotiterplatten.

Die Zellen wurden in den Mikrotiterplatten im Klimaschrank (3,7 % CO<sub>2</sub> - Konzentration, 16,3 °C und 85,3 % relative Feuchte) inkubiert.

### **2.3.1.3 Isolierung der Leberzellen nach Freshney (1987)**

Bei dieser Methodik erfolgte die Leberentnahme wie unter 2.3.1.2 . Im Anschluss daran wurde die Leber mit dem Skalpell zerkleinert und dann zweimal mit 15 mL Hank`s gepufferter Salzlösung (HBSS) gewaschen (Zentrifugationsbedingungen: 390 g, 10 °C, 8 min) und der Überstand verworfen. Zur Lösung der Zellverbände wurde eine Collagenaselösung hinzugefügt (1 %ig in HBSS, 3 mM CaCl<sub>2</sub>) und die Suspension im Klimaschrank für 45 min bei 37 °C inkubiert.

Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch Zentrifugation (390 g, 10 °C, 10 min) wurde das verbliebene Zellpellet in 10 mL Earle`s MEM-Medium resuspendiert. Zur Abtrennung von Zellagglomeraten wurde die Suspension durch einen Gazefilter filtriert. Die verbliebenen Verklumpungen wurden solange in die Collagenaselösung rückgeführt bis keine größeren Zellverbände mehr vorlagen.

### **2.3.2 Kultivierung von Vero-Zellen**

Standardisierte Vergleichsversuche mit Toxinproben bzw. Wasserlyophilisaten aus dem Freilandversuch wurden auf der Basis von permanenten Verozellen (African green monkey kidney; DSMZ Nr. ACC 33) durchgeführt. Hierzu wurden die gefrorenen Kulturzellen aufgetaut und unter aseptischen Bedingungen in eine Zellkulturflasche (V=200 mL), mit vorbereitetem Kulturmedium (RPMI 1640, 2 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, 2 % FCS), überführt. Anschließend erfolgte eine zwei- bis dreitägige Bebrütung bei 37 °C im Klimaschrank. Nach der Ernte durch Trypsinierung wurden die Verozellen in der Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL (V=100 µL) in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt.

### **2.3.3 Kultivierung von Hep2-Zellen**

Zur vergleichenden Untersuchung der Gewässerlyophilisate und ausgewählter Toxine wurden die humanen Hep2-Zellen (human hepatocellular carcinoma; DSMZ Nr. ACC 180) analog dem Verfahren für Verozellen aufgetaut und in Kultur gebracht. Das verwendete Kulturmedium bestand bei der Anzucht dieser Zelllinie aus dem Medium D`MEM/Ham`s F12 mit den Zusätzen 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, 1 % Non essential amino acids und 10 % FCS. Die Zellen wurden analog den Vero-Zellen kultiviert und jeweils 100 µL (Konzentration =  $1 \times 10^6$  Zellen/mL) in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte ausgesät.

### **2.3.4 Beurteilung des Einflusses von Isolierungs- und Kultivierungsschritten auf Bachforellenleberzellkulturen**

Zur Beurteilung des Einflusses von Verfahrensschritten auf die Bachforellenleberzellkulturen wurden morphologische und quantitative Kriterien herangezogen. Die Zellquantität wurde über die Anzahl vitaler Zellen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Morphologie der Zellen bzw. der Zellkultur wurde mikroskopisch begutachtet. Dazu wurden die Parameter Form, Agglutinationsgrad, Fremdgewebe und Anteil an Erythrozyten herangezogen. Das Ergebnis dieser subjektiven, mikroskopischen Beurteilung wurde im Parameter „Qualität“ zusammengefasst.

Diese beiden Kriterien Qualität und Quantität zusammengefasst, definierten den allgemeinen Zellzustand.

### **2.3.5 Durchführung des MTT-Tests**

#### **2.3.5.1 Bachforellenleberzellen (BFL-Zellen)**

In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden 75 µl Zellsuspension (Zellkonzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/mL Anzuchtmedium) eingesät. Zur Vermeidung von Randeffekten (Verdunstung) wurden die äußeren Kavitäten mit PBS gefüllt. Basierend auf den Ergebnissen aus Vorversuchen wurden für den MTT-Test auf Basis von BFL-Zellen folgende Inkubationsbedingungen gewählt: Temperatur: 16,0 °C; Kohlendioxidgehalt während der Inkubation: 3,7 %; relative Luftfeuchte: 85,3 %. Um eine Information über die Toxizitätskinetik zu erhalten, wurde der Zellzustand nach 24 h, 48 h und 72 h im MTT-Test geprüft.

Die zu testende Substanz (Toxin, umweltaktiver Stoff) wurde für den Validierungsvorgang im Zellkulturmedium in der doppelten Konzentration gelöst und in einer separaten Mikrotiterplatte als Verdünnungsreihe vorbereitet. Abgestufte Toxinkonzentrationen wurden auf die Zelleinsaat aufgebracht (z.B. 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL, usw.). Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden zu jeder Kavität 15 µl MTT Lösung hinzugefügt und unter Schütteln (Horizontalschüttler) weiter inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (700 g, 5 min, 10 °C) und der Überstand vorsichtig

abgezogen. Zur Lösung der Formazankristalle wurden 100 µL Isopropanol zugefügt und die Platten 10 min auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Die Auswertung erfolgte am Elisa Platten Reader bei der Wellenlänge 550 nm und der Referenzwellenlänge von 630 nm.

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsansätzen zu gewährleisten, wurde auf jeder Mikrotiterplatte eine Nullprobe (Zellen und Medium) und mindestens eine Toxinkontrolle (Toxinlösungen Gliotoxin, Zearalenon, Aflatoxin B<sub>1</sub> in ansteigender Konzentration) mitgeführt

### **2.3.5.2 Vero-/Hepzellen**

Zur Durchführung des MTT-Testes mit Vero- bzw. Hep2-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in einem Volumen von 100 µL/Kavität in die Mikrotiterplatten eingesät. Diese wurden anschließend für 24 Stunden im Klimaschrank (T = 37 °C, CO<sub>2</sub> -Konzentration = 5 %, rel. Lf = 95 %) inkubiert.

Das Medium wurde vorsichtig abpipettiert und mit 100 µL Probe befüllt. Eine Positivkontrolle (Konzentrationsreihe eines Standardtoxins: Gliotoxin, Zearalenon, Aflatoxin B<sub>1</sub>) sowie eine Negativkontrolle (Zellsuspension und Medium) wurden dabei mitgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden.

Danach wurden jeweils 15 µL der vorbereiteten MTT-Lösung in die einzelnen Kavitäten verbracht und für 4 Stunden inkubiert.

Die Formazankristalle wurden von der überstehenden Lösung separiert und durch Zugabe von 100 µL DMSO, unter Schütteln (5 min) gelöst. Die Absorption (OD-Wert) wurde bei 492 nm am ELISA Plate reader bestimmt.

### **2.3.5.3 Auswertung**

Die in den Zellkulturtests ermittelten Aktivitätswerte werden als relative Spaltungsaktivität (MTT-Test) dargestellt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

*Relative Spaltungsaktivität bzw. „Vitalität“* =  $(a_p * 100)/a_k$

$a_p$  = Absorption der Probe;

$a_k$  = Absorption der Kontrolle (zugehöriger Mittelwert)

Die statistische Datenauswertung besteht aus zwei Schritten.

Zum einen werden die relativen Aktivitätswerte für jede Konzentration jeweils mit den Zellkontrollwerten verglichen. Mit dem t-Test (Gosset, 1907) wird untersucht, ob eine signifikante Abweichung vorliegt. Die Annahme einer Normalverteilung kann durch den Shapiro-Wilk Normalitätstest (Royston, 1982) überprüft werden. Für die Kontrollgruppe ergibt sich kein Hinweis auf eine Abweichung von dieser Annahme ( $p = 0.51815$ ). Die Vielzahl der durchgeführten t-Tests dient nicht der Überprüfung einer globalen Hypothese (daher keine multiple Testkorrektur), sondern der Identifizierung von Bereichen mit deutlichen negativen Unterschieden zur Zellkontrollgruppe.

Zur Analyse der Abhängigkeit der Aktivitätswerte von den Konzentrationen werden in einem zweiten Schritt Aktivitätswerte und Konzentrationen für jeden Inhaltsstoff gemeinsam analysiert und auf signifikante Effekte geprüft. Dazu werden mittels Regressionsanalyse verschiedene Funktionsklassen (Polynome, e-Funktion, logistische Funktion) an die Daten angepasst und die Parameter geschätzt.

An die erhaltenen Grafiken der Toxizitätsüberprüfungen wurde eine Trendkurve gelegt, die durch eine mathematische Gleichung definiert und der dazugehörige Bestimmtheitsgrad ermittelt wurde. Eine Berechnung und Darstellung des  $EC_{50}$ -Wertes wurde durch Auflösung der Formeln nach x und einer Definition der y-Koordinate mit 0,5 (für 50%) möglich.

## **2.4 Erfassung anthropogen bedingter Einflussfaktoren im probenrelevanten Wassereinzugsgebiet**

Die Aufnahme ökologischer Randparameter hatte die Aufgabe

1. das Bachforellensterben räumlich einzugrenzen (Nebenbäche, Hauptfluss Iller),

2. das Einzugsgebiet der Iller hinsichtlich anthropogener Einflüsse zu gewichten,
3. die Daten von verschiedenen staatlichen Organisationen zu berücksichtigen

und mit den generierten Daten aus der Laboruntersuchung zu diskutieren.

Für die Erhebung von potentiellen Einflüssen auf das Ökosystem Iller (Einzugsgebiet) wurden verschiedene Untersuchungsmethoden angewandt. Die Kartierung von Bachforellenbeständen an Nebengewässern der Iller ist auf Basis von Befragungen der örtlichen Fischereiberechtigten (siehe Anhang), eigenen Sichtungen und stichpunktartigen Elektrobefischungen, in den Untersuchungsjahren 2004 bis 2006 erfolgt.

Eine detailliertere Erhebung des Fischbestandes wurde am 19. und 20. September 2006 zwischen dem Illerursprung und der ARA Thanners mittels Elektrobefischung durchgeführt. Zum Einsatz kam ein Elektrofischfanggerät der Fa. Grassl (11kW) mit zwei Fanganoden. Gefischt wurde nach der Streifenbefischungsmethode, vom Boot aus, flussabwärts treibend, mit zwei Anodenfischern, zwei Kescherern und einem Bootsführer. Die gefangenen Fische wurden nach Art charakterisiert, es wurden deren Längen gemessen und der Fangort mittels GPS geografisch eingeordnet.

Die vom Wasserwirtschaftsamt Kempten und vom Land Vorarlberg zur Verfügung gestellten Daten aus Gewässeranalysen (pH-Wert, BSB<sub>5</sub>-Wert, Leitfähigkeit, bakterielle Belastung – „E. coli“, Phosphatgehalte, Sulfatgehalte, Nitratgehalte, Nitritgehalte; siehe Ergebnisteil), sowie hydromorphologische Daten der Iller bzw. deren Ursprungsbäche wurden erhoben und gezielt mit eigenem Datenmaterial aus den Laboruntersuchungen korreliert. Dabei wurden chemische, physikalische und mikrobielle Gewässerparameter dargestellt. Die Daten des Landes Vorarlberg vervollständigten diesen Fundus mit Detailinformationen des Einzugsgebietes der Breitach im Kleinwalsertal in Vorarlberg/Österreich (Übersicht siehe Kartenmaterial im Anhang).

Zusätzlich wurden zusammen mit den örtlichen Fischereivereinen und Mitarbeitern der Polizei in Oberstdorf Kartierungen im Untersuchungsgebiet durchgeführt, um potentielle anthropogene Einflüsse auf die Gewässersysteme

festzustellen. Zur graphischen Verdeutlichung wurden mögliche anthropogen verursachte Einflußfaktoren (Standorte von Abwasserreinigungsanlagen, Parkplatzanlagen, Skilifte, Kraftwerke, Gaststätten, urbanisierte Flächen wie Golfplätze, usw.) in einer Übersichtskarte eingetragen (siehe Anhang).

## **D Ergebnisse**

### **1 Etablierung des Testsystems**

#### **- Gewinnung der Leberzellen**

Bei den Versuchen zur Isolierung und Anzucht von BFL-Zellen ist einerseits der physiologische Status der Fische und andererseits die Technik der Zellgewinnung entscheidend für die Zellausbeute in qualitativer und quantitativer Hinsicht. Aus frisch gefütterten bzw. unterernährten Bachforellen waren nur vergleichsweise wenige Leberzellen zu isolieren, die zudem noch stark agglutinierten. Eine Quantifizierung konnte deshalb nicht durchgeführt werden. Die Entnahme der Leber von Fischen während der Laichzeit resultierte in einer geringen Ausbeute an vitalen Leberzellen sowie zu einem erhöhten Anteil an Leukozyten in der primären Zellkultur.

Bei der Gewinnung der Leberzellen bewährte sich dabei eine drei- bis siebentägige (je nach Wassertemperatur;  $>10\text{ °C}=7\text{-tägig}$ ;  $<10\text{ °C}=3\text{-tägig}$ ) Nüchterung vor der Organentnahme. Dies ging allerdings einher mit einer prallen Füllung der Gallenblase. Um eine Verunreinigung der Zellkultur mit Galle zu vermeiden, wurde die Gallenblase mit einem sterilen Faden abgebunden und entfernt.

Um hohen Konzentrationen an Erythrozyten in den Zellkulturen entgegenzuwirken, wurde die Art der Entnahme und anschließenden Zerkleinerung nach Laville et al. (2004) modifiziert. Diese Spülung der Leber mit PBS (siehe C.2.3) führte zu einer deutlichen Reduktion der Erythrozyten (siehe Abbildung 9) in der Zellkultur.



**Abbildung 9: Bachforellenleberzellen (BFL-Zellen; schwarze Pfeile) und Erythrozyten (rote Pfeile) im Zellmedium**

### **- Vorversuche zur Kultivierung von Bachforellenleberzellen**

Zur Weiterentwicklung der BFL-Zellkultur wurden verschiedene Kultivierungsversuche durchgeführt.

Die Methode (C.2.3) nach Freshney (Collagenaseverdau; Entnahme und enzymatische Zerkleinerung) der sterilen Vorzerkleinerung des Lebergewebes mittels Skalpell, die Behandlung mit Collagenase zur Lösung des Zellverbands und ein anschließendes Abfiltrieren der großen Gewebestücke war in ihrem Resultat nicht zufriedenstellend. Die erhaltene Suspension musste anschließend durch ein Metallsieb filtriert werden, um die Zellen von großen Zellfragmenten zu befreien und eine Anzucht zu ermöglichen. Dabei trat ein hoher Filtrations- und Stabilitätsverlust der BFL-Zellen auf.

Die Methode nach Laville et al. (2004) (siehe C.2.3) lieferte eine geringere Ausbeute (Quantität) an Bachforellenleberzellen, garantierte aber eine sehr gute Qualität der isolierten Zellen und wurde daher weiterentwickelt und für die Vorbereitung der MTT-Tests verwendet.

**Tabelle 12: Beurteilung von Einflussfaktoren auf isolierte Zellkulturen während der Gewinnung und Aufbereitung**

Einflussfaktoren auf die Leberzellkultur:	Beurteilung der erhaltenen Zellkulturen							
	sehr gut		gut		schlecht		sehr schlecht	
	Qualität	Quantität	Qualität	Quantität	Qualität	Quantität	Qualität	Quantität
Haltung der Bachforellen								
<i>kontinuierliche Fütterung</i>							X	X
<i>Laichzeit</i>							X	X
Gewinnung der Zellkulturen								
<i>Entnahme und Zerkleinerung in Anlehnung an N. Laville, 2003</i>			X			X		
<i>Entnahme und enzymatische Zerkleinerung (Collagenaseverdau)</i>				X		X		

Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über die getesteten Einflussfaktoren im Rahmen der Gewinnung der BFL-Zellen; beginnend bei der Hälterung der Bachforellen bis hin zur Gewinnung, Isolierung und Stabilisierung der Leberzellkultur.

Die frisch isolierten Zellkulturen wurden am Mikroskop, nach folgender Bewertungsskala beurteilt.

*Sehr gute Zellqualität:*

Es sind mindestens 95 % der ausgezählten Zellen vital (nicht verfärbt). Die Morphologie der Zellen kennzeichnet sich durch deutliche Abgrenzung aller Zellen mit kugeliger Gestalt. Es sind keine Zellagglutinationen in der Zählkammer vorhanden.

*Sehr gute Zellquantität:*

Die Zählung der vitalen Zellen auf der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer liefert als Ergebnis mehr als 25 vitale, einzeln vorliegende Leberzellen (Auszählung diagonal).

*Gute Zellqualität:*

Es sind zwischen 60 bis 95 % der Zellen vital (nicht verfärbt). Die Morphologie der Zellen kennzeichnet sich durch deutliche Abgrenzung der meisten Zellen mit kugeliger Gestalt. Es sind nur einzelne Zellagglutinationen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer vorhanden. Die Zahl der Erythrozyten liegt zwischen 25 und 50 % der ausgezählten Zellen.

*Gute Zellquantität:*

Die Zählung der einzeln vorliegenden, vitalen Leberzellen auf der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer liefert als Ergebnis zwischen 15 und 25 Leberhepatozyten in den diagonal ausgezählten Einzelquadraten.

*Schlechte Zellqualität:*

Es sind zwischen 30 bis 60 % der Zellen vital (nicht verfärbt). Die Morphologie der Zellen kennzeichnet sich in mehr als 50 % der Fälle als Zellen mit „eingedellter“ Gestalt. Es sind vermehrt Zellagglutinationen auf der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer vorhanden. Die Erythrozytenanzahl ist höher als 50 % der Gesamtzellzahl in den ausgezählten Quadraten der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

*Schlechte Zellquantität:*

In den Auszählquadraten der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer können zwischen fünf und 15 vitale Leberzellen nachgewiesen werden.

*Sehr schlechte Zellqualität:*

Es sind weniger als 30 % der Zellen vital (nicht verfärbt). Die Morphologie der Zellen kennzeichnet sich in mehr als 50 % der Fälle als Zellen mit „eingedellter“ Gestalt. Es sind vermehrt Zellagglutinationen auf der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer vorhanden. Die Erythrozytenanzahl ist höher als 70 % der Gesamtzellzahl in den ausgezählten Quadraten der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

*Sehr schlechte Zellquantität:*

In den Auszählquadraten der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer können weniger als fünf vitale Leberzellen nachgewiesen werden.

Die Beurteilung der Zellzustände wurde durch die Berücksichtigung der einzelnen Parameter (Zellqualität und Zellquantität) erreicht.

## - Kultivierungsbedingungen

Für primäre Bachforellenhepatozyten konnte in der Literatur kein geeignetes Anzuchtmedium für diese speziellen Fischzellen gefunden werden. Es war daher notwendig, unter den als „Fischmedien“ deklarierten Angeboten verschiedener Hersteller ein geeignetes Medium für die Leberzellkultur der Bachforelle auszuwählen. Zum Einsatz kamen RPMI 1640 -, Alpha Modifikation - und Earle´s MEM - Medium (siehe Materialteil bzw. Tabelle 13). Diese Zellmedien wurden vergleichenden Tests hinsichtlich Wachstumsraten bzw. Stabilität der isolierten BFL-Zellen unterzogen.

**Tabelle 13: Übersicht über den Zustandsverlauf der BFL-Zellkultur mit verschiedenen Zellkulturmedien**

Verwendete Medien	Beobachtungszeitraum		
	1 Tag	3 Tage	5 Tage
<i>RPMI - 1640</i>	+	--	--
<i>Alpha Modifikation</i>	++	+	-
<i>Earle`s MEM</i>	++	++	+

(++) = sehr guter Zellzustand

(+) = guter Zellzustand

(- -) = sehr schlechter Zellzustand

( - ) = schlechter Zellzustand

Nach dem Einsäen der Zellen wurde nach kurzer Zeit ein deutlicher Unterschied zwischen dem RPMI 1640 - Medium und den Medien Alpha Modifikation und Earle´s MEM festgestellt. Das Wachstum bzw. die Überlebensrate im RPMI - Medium wurde mittels der Trypanblaufärbung (siehe B.2.4) gegenüber den beiden anderen Medien (nach einem, drei bzw. fünf Tagen Inkubation) deutlich schlechter gewertet. Nach fünf Tagen Inkubationszeit verschlechterte sich auch der Zustand der Leberzellen im Medium Alpha Modifikation. Daraufhin kam das Medium Earle`s MEM für weitere Versuche zum Einsatz.

Um das Wachstum von Fremdkeimen im Medium zu verhindern und dadurch eine Zellvermehrung zu erreichen, wurden die gewählten Medien mit verschiedenen „Antibiotikazusätzen“ supplementiert (siehe Tabelle 14). Die Antibiotikakonzentrationen wurden in Anlehnung an Lindl (2002) gewählt.

**Tabelle 14: Abhängigkeit der Zellstabilität von der Kombination, Art und Konzentration von Antibiotikazusätzen zu den Medien (Inkubationszeit=48h)**

Medien Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Penicillin-Streptomycin			Gentamycin			Amphotericin		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
RPMI 1640	+	+	-	-	-	+	--	--	-
Alfa Modifikation	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Earles MEM	+	++	+	--	--	+	+	+	+

(++) = sehr guter Zellzustand

(+) = guter Zellzustand

(- -) = sehr schlechter Zellzustand

(-) = schlechter Zellzustand

In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Vorstudien aufgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der aufgeführten Antibiotika auf den Zellen, in den Medien RPMI 1640, Alfa Modifikation und Earle`s MEM, getestet. Es wurde ein Gesamturteil (siehe B.2.3) nach folgenden Versuchstagen gefällt: 1 Tag, 3 Tagen und 5 Tagen. Die besten Resultate konnten mit der Mischung aus Penicillin und Streptomycin bei der Konzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  Medium erreicht werden.

Das bei gängigen Zellkultursystemen zugesetzte essentielle fetale Kälberserum zeigte in den Vorversuchen nicht die erforderlichen Haltbarkeitsraten (guter bis sehr guter Zellzustand) der primären Bachforellenhepatozytenkultur. Ein Stabilitätsvergleich (nach 3 Stunden, 1 Tag, 2 Tagen, 3 Tagen und 5 Tagen) unter identischen Bedingungen, nur unter Zusatz von Bachforellenserum, erbrachte eine deutliche Steigerung der Stabilität der angezüchteten Leberzellen (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Abhängigkeit der Zellstabilität von der Verwendung verschiedener Seren**

Beobachtungszeitraum	Verwendete Zusätze	
	Fetales Kälberserum	Bachforellenserum
3 h	++	++
24 h	+	++
48 h	+	++
72 h	-	+
120 h	--	+

(++) = sehr guter Zellzustand

(+) = guter Zellzustand

(- -) = sehr schlechter Zellzustand

(-) = schlechter Zellzustand

Um ein einfacheres „Handling“ während der Aufbereitung der Leberzellen zu gewährleisten, sollte eine Anheftung der Leberzellen an die Wandung der einzelnen Kavitäten erreicht werden. Die Verwendung von beschichteten (gecoateten) Kavitäten (wells) und ihre Wirkung auf die Effektivität der Anlagerung (siehe Tabelle 16) wurde unter Verwendung der Anheftungsfaktoren Collagen, Fibronectin, Laminin und Poly-D-Lysine untersucht. Dabei wurden folgende Inkubationszeiträume getestet: 1 Tag, 2 Tage und 3 Tage.

**Tabelle 16: Einfluss von Anheftungsfaktoren auf die Adhäsion der Bachforellenleberzellen an die Wandung von Kavitäten einer Mikrotiterplatte**

<i>Anheftungsfaktoren</i>	<b>Inkubationszeitraum</b>		
	<i>1. Tag</i>	<i>2. Tag</i>	<i>3. Tag</i>
<b>Collagen</b>	+	-	-
<b>Fibronectin</b>	+	-	-
<b>Laminin</b>	--	--	--
<b>Poly-D-Lysine</b>	--	--	--

(++) = sehr gute Anhaftung

(+) = gute Anhaftung

(- -) = sehr schlechte Anhaftung

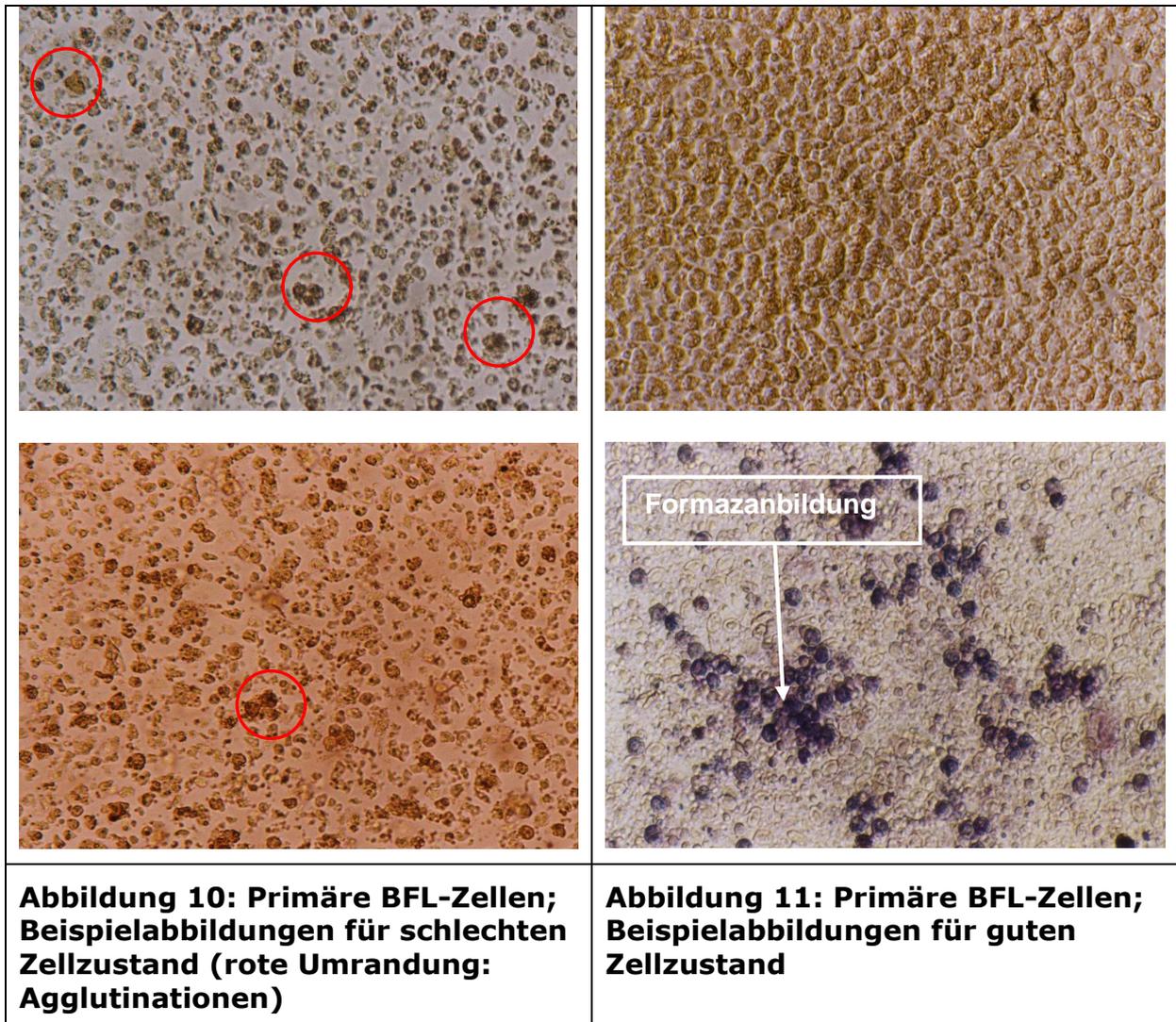
( - ) = schlechte Anhaftung

Bei der Verwendung der Anheftungsfaktoren Laminin und Poly-D-Lysin ergaben die mikroskopischen Auswertungen nach einem Tag, zwei Tagen und drei Tagen im Allgemeinen keine Anheftung der Leberzellen an die beschichteten Wandungen der einzelnen Kavitäten in den Mikrotiterplatten (- -).

Leichte Verbesserungen waren mit Collagen und Fibronectin nach einem Tag sichtbar. Es konnten im Randbereich der einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatten Adhäsionseffekte beobachtet werden (+). Eine hinreichende Adhäsion unter gegebenen Versuchsbedingungen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die Verwendung von Suspensionszellkulturen, unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Vorversuchen stellte die Basis für das MTT-Testsystem auf der Basis von Bachforellenhepatozyten dar. Der erhöhte Aufwand bei

Reinigungsschritten bzw. Kultivierung, konnte durch eine erhöhte Ausbeute von Leberzellen in guten Zellzuständen relativiert werden.

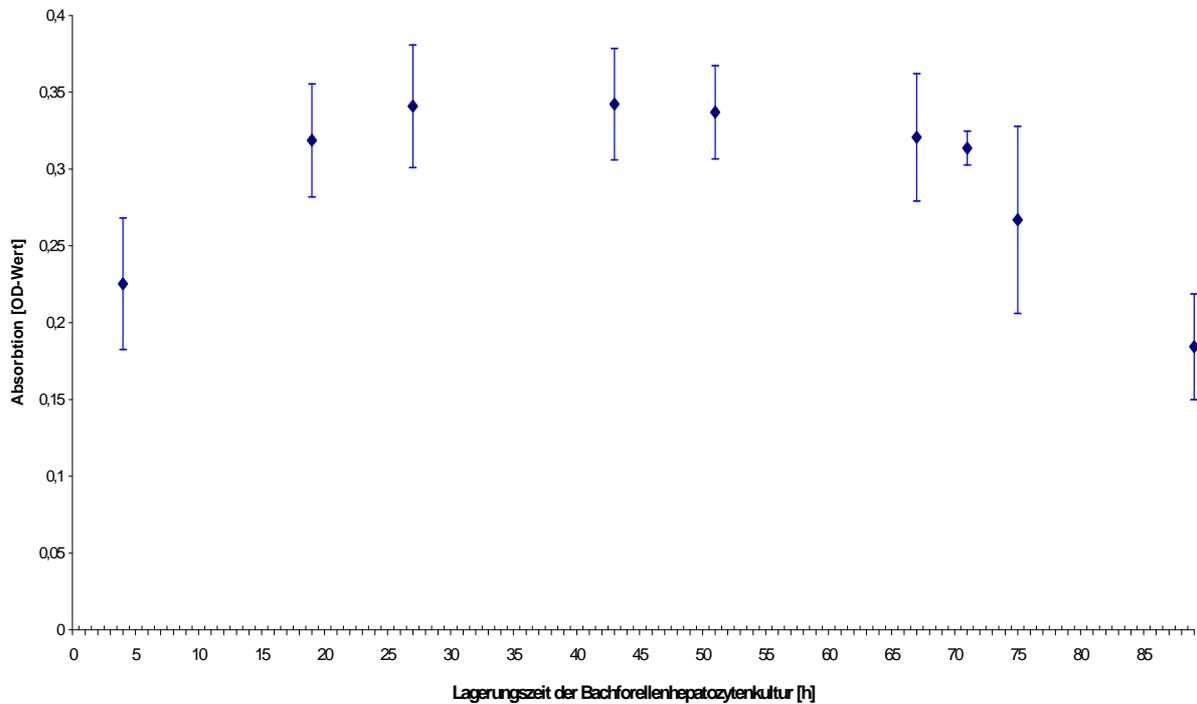


Die Abbildung 10 stellen dabei beispielsweise einen schlechten Zustand der Zellkultur von BFL-Zellen dar. Dieser ist gekennzeichnet durch starke Agglutinationen der Zellen, unspezifische Form und geringe Haltbarkeit. In den Abbildung 11 werden primäre BFL-Zellen mit gutem Zellzustand abgebildet. Diese zeichnen sich durch vitale, deutlich abgegrenzte Einzelzellen aus.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche wurde letztendlich folgendes Vorgehen zur Isolierung und Kultivierung von BFL-Zellen gewählt:



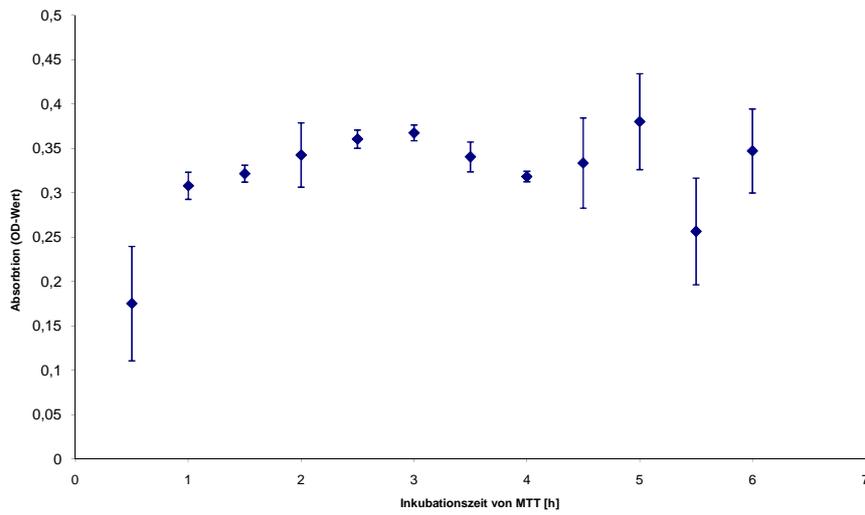
Kulturbedingungen gesehen werden (Lindl, 2002). Nach 72 h war ein Abfall der Spaltungsaktivität festzustellen, was auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität der BFL-Zellen hinweist. Im Zeitfenster von 24 bis 72 Stunden können die Leberzellen das MTT am effektivsten umsetzen.



**Abbildung 12: Einfluss des Alters der BFL-Zellkultur auf die MTT-Spaltungsaktivität (+/- SD, n=3)**

### **- Kinetik der Formazanbildung**

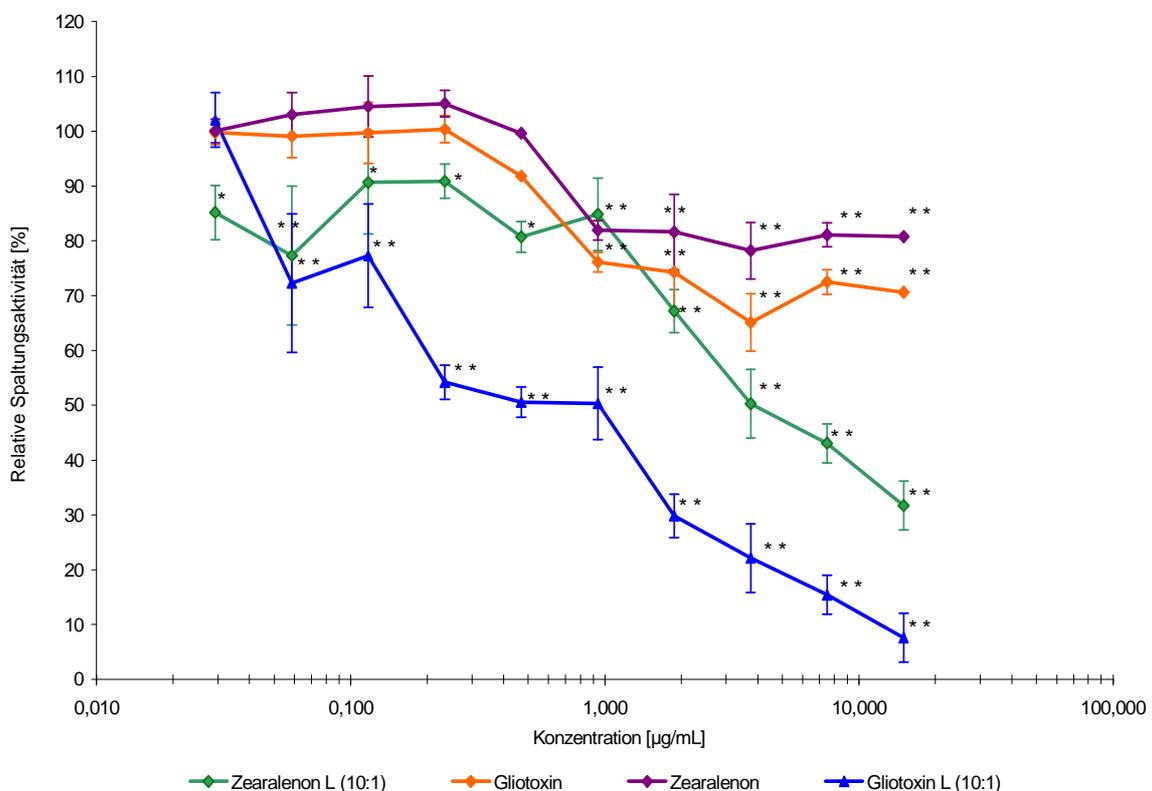
Um festzustellen, wie rasch die Umsetzung von MTT zu Formazan erfolgt, wurde eine definierte Zellkultur („Alter 24h“) unterschiedlich lange mit MTT inkubiert. Die Abbildung 13 zeigt, dass bereits nach 3 h ein OD-Wert von 0,35 (Standardabweichung 0,010) gemessen wurde. Nach einer 5-stündigen Inkubation konnte zwar ein höherer OD-Wert von 0,38 verzeichnet werden, die Standardabweichung der Ergebnisse war mit 0,051 bis 0,060 jedoch erhöht. Daher wurde für die Untersuchung der Referenzsubstanzen und der Wasserkonzentration eine Inkubationszeit von 3 h als ausreichend erachtet.



**Abbildung 13: Abhängigkeit der gebildeten Formazanmenge von der Inkubationsdauer (+/- SD, n=4) der BFL-Zellen**

## - Einfluss der Konzentrierung toxischer Wasserinhaltsstoffe mittels Lyophilisation auf MTT-Spaltungsaktivität von BFL-Zellen

Ziel dieser Versuchsreihe war zu prüfen, ob die Konzentrierung von toxischen Wasserinhaltsstoffen durch Volumenreduktion mittels Lyophilisation zu einer Erhöhung der toxischen Wirkung im MTT-Test führt. Hierzu wurden sterilfiltrierte Probenwassermischungen der Referenzbäche (Breitach, Trettach, Stillach aus dem Jahr 2004, [1:1:1]) mit ansteigenden Konzentrationen von Gliotoxin, Zearalenon und Microcystin LR versetzt. Anschließend wurden diese Proben im Gefriertrocknungsgerät auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingengt. Die Wirkung dieser Konzentrate und Aliquote der Ausgangsproben auf die relative Spaltungsaktivität wurde nach der festgelegten Methode geprüft. Die signifikante bzw. stark signifikante Abweichung der einzelnen Spaltungsaktivitäten wurde in Abhängigkeit von der Zellkontrolle bestimmt (\*; \*\*). Darüber hinaus wurde die statistische Abweichung zwischen den Untersuchungen der lyophilisierten Proben und den der Ausgangsproben der einzelnen Toxinmischungen ermittelt.



**Abbildung 14: Einfluss der Anreicherung (Faktor 10:1) abgestufter Toxinkonzentrationen von Gliotoxin und Zearalenon auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen (+/- SD, n=3, \*\* = p<0,01, \* = p<0,05; Zellkontrolle 100% [SD= 5,1])**

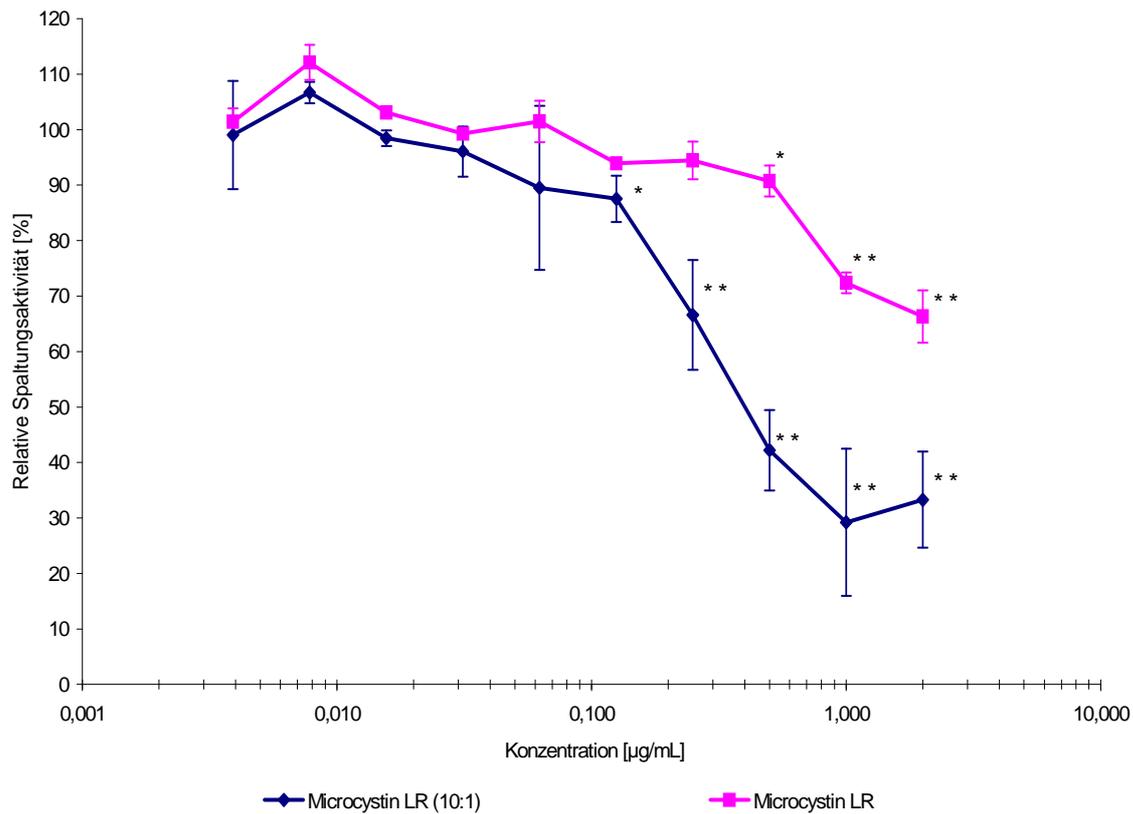
Aus Abbildung 14 geht hervor, dass sich die Aufkonzentrierung der Proben durch Lyophilisation in den Resultaten des MTT-Testes widerspiegeln. Ab der Konzentration von 0,03 µg/mL kann eine signifikante Abweichung der relativen Spaltungsaktivität der aufkonzentrierten Gliotoxinprobe (10:1) von der nicht lyophilisierten Probe festgestellt werden.

Beispielsweise wird bei der Gliotoxinkonzentration von 15 µg/mL die relative Spaltungsaktivität der BFL-Zellen um ca. 30 % gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (Zellkontrolle) reduziert. Durch Konzentrierung auf 1/10 des Ursprungsvolumens erfolgt eine Reduktion der relativen Spaltungsaktivität um 90 %.

Ein analoges Bild zeigte sich bei Zearalenon. Für diese „zearalenongespikten“ Wasserproben ist ab der Konzentration von 1,15 µg/mL eine hoch signifikante Abweichung der relativen Spaltungsaktivität zwischen lyophilisierter Probe und nicht lyophilisierter Probe festzustellen.

Auch die Versuche mit Microcystin LR (siehe Abbildung 15) zeigten, dass die Konzentrierung der Wasserproben zu einer deutlichen Reduktion der Transformation von MTT zu Formazan führt. Bei einer Microcystinkonzentration von 2 µg/ml beträgt die relative Spaltungsaktivität 70 %; durch Lyophilisation sinkt sie auf ca. 30 % ab. Ab der Konzentration von 0,12 µg/mL konnte ein signifikanter Unterschied in der relativen Spaltungsaktivität zwischen den nicht lyophilisierten und den lyophilisierten Proben festgestellt werden.

Anhand von drei Referenzsubstanzen konnte somit dargelegt werden, dass die Konzentrierung der Wasserproben um den Faktor 10 durch Lyophilisation die Toxizität erhöht und somit zu einer Verbesserung der Sensitivität des Testsystems beiträgt.



**Abbildung 15: Einfluss der Anreicherung (Faktor 10:1) abgestufter Toxinkonzentrationen von Microcystin LR auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen (+/- SD, n=3, \* \* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ )**

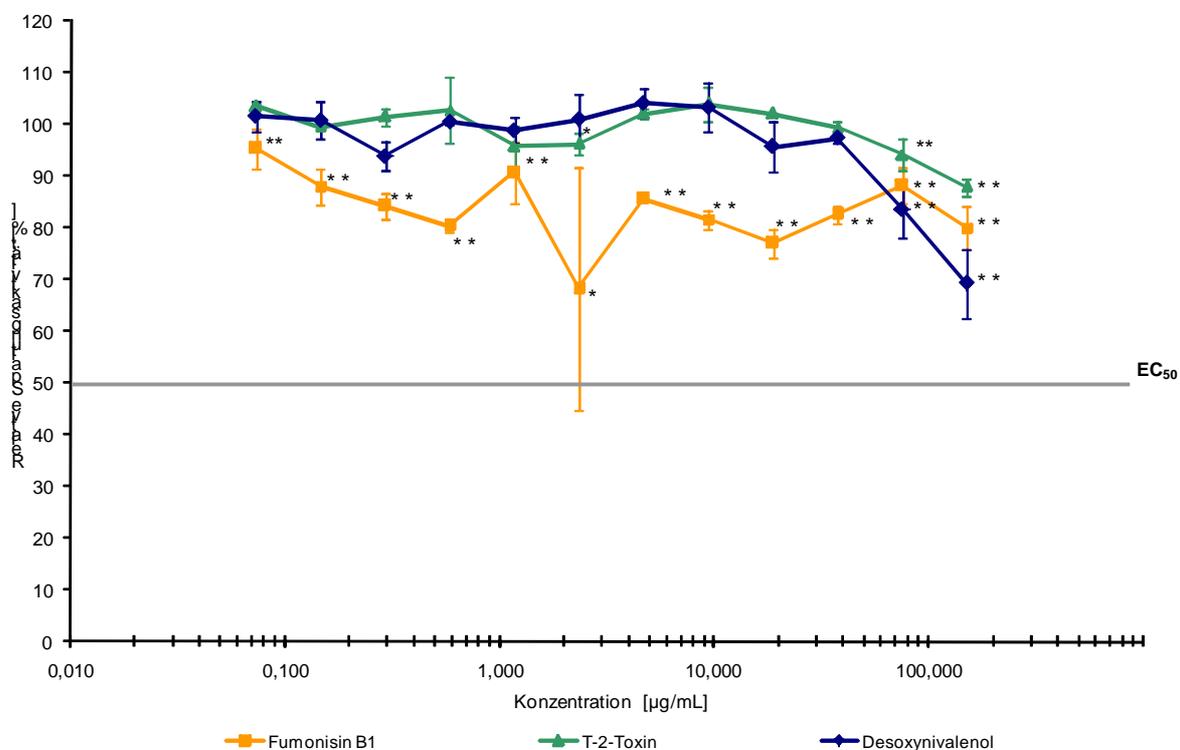
## **2 Wirkung unterschiedlicher Verbindungen im MTT-Test mit BFL-Zellen**

Zur Validierung des MTT-Tests auf der Basis von BFL-Zellen wurden verschiedene mikrobielle Toxine und umweltrelevante Stoffe mit unterschiedlichen Wirkspektren (hepatotoxisch, zytotoxisch, nephrotoxisch, östrogen) getestet. Zur Bestimmung des  $EC_{50}$ -Wertes wurden Trendkurven an die erhaltenen Grafiken gelegt. Die Abbildungsgleichungen mit Bestimmtheitsmaß wurden dafür bestimmt. Durch mathematische Umformung wurden die  $EC_{50}$  - Werte berechnet.

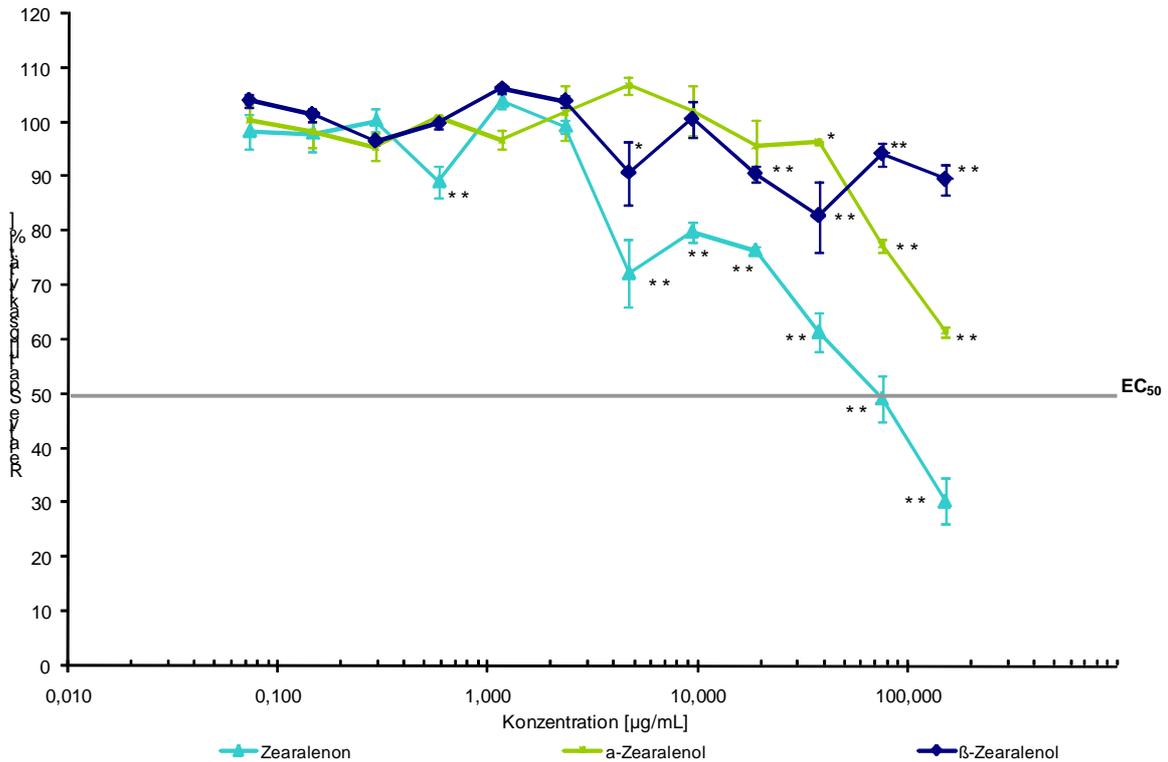
## 2.1 Fusarientoxine

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Fusarientoxinen im MTT-Test sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass Fumonisin B<sub>1</sub>, das in Tierversuchen hepato- und neurotoxische Wirkung aufweist, zwar bereits bei einer Konzentration von 0,06 µg/mL die Spaltungsaktivität signifikant reduziert, aber diese selbst bei 150 µg/mL nur um etwa 20 % absinkt. Bei 2,3 µg/mL ist die stark signifikant reduzierte relative Spaltungsaktivität verbunden mit einer Standardabweichung von SD=23 und schwächt daher das erhaltene Ergebnis ( $p < 0,01$ ) für diesen Wert in dessen Aussagekraft.

Überraschenderweise erwiesen sich auch die als „Hemmer“ der Proteinsynthese bekannten Trichothecene T-2-Toxin und Desoxynivalenol in diesem Testsystem als „wenig“ toxisch. Erst eine Konzentration von 75,0 µg/mL führte bei beiden zu einer signifikanten Erniedrigung der Transformationsleistung von MTT zu Formazan.



**Abbildung 16: Einfluss der Fusarientoxine Fumonisin B<sub>1</sub>, T-2-Toxin und Desoxynivalenol auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ )**



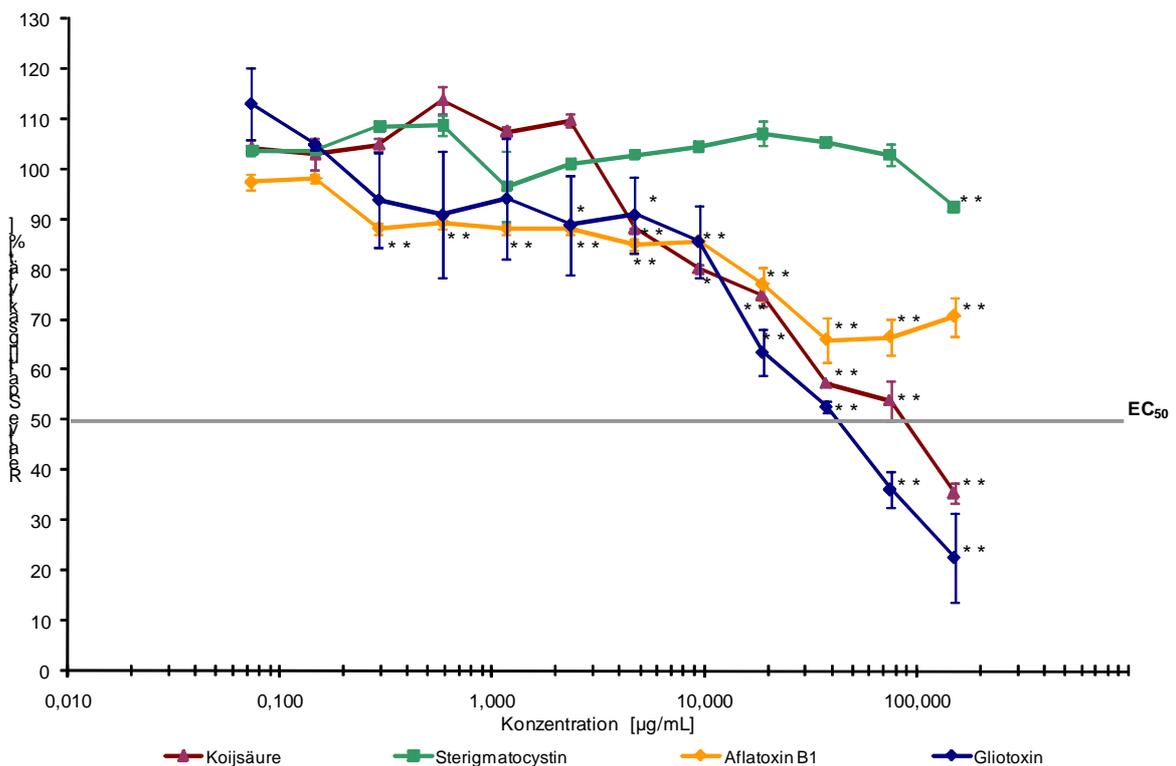
**Abbildung 17: Einfluss der Fusarientoxine Zearalenon, α-Zearalenol und β-Zearalenol auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \* \* = p<0,01, \* = p<0,05)**

Demgegenüber scheinen BFL-Zellen relativ sensitiv gegenüber Östrogen-wirkenden Resorcyssäurelacton-Derivaten zu sein. Vor allem Zearalenon und β-Zearalenol führten ab Konzentrationen von 2,5 µg/mL bzw. 18,75 µg/mL zu einer signifikanten Abnahme der relativen Spaltungsaktivität. Dabei ist bemerkenswert, dass Zearalenon die Umwandlung von MTT zu Formazan in den höheren Konzentrationsbereichen deutlich (um bis zu 70 %) beeinträchtigte. Vergleichbares konnte auch für α-Zearalenol beobachtet werden, wenn auch nicht in einem derartigen Ausmaß.

Der EC<sub>50</sub>-Wert für Zearalenon beträgt c=90,5 µg/mL. Dies geht aus der Näherungsgleichung  $y = 92,164 \cdot e^{-0,0078 \cdot x}$  ( $R^2=0,9261$ ) hervor.

## 2.2 *Aspergillus* Toxine

Die für Ihre zytotoxische Wirkung bekannten *Aspergillus* Toxine Gliotoxin, Kojisäure, Sterigmatocystin und Aflatoxin B<sub>1</sub> wurden ebenfalls im MTT-Test auf Basis von BFL-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Einfluss von Gliotoxin, Kojisäure, Sterigmatocystin und Aflatoxin B<sub>1</sub> auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* = p<0,01, \* = p<0,05)**

Gliotoxin und Kojisäure reduzierten ab der Konzentration von 2,4 µg/mL bzw. 4,8 µg/mL die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen in signifikantem Umfang und zeigten bei Toxinkonzentrationen von 150 µg/mL die höchste toxische Wirkung mit einer Verringerung der relativen Spaltungsaktivität um bis zu 77 % bzw. 68 %.

Erwähnenswert ist, dass Kojisäure bei niedrigeren Konzentrationen bis 2,4 µg/mL die Spaltungsaktivität zunächst erhöht und erst ab dieser Konzentration die relative Spaltungsaktivität der BFL-Zellen negativ beeinflusst. Sterigmatocystin zeigt bei den Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss auf

die BFL-Zellen. Aflatoxin B<sub>1</sub> als hepatotoxisches Aspergillustoxin verursachte bis zur Konzentration von 0,15 µg/mL keine signifikante Abweichung von der Zellkontrolle. Von 0,15 µg/mL bis 9,3 µg/mL bewegt sich die relative Spaltungsaktivität zwischen 82 % und 85 %. Mit steigender Toxinkonzentration sinkt die relative Spaltungsaktivität bis auf 65 % ab.

Der EC<sub>50</sub>-Wert für Gliotoxin beträgt c=53,4 µg/mL. Dies geht aus der Näherungsgleichung  $y = -8 \cdot 10^{-5} \cdot x^3 + 0.0228 \cdot x^2 - 2.0779 \cdot x + 99.6$  (R<sup>2</sup>=0,9551) hervor.

Der EC<sub>50</sub>-Wert für Kojisäure beträgt c=128,8 µg/mL. Dies kann aus der Näherungsgleichung  $y = 2 \cdot 10^{-6} \cdot x^4 - 0.0006 \cdot x^3 + 0.0689 \cdot x^2 - 3.103 \cdot x + 108.25$  (R<sup>2</sup> = 0,964) abgeleitet werden.

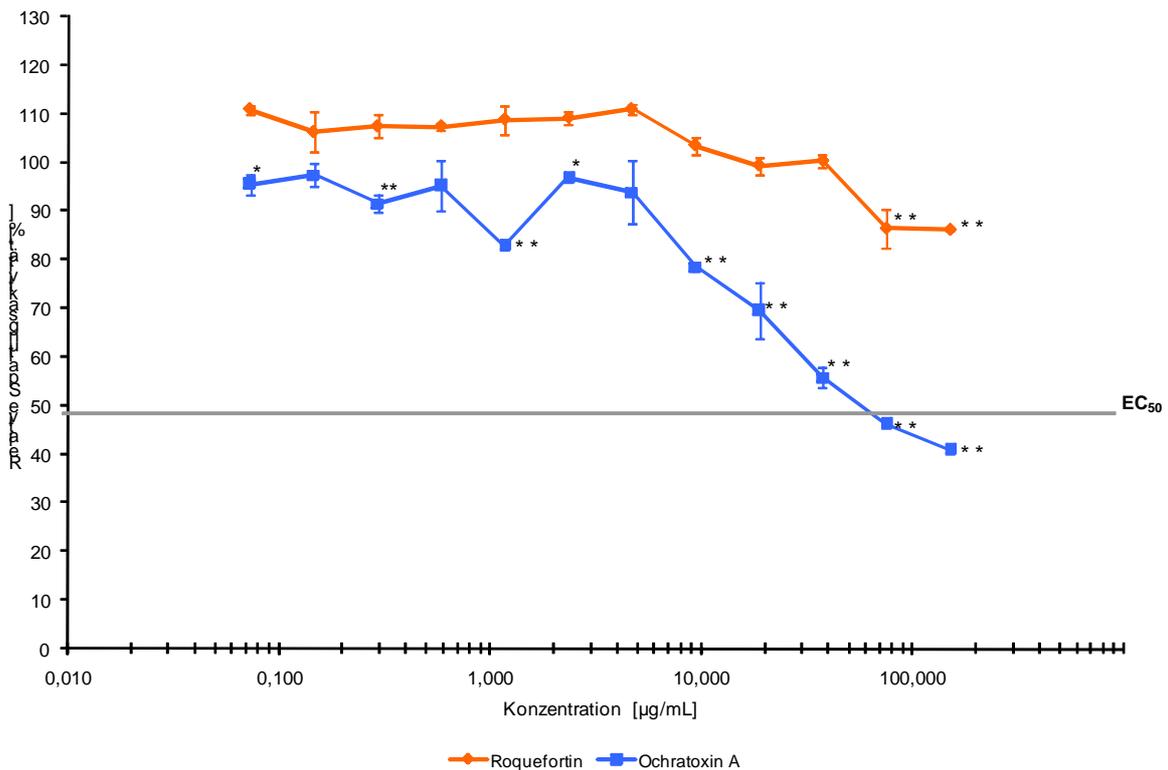
### **2.3 *Penicillium* Toxine**

Der Einfluss von Roquefortin und des zytotoxisch, nephrotoxisch und hepatotoxisch wirkenden Ochratoxin A auf die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen wurde ebenfalls im MTT-Test geprüft. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dieses MTT-Tests dargestellt.

Roquefortin reduziert, erst bei höheren Konzentrationen, ab 37,5 µg/mL die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen in signifikantem Umfang.

Ochratoxin A zeigt bereits ab der niedrigen Konzentrationsstufe von 4,68 µg/mL eine signifikante toxische Wirkung auf die BFL-Zellen im MTT-Test. Bei einer Ochratoxinkonzentration von 150 µg/mL wird die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen im Vergleich zur Zellkontrolle um 60 % reduziert.

Der EC<sub>50</sub>-Wert für Ochratoxin A beträgt c=48,6 µg/mL. Dies resultiert aus der Näherungsgleichung  $y = -6 \cdot 10^{-5} \cdot x^3 + 0.0175$  (R<sup>2</sup> = 0.9576).



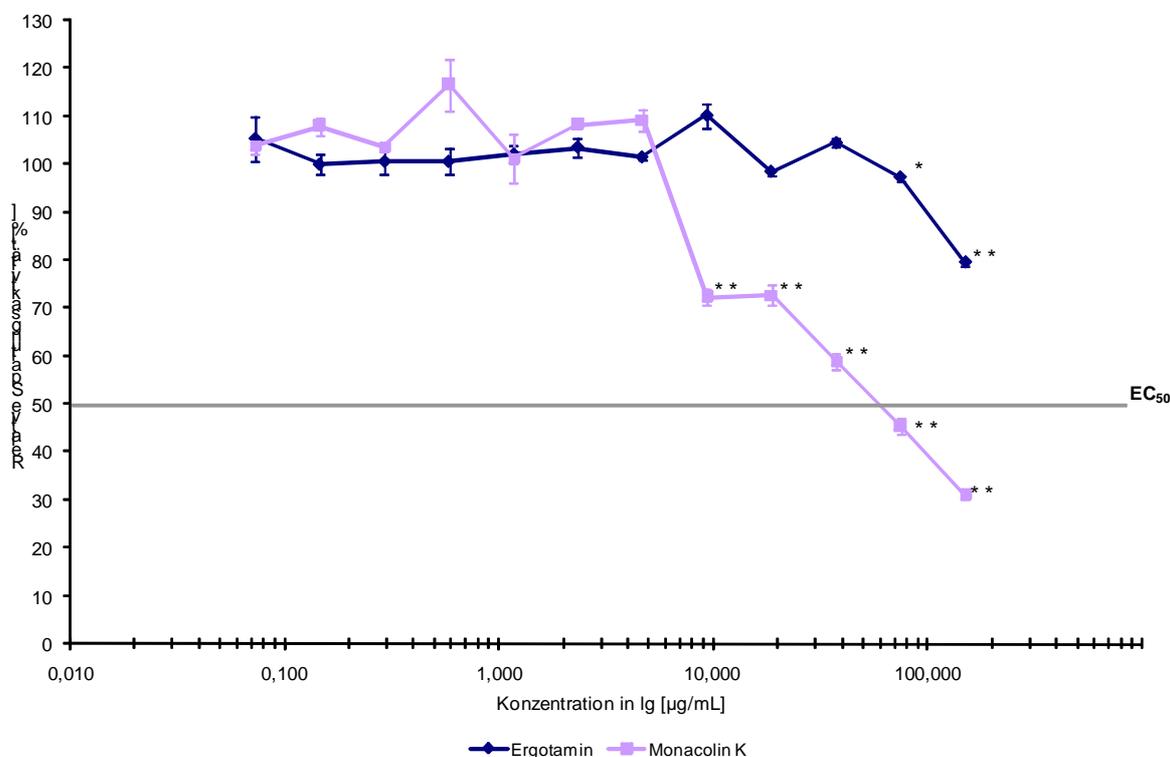
**Abbildung 19: Einfluss von Roquefortin und Ochratoxin A auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ )**

## 2.4 Weitere Mykotoxine

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Ergotamin und Monacolin K<sub>5</sub> sind in Abbildung 20 dargestellt. Monacolin K<sub>5</sub> reduziert ab der Konzentration  $c=4,7 \mu\text{g/mL}$  die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen signifikant; bei  $150 \mu\text{g/mL}$  um bis zu 70 %. Niedrige Konzentrationen bis  $4,7 \mu\text{g/mL}$  erhöhten zunächst die Spaltungsaktivität.

Für das secale Alkaloid Ergotamin konnte im Konzentrationsbereich von  $0,0073 \mu\text{g/mL}$  bis  $37,5 \mu\text{g/mL}$  keine signifikante Abweichung der BFL-Zellen von der Zellkontrolle festgestellt werden. Erst Konzentrationen von  $75 \mu\text{g/mL}$  und  $150 \mu\text{g/mL}$  zeigten signifikante Reduktionen der Umsetzung von MTT zu Formazan.

Der  $EC_{50}$ -Wert für Monacolin  $K_S$  beträgt  $c=45,9 \mu\text{g/mL}$ . Dies geht aus der Näherungsgleichung  $y= -0.0001*x^3 + 0.0295*x^2 - 2.3976*x + 108.45$  ( $R^2=0.9347$ ) hervor.

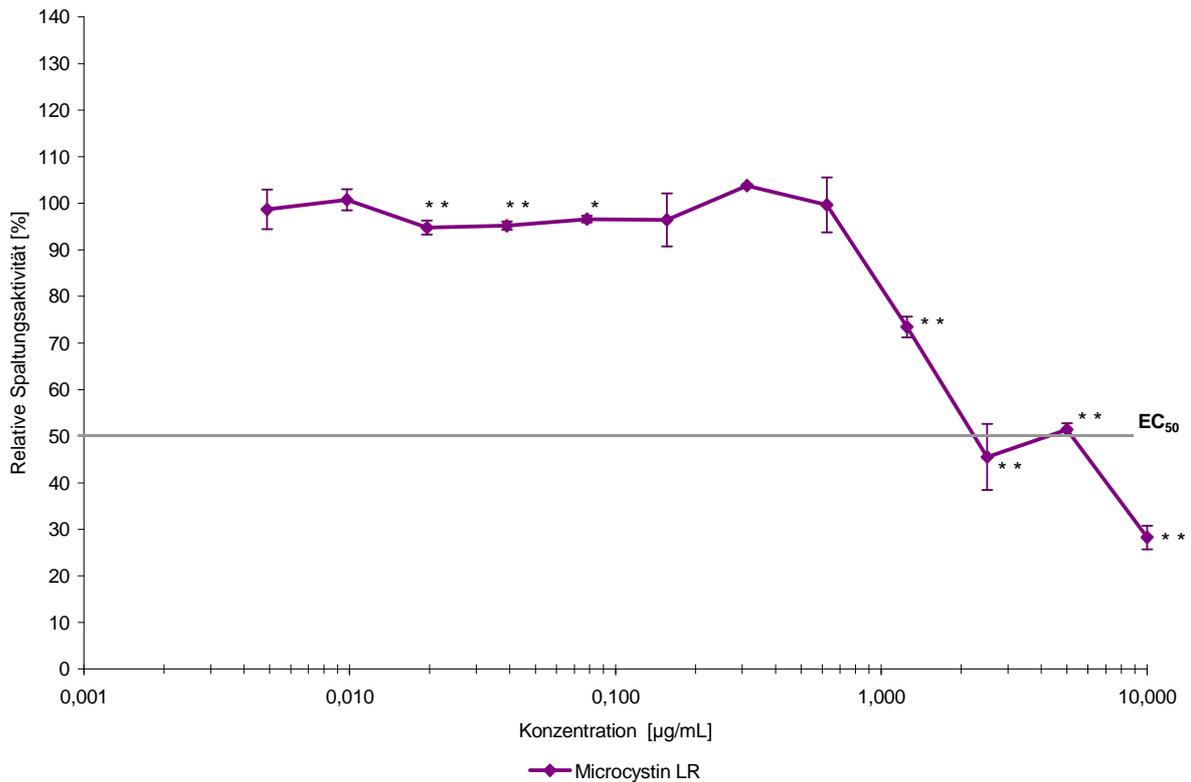


**Abbildung 20: Einfluss der Toxine Ergotamin und Monacolin  $K_S$  auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* =  $p<0,01$ , \* =  $p<0,05$ )**

## 2.5 Microcystin LR

Die Reaktion der BFL-Zellen auf das cyclische Heptapeptid Microcystin LR wurde ebenfalls im MTT-Test getestet (siehe Abbildung 21). Bei diesem Test zeigte sich für diesen selektiven Inhibitor der Proteinphosphatase bereits ab der Konzentration von  $0,625 \mu\text{g/mL}$  ein negativer Einfluss auf die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen. Der „Vitalitätsverlust“ der BFL-Zellen war bei der Konzentration von  $10 \mu\text{g/mL}$  mit 72 % am höchsten.

Der  $EC_{50}$ -Wert beträgt  $c=3,7 \mu\text{g/mL}$  und geht aus der Näherungsgleichung  $y= -0.4066*x^4 + 6.5096*x^3 - 26.045*x^2 + 9.0919*x + 97.703$  ( $R^2 = 0.9814$ ) hervor.



**Abbildung 21: Einfluss von Microcystin LR auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* = p<0,01, \* = p<0,05)**

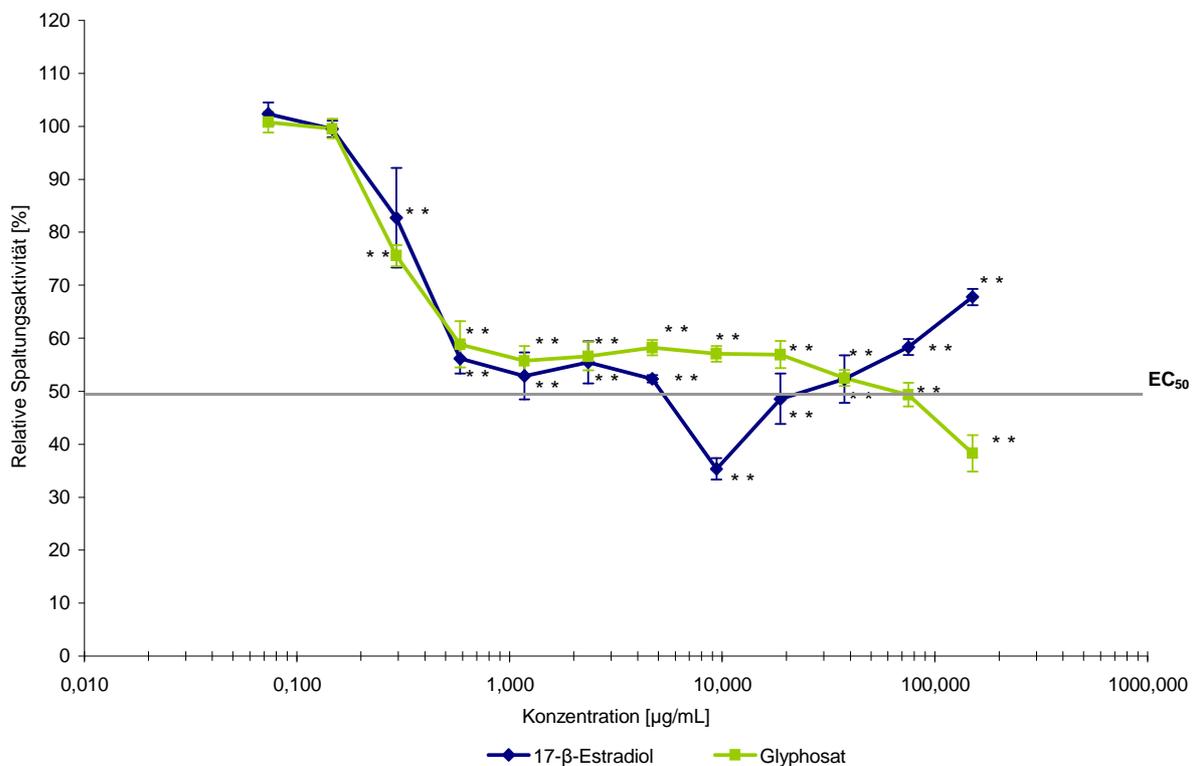
## 2.6 Weitere umweltrelevante Verbindungen

Die Wirkung von 17-β-Estradiol und Glyphosat wurde ebenfalls im MTT-Test auf Basis von BFL-Zellen untersucht. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse. 17-β-Estradiol ist in hormonalen Empfängnisverhütungsmitteln enthalten und Glyphosat wird in Form des Pflanzenschutzmittels „Round up“ seit den 1980er Jahren vor allem in der Grünlandbewirtschaftung (Feld-, Gemüse-, Obst-, Wein- und Zierpflanzenbau) eingesetzt. Es ist ein nicht selektives Blattherbizid mit systemischer Wirkung zur Bekämpfung einjähriger und ausdauernder Ungräser und Unkräuter. Beide Toxine haben bereits ab niedrigen Konzentrationen ( $c=0,15 \mu\text{g/mL}$ ) einen signifikanten Einfluss auf die Spaltungsaktivität der BFL-Zellen im MTT-Test. Ab der Konzentration von  $0,15 \mu\text{g/mL}$  fällt die relative Spaltungsaktivität für 17-β-Estradiol und Glyphosat rapide ab. Beim Test von Glyphosat verblieb die Stoffwechselaktivität dann auf einem annähernd

gleichen Niveau von ca. 50 % und fiel bei der Konzentration von 150 µg/mL um weitere 10 %.

17-β-Estradiol führte bei der Konzentration von 9,3 µg/mL zu einem weiteren Absinken der „Zellvitalität“ auf unter 40 %; ab der Konzentration von circa 20 µg/mL stieg die relative Stoffwechselaktivität wieder kontinuierlich bis auf 67 % an.

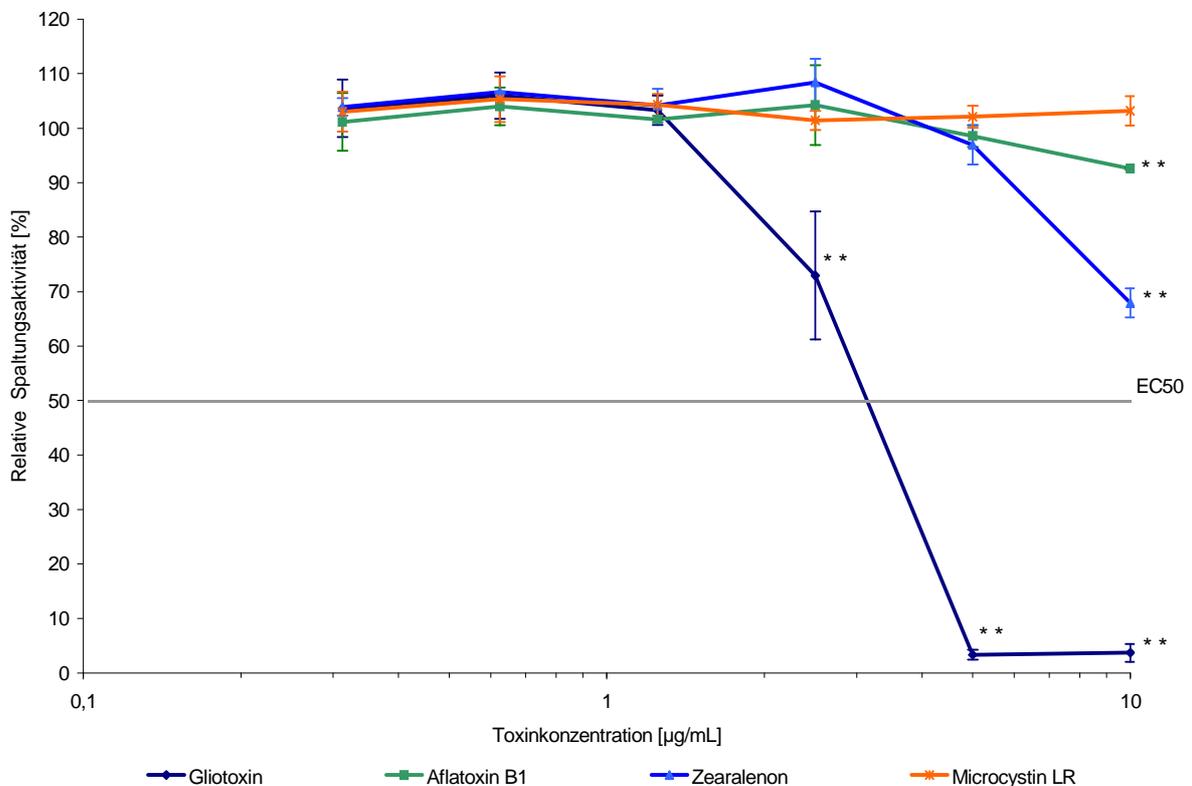
Der EC<sub>50</sub>-Wert für Glyphosat beträgt c=45,9 µg/mL. Dies geht aus der Näherungsgleichung  $y = -0.5827 \cdot \ln(x) + 71.173$  ( $R^2 = 0.938$ ) hervor.



**Abbildung 22: Einfluss der Toxine 17-β-Estradiol und Glyphosat auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* = p<0,01, \* = p<0,05)**

### 3 Wirkung von Toxinen im MTT-Test mit Hep2- bzw. Verozellen

Um festzustellen, inwieweit sich die Sensitivität von Bachforellenhepatozyten von anderen Zellen unterscheidet, wurden vergleichend ein MTT-Tests mit Hep2- und Verozellen durchgeführt. Als „Prüftoxine“ wurden Aflatoxin B<sub>1</sub>, Gliotoxin, Zearalenon und Microcystin LR ausgewählt. In Abbildung 23 ist die Wirkung dieser Toxine auf Hep2-Zellen dargestellt; den Einfluss auf Verozellen verdeutlicht Abbildung 24.



**Abbildung 23: Einfluss der Toxine Gliotoxin, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Zearalenon und Microcystin LR auf die relative Spaltungsaktivität von Hep2-Zellen im MTT-Test (+/- SD, n=3, \*\* = p<0,01, \* = p<0,05; Zellkontrolle 100 % [SD= 2,7])**

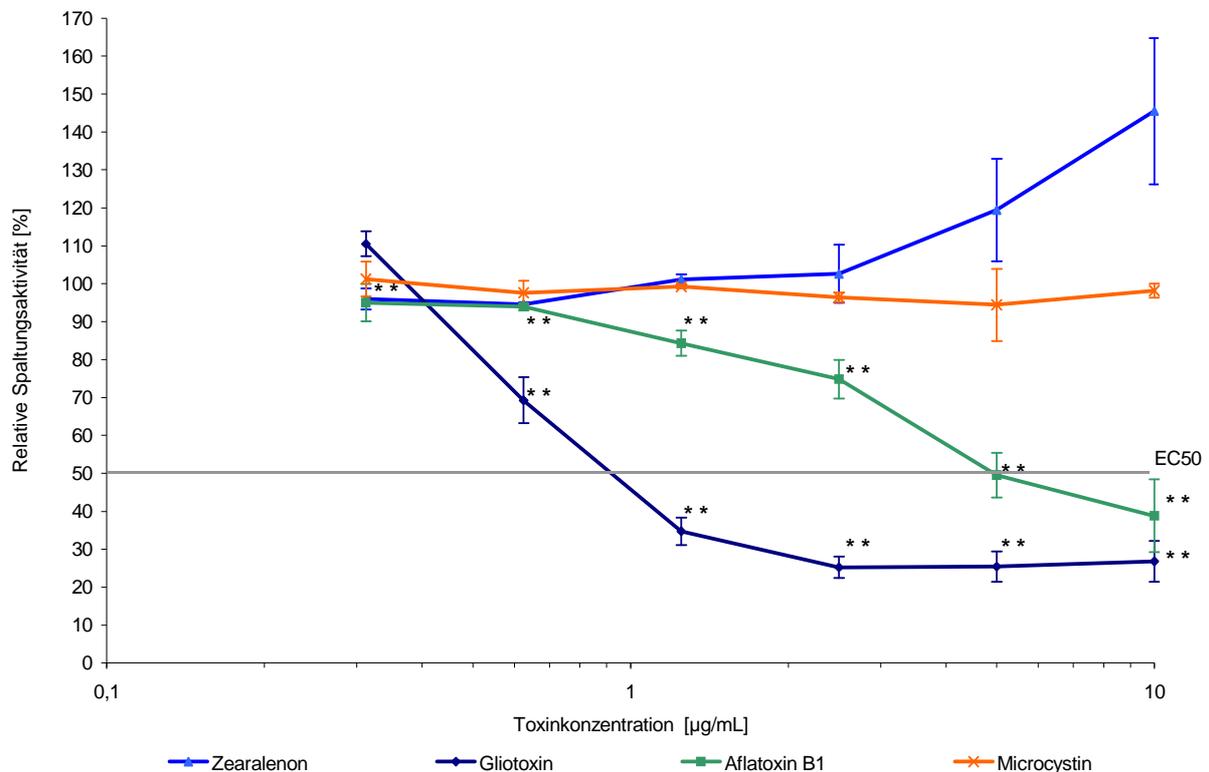
Verozellen verhielten sich beim Test von Microcystin LR ähnlich wie Hep2-Zellen; auch in diesem Zelltestsystem war keine Beeinflussung der Spaltungsaktivität nachweisbar (vergl. Abbildung 24).

Dagegen reagierten Verozellen im Vergleich zu Hep2-Zellen und BFL-Zellen deutlich sensibler auf Aflatoxin B<sub>1</sub>; eine signifikante Beeinträchtigung der

Spaltungsaktivität konnte bereits bei der Toxinkonzentration von 0,31 µg/mL beobachtet werden.

Gliotoxin hatte auf Verozellen zwar einen signifikanten Einfluss, jedoch nicht in dem Ausmaß wie auf Hep2-Zellen. Beispielsweise betrug bei der Gliotoxinkonzentration von 10 µg/mL die relative Spaltungsaktivität von Verozellen 26,81% und bei Hep2-Zellen 3,7%. BFL-Zellen zeigten auf Gliotoxin eine mit Verozellen vergleichbare, aber stark abgeschwächte Reaktion; die „Zellvitalität“ sank beispielsweise bei der Gliotoxinkonzentration von 10 µg/mL auf 85,3 % ab.

Bei der Prüfung von Zearalenon war beim Test mit Verozellen im Vergleich zu Hep2-Zellen und BFL-Zellen eine Stimulierung der Formazanbildung festzustellen. Die relative Spaltungsaktivität der Verozellen stieg bei der Konzentration von 10 µg/mL auf relative Spaltungsaktivitäten bis 143 % an. Diese Werte sind jedoch aufgrund der hohen Streuung der Ergebnisdaten als statistisch nicht signifikant einzustufen.



**Abbildung 24: Einfluss der Toxine Zearalenon, Gliotoxin, Aflatoxin B<sub>1</sub> und Microcystin LR auf die relative Spaltungsaktivität von Verozellen im MTT-Test (+/- SD, n=3; , \*\* = p<0,01, \* = p<0,05; Zellkontrolle 100 % [SD= 3,5])**

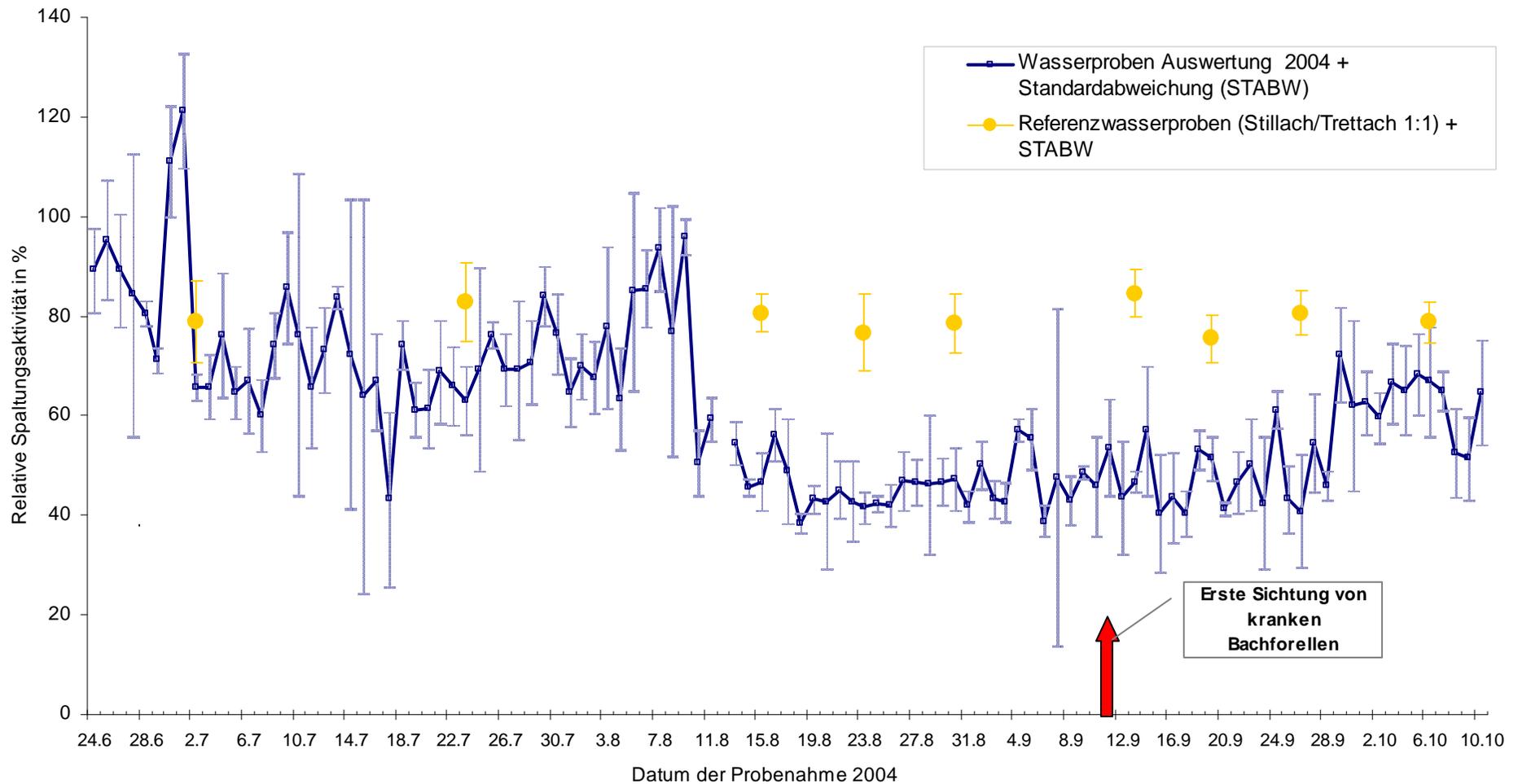
---

## **4      *Untersuchung von Wasserproben der Iller mit dem MTT-Test***

In den folgenden Kapiteln 4.1 und 4.2 sind die Ergebnisse der Freilanduntersuchungen mit den Zelltestsystemen auf Basis von BFL, Hep2- und Vero-Zellen dargestellt. Zusätzlich werden potentielle anthropogene Einflussfaktoren auf die Iller beschrieben (vgl. Kapitel 4.3).

### **4.1    *Resultate mit BFL-Zellen***

Im Jahr 2004 wurden zwischen dem 24.6.2004 und dem 11.10.2004 109 Wasserproben aus der Iller gewonnen. Diese wurden mittels Lyophilisation um den Faktor 10 konzentriert. Anschließend wurde die toxische Wirkung dieser Wasserpräparationen auf BFL-Zellen im MTT-Test geprüft. Im Jahr 2005 wurden zwischen dem 15.6.2005 und dem 14.10.2005 120 Wasserproben gezogen und analog aufbereitet. Die dabei erzielten Resultate sind in der Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 25: Einfluss der Wasserprobenkonzentrate (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2004 auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD=6,3]; n=9) und Vergleich mit Referenzwasserproben (Stillach/Trettach, 1:1; Probenahmestandorte siehe Kartenanhang)**

*Wasserproben Iller 2004:*

Es fällt auf, dass Wasserproben, die zwischen dem 24.06.2004 und 09.08.2004 gewonnen wurden, die relative Spaltungsaktivität der Leberzellen nur geringfügig beeinträchtigten (siehe Abbildung 25); die Werte betragen im Durchschnitt circa 80 % im Vergleich zur Zellkontrolle. Diese Werte lagen im Bereich der Referenzwerte der Quellzuflüsse Stillach und Trettach (1:1). Wasserproben, die nach dem 09.08.2004 gezogen wurden, führten zu einer Hemmung der Formazanbildung um weitere 25%, was als Hinweis für eine Belastung des Wassers mit toxischen Stoffen gewertet werden kann. Weniger stark wurde die Spaltungsaktivität der Bachforellenzellen durch Wasserproben gehemmt, die nach dem 25. September gewonnen wurden. Ab dem 25. September stieg die relative Spaltungsaktivität bis zum Ende der Probennahme (10.10.) kontinuierlich an. Sämtliche Ergebnisse der Wasserprobenuntersuchung unterschieden sich signifikant von der Zellkontrolle.

Dieser Ansatz wurde für alle 109 Wasserproben von verschiedenen Personen insgesamt neun mal wiederholt. Es konnten reproduzierbare Ergebnisse mit angegebener Standardabweichung erzielt werden.

*Wasserprobenmischung Referenzgewässer Stillach/Trettach 2004:*

Die im Quellgebiet der Referenzgewässer Stillach und Trettach über den gesamten Versuchszeitraum stichprobenartig gezogenen Wasserproben führten zu einer geringen Reduktion (circa -20 %) der Spaltungsaktivität der BFL-Zellen. Auffällig dabei war, dass die Werte zwischen den einzelnen Proben nur geringfügig schwankten.

*Wasserproben Iller 2005:*

Die Untersuchung von Illerwasserproben aus dem Jahr 2005 erbrachte vergleichbare Ergebnistendenzen (siehe Abbildung 26). Auch in dieser Versuchsreihe wurde zu Beginn des Untersuchungszeitraumes (vom 15.06 – 29.07.2005) die durchschnittliche relative Spaltungsaktivität der Zellen wenig beeinflusst, wenn auch festzustellen ist, dass die Schwankungen von Probe zu Probe durchaus beträchtlich waren. Auffällig ist jedoch, dass Proben, die nach dem 02.08.2005 gezogen wurden, zu einem deutlichen Abfall der Formazanbildung führten, was erneut auf eine Belastung mit toxischen Stoffen hinweist. Im Gegensatz zum Jahr 2004 konnte im Jahr 2005 gegen Ende der

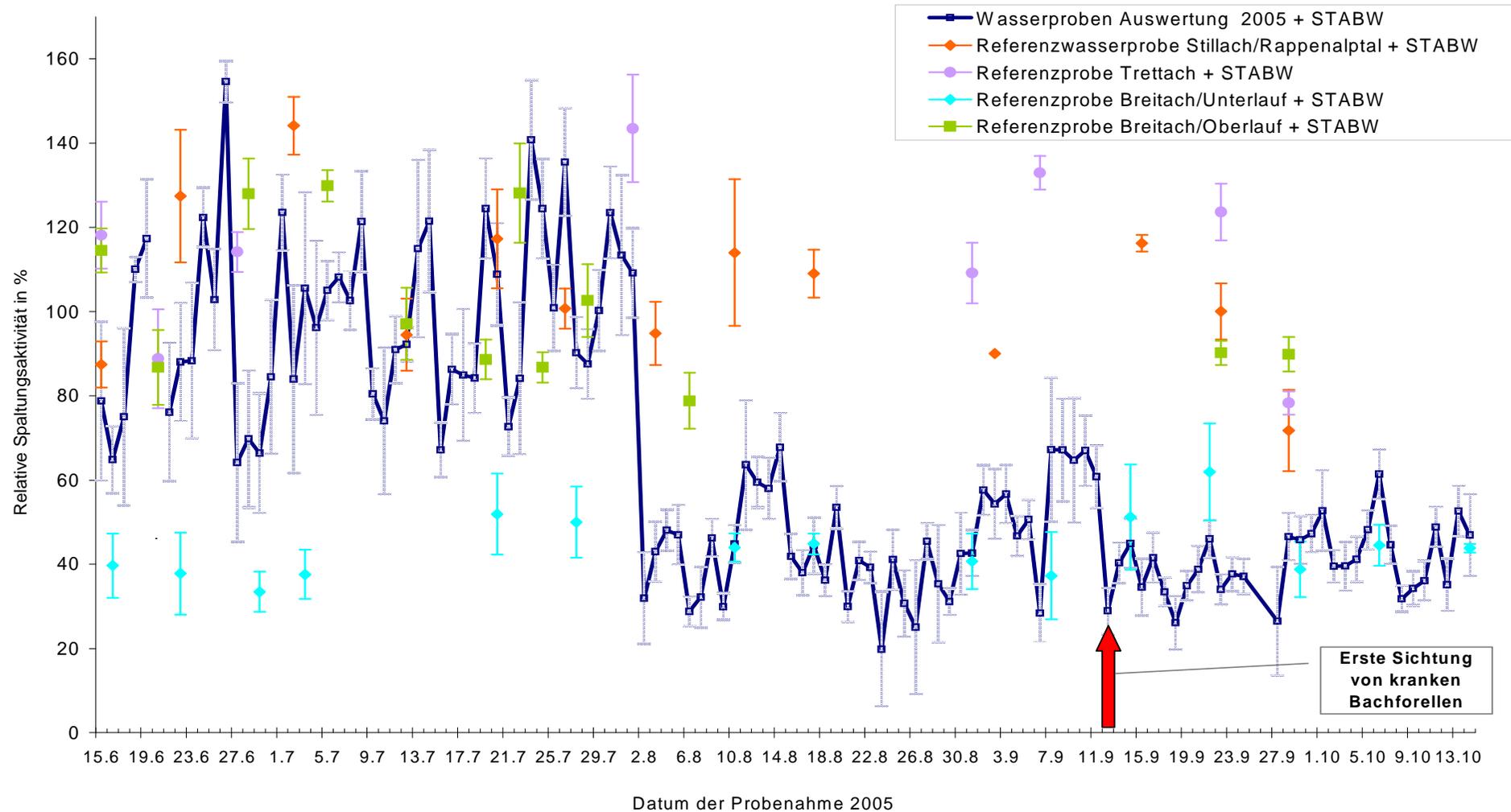
---

Versuchsperiode keine ansteigende relative Spaltungsaktivität festgestellt werden.

*Wasserproben Referenzgewässer Breitach, Stillach, Trettach 2005:*

Die Auswertung der Referenzwasserproben aus dem Breitach – Unterlauf ergab eine reduzierte relative Spaltungsaktivität der BFL-Zellen von circa 40% (ab 2.8.2005). Referenzwasserproben aus dem Oberlauf der Breitach, der Stillach und Trettach führten im zeitlichen Verlauf zu großen Schwankungen der Spaltungsaktivität der BFL-Zellen (Oberlauf Breitach: 80% - 130%; Stillach: 70% - 140%; Trettach: 90% - 130%).

Die Standardabweichung bei der Untersuchung 2005 ist vergleichbar mit den Ergebnissen im Jahr 2004. Die enormen täglichen Schwankungen der Spaltungsaktivität mit gleichbleibenden Standardabweichungen könnten auf starke Toxizitätsunterschiede hindeuten.



**Abbildung 26: Einfluss der Wasserprobenkonzentration (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2005 auf die relative Spaltungsaktivität von BFL-Zellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD=7,1]; n=7) und Vergleich mit Referenzprobenahmen der Zuflüsse (Stillach, Trettach, Breitach – Oberlauf bzw. Unterlauf; Probenahmestandorte siehe Kartenanhang)**

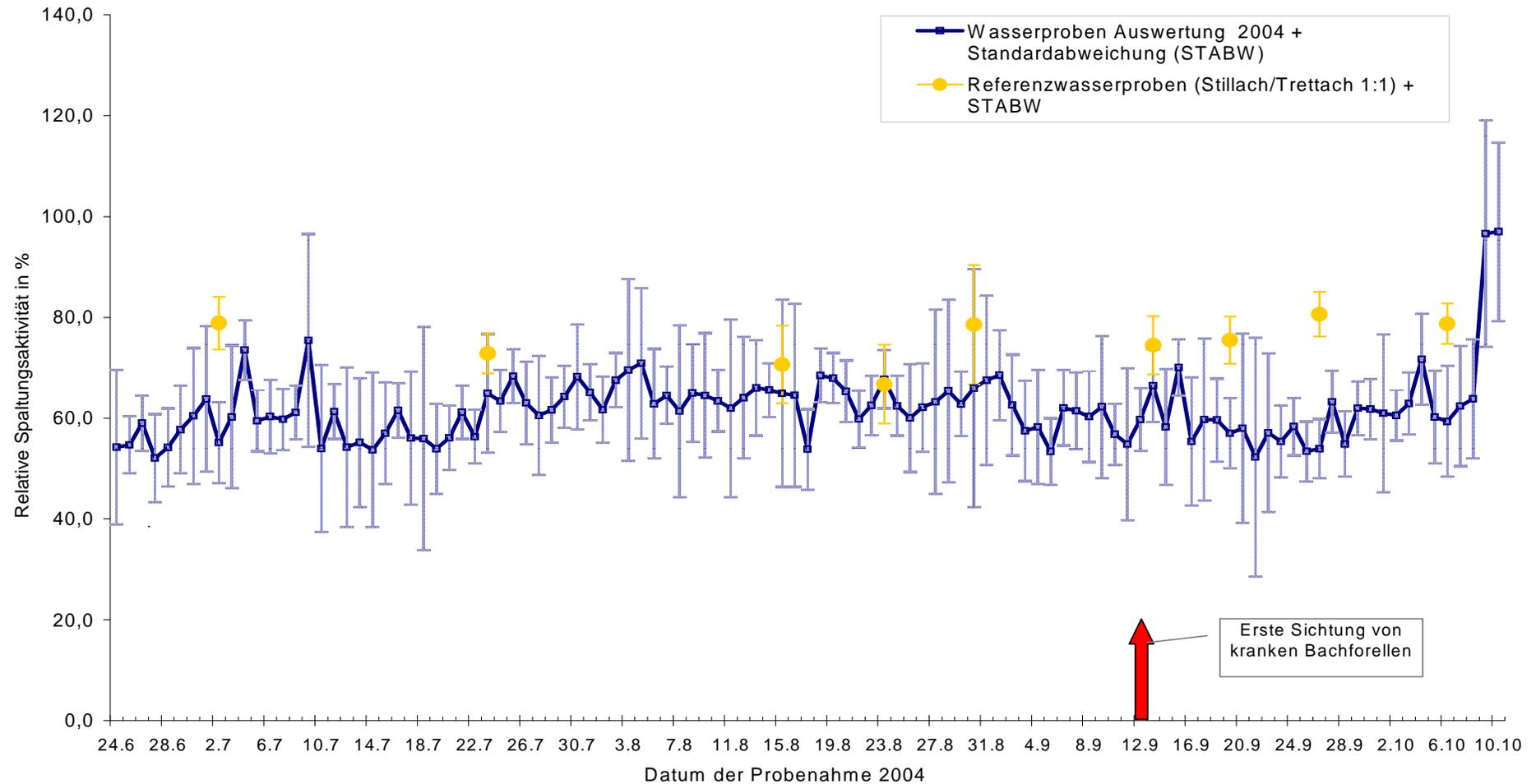
## **4.2 Resultate mit Vero- und Hep2-Zellen**

Um festzustellen, ob andere Zellen auf die Wasserprobenkonzentrate in gleicher Weise reagieren als BFL-Zellen, wurden die Proben aus den Jahren 2004 und 2005 auch im MTT-Test auf der Basis von Hep2- und Verozellen getestet.

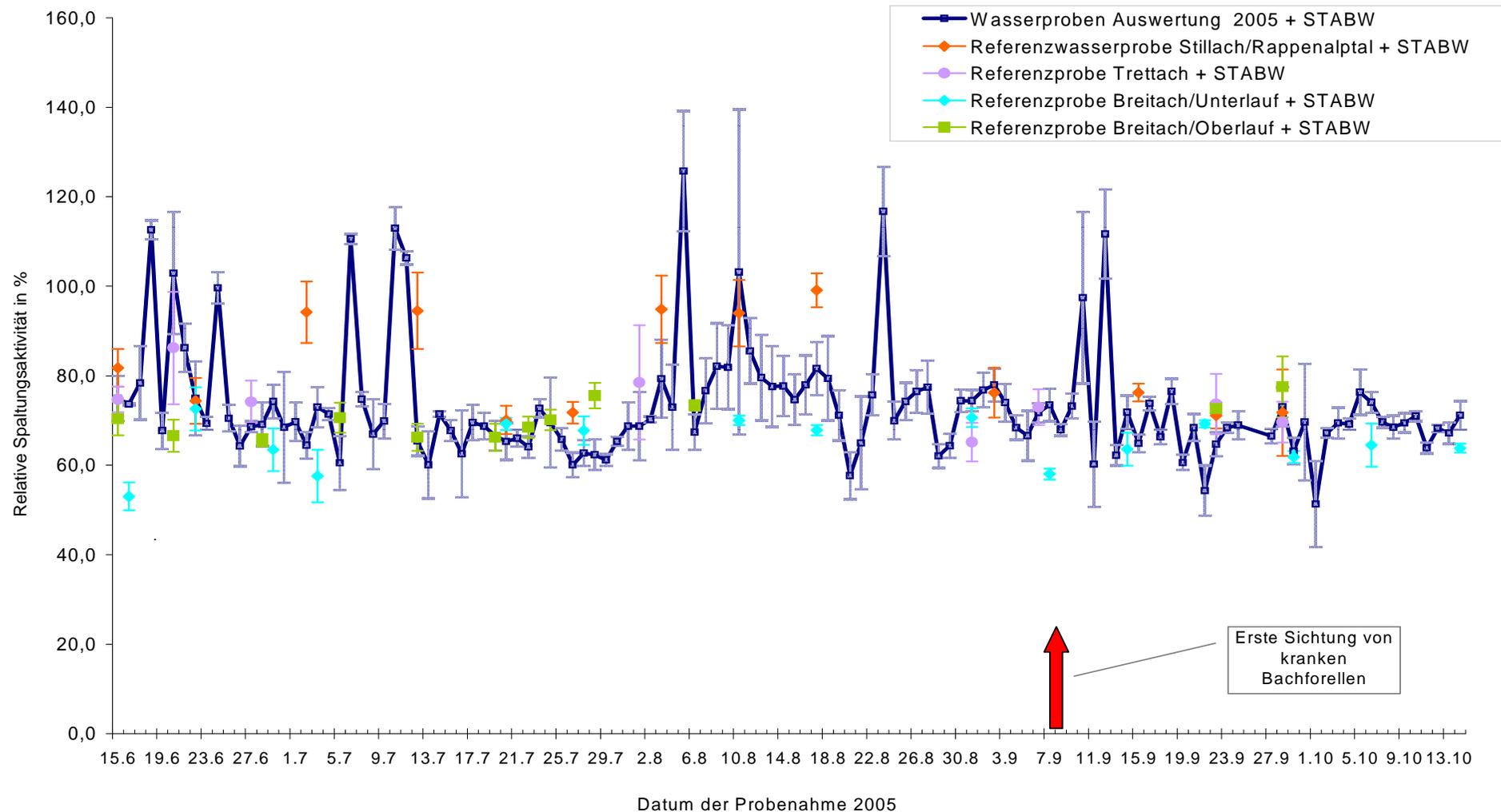
Bei der Untersuchung der Proben mit Verozellen ergaben sich für beide Untersuchungsabschnitte vergleichbare Resultate. Die Behandlung der Zellen mit Wasserkonzentraten beider Untersuchungsjahre führte nahezu durchgehend zu einer deutlichen Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität um 40 % bzw. 30 % (vergl. Abbildung 27 und Abbildung 28). Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit BFL-Zellen konnten allerdings keine saisonalen Einflüsse festgestellt werden. Vergleichbares war auch bei den Untersuchungen mit Hep2-Zellen (vergl. Abbildung 29 und Abbildung 30) feststellbar.

Auffällig bei den einzelnen Untersuchungen war, dass die Wasserproben des Jahres 2005 bei Verozellen, Hep2-Zellen und auch bei den BFL-Zellen größere tägliche Schwankungen hervorriefen als im Jahre 2004.

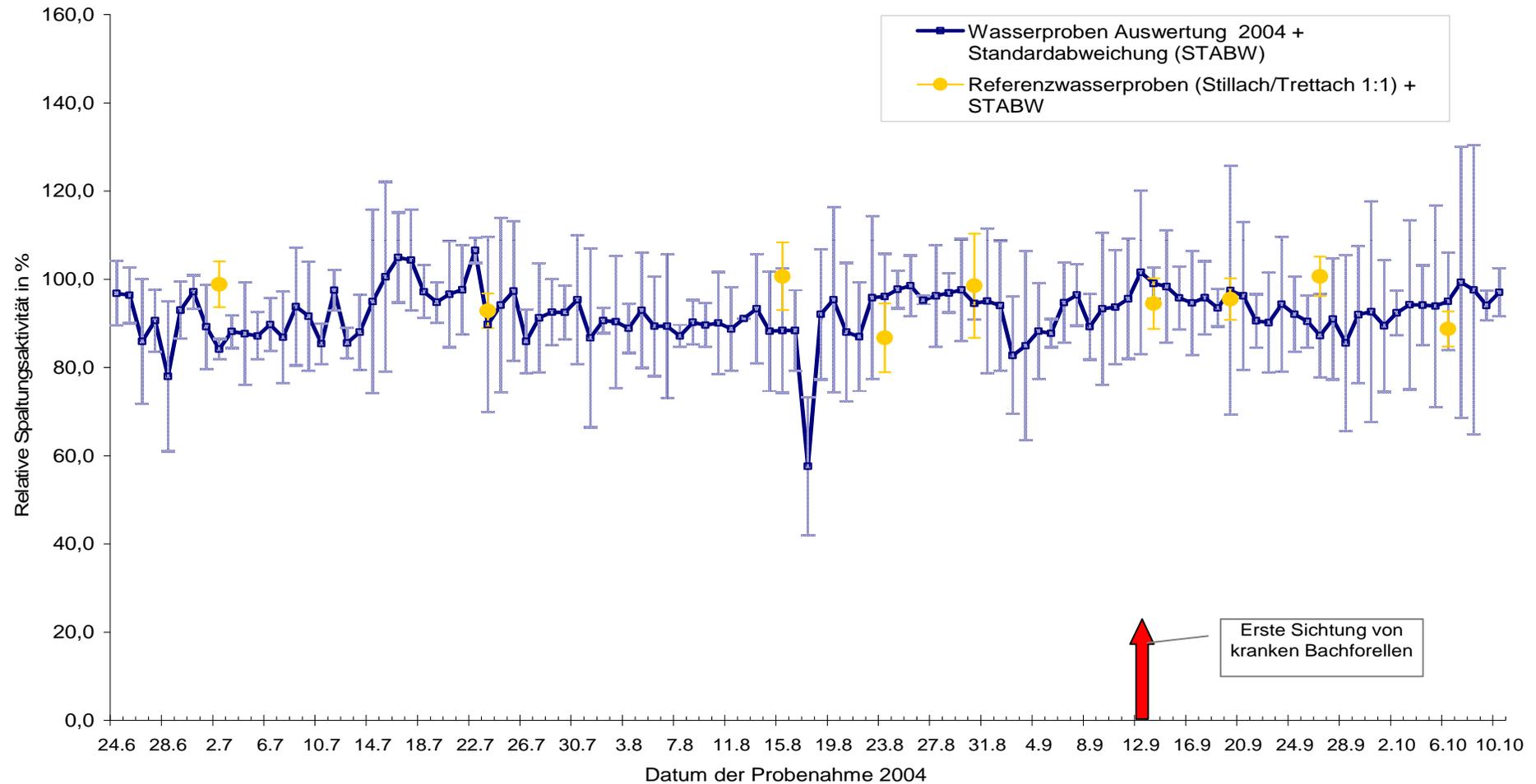
Obwohl kein saisonaler Effekt bei den Verozellen und den Hep2-Zellen zu beobachten war, sind die unterschiedlichen, sich stark ändernden Spaltungsaktivitäten bei diesen Zelllinien auffällig.



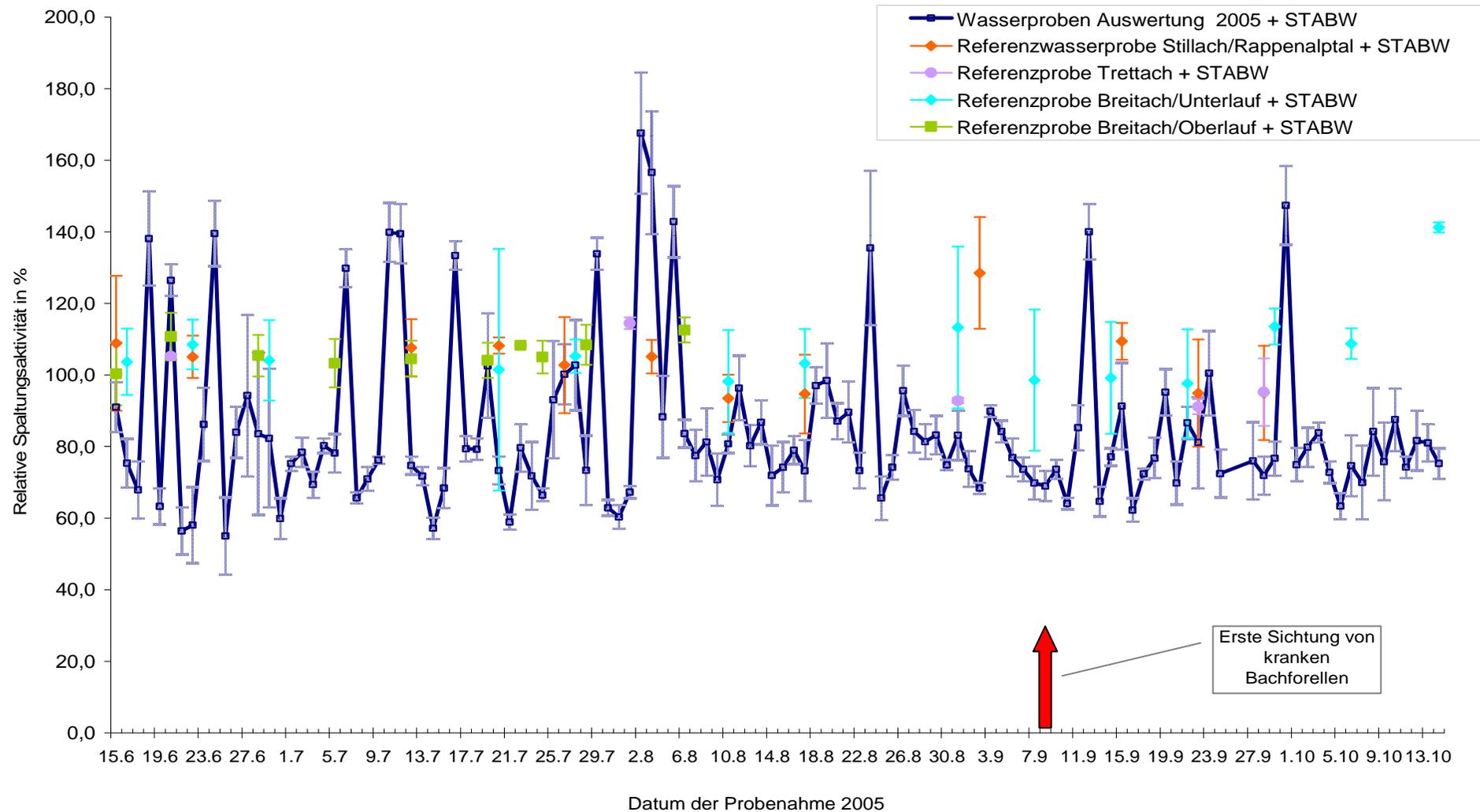
**Abbildung 27: Einfluss der Wasserprobenkonzentration (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2004 auf die relative Spaltungsaktivität von Verocellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD=4,9], Referenz SD=5,7, n=3) und Referenzwasserproben der Zuflüsse (Stillach/Trettach, 1:1; Probenahmestandorte siehe Kartenanhang)**



**Abbildung 28: Einfluss der Wasserprobenkonzentrate (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2005 auf die relative Spaltungsaktivität von Verocellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD = 6,7]; n=3) und Vergleich mit Referenzprobenahmen der Zuflüsse (Stillach, Trettach, Breitach – Oberlauf bzw. Unterlauf; Probenahmestandorte siehe Kartenanhang)**



**Abbildung 29: Einfluss der Wasserprobenkonzentrate (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2004 auf die relative Spaltungsaktivität von Hep2-Zellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD = 5,4]; n=3) und Vergleich mit Referenzwasserproben der Zuflüsse (Stillach/Trettach, 1:1; Probenahmestandorte siehe Kartenanhang)**



**Abbildung 30: Einfluss der Wasserprobenkonzentrate (Faktor 10:1) der Iller des Jahres 2005 auf die relative Spaltungsaktivität von Hep2-Zellen im MTT-Test (Zellkontrolle 100 % [SD=7,9]; n=3) und Vergleich mit Referenzprobenahmen der Zuflüsse (Stillach, Trettach, Breitach – Oberlauf bzw. Unterlauf; Probenahmestandorte siehe Anhang)**

### **4.3 Darstellung „ökologischer und anthropogen bedingter Parameter“ an der Iller bzw. im Illereinzugsgebiet**

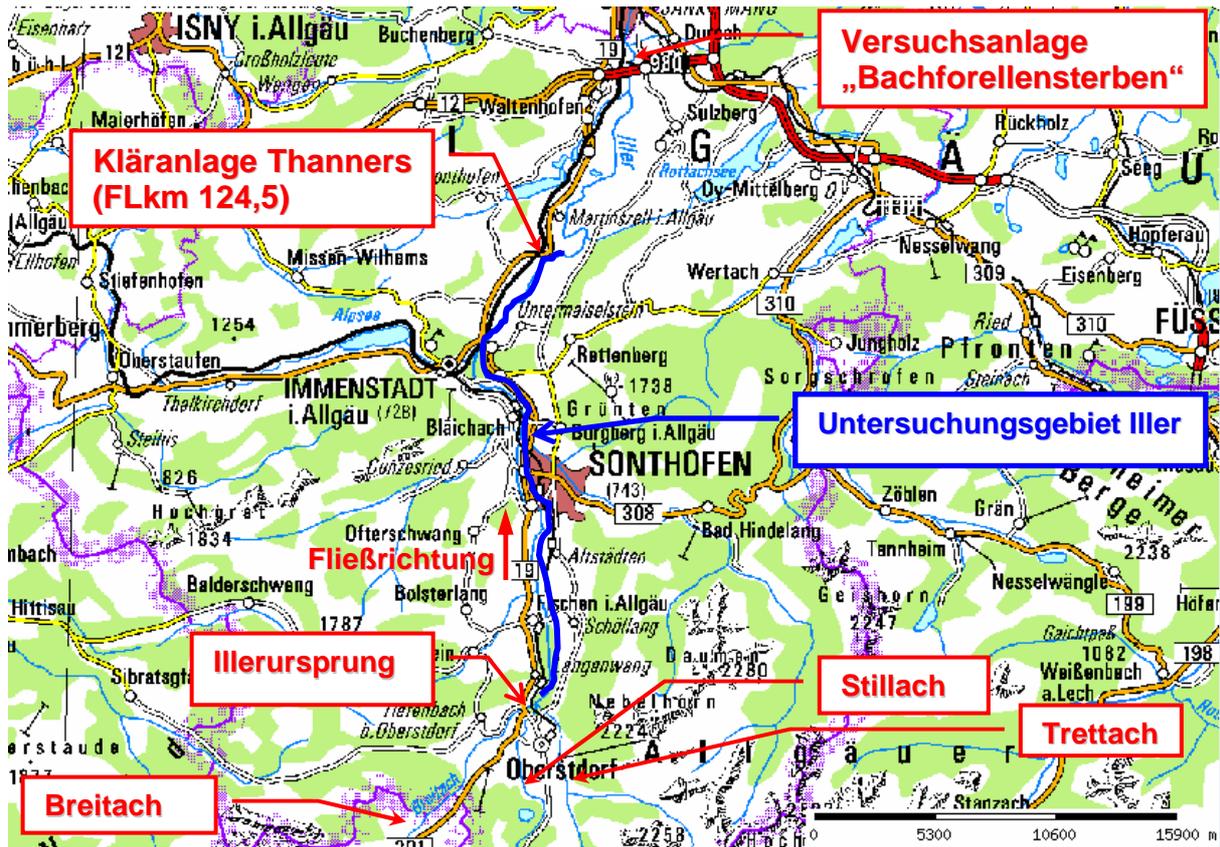
Die Iller ist neben dem Lech, der Isar und dem Inn einer der großen Donauzuflüsse alpinen Ursprungs. Die Iller entspringt aus den Zuflüssen Breitach, Trettach und Stillach im Bereich Oberstdorf und durchfließt den Oberstdorfer Talraum sowie die Iller-Vorberge.

Die Iller ist eines der bestuntersuchtesten Gewässer, in dem das Bachforellensterben auftritt. Für die weitere Eingrenzung der Ursachen des Bachforellensterbens wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit die Iller als Untersuchungsgewässer gewählt.

#### **4.3.1 Oberlauf der Iller**

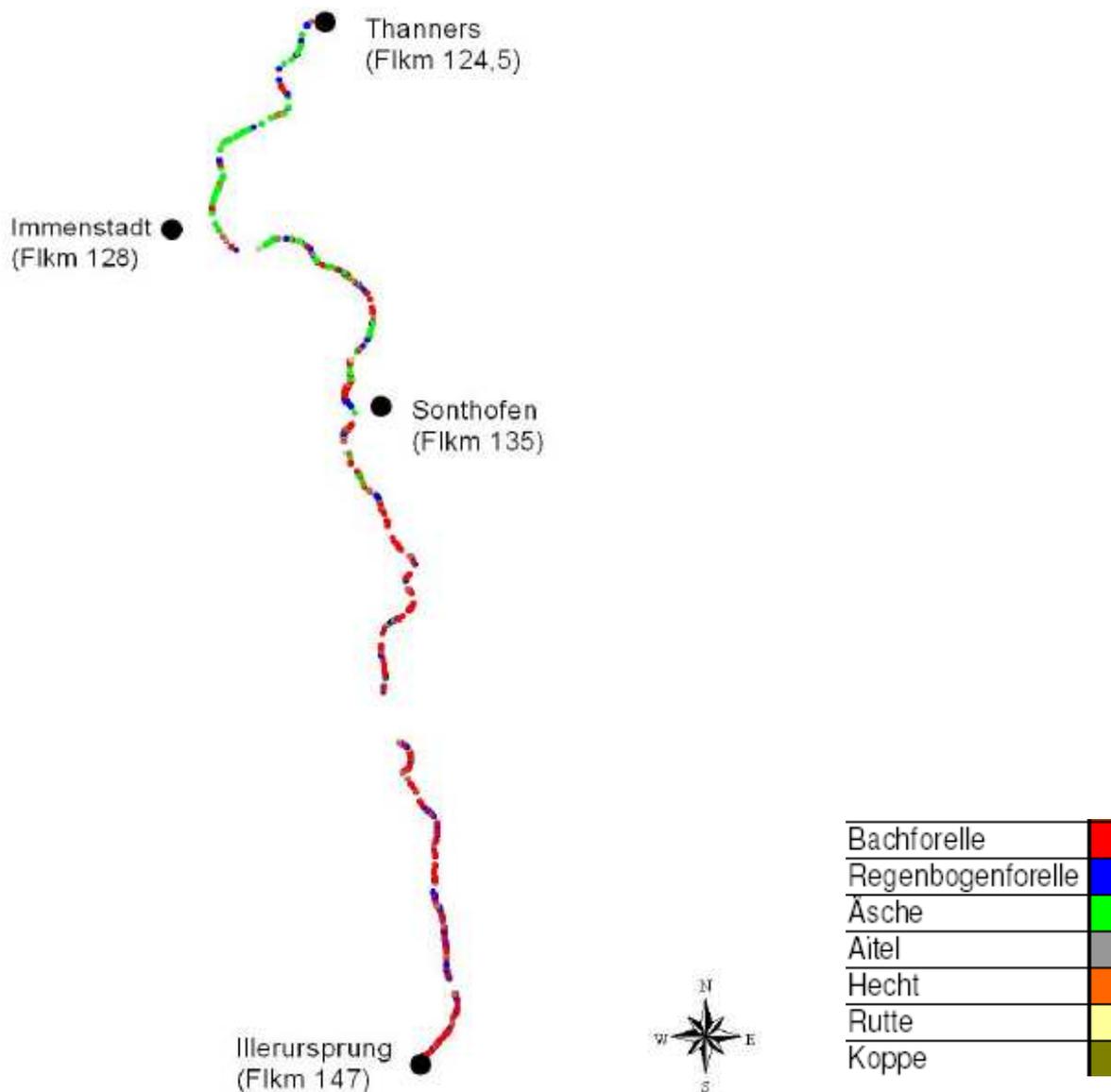
Im Oberlauf der Iller wurde durch Kartierung von Landnutzungstypen nach Quellen potentieller Schadstoffeinträge gesucht. Zusätzlich wurden Elektrobefischungen (habitatbezogene Streifenbefischungen mit zwei Fangpolen, stromabwärts) zur Erhebung der Fischbestände durchgeführt.

Der Untersuchungsraum lag dabei zwischen dem Illerursprung (Flkm 147) und der Kläranlage Thanners (Flkm 124,5). In dieser Gewässerstrecke (siehe Abbildung 31) liegen die Städte Immenstadt (Flkm 128) und Sonthofen (Flkm 135).



**Abbildung 31: Untersuchungsgebiet zur Erhebung der ökologischen Randparameter an der Iller (verändert nach [www.geodaten-bayern.de](http://www.geodaten-bayern.de))**

Die Individuendichte von Bachforellen lag in der ersten Hälfte der Befischungstrecke zwischen drei und sieben Individuen pro 100 m Befischungstrecke. Diese sank in der zweiten Hälfte auf 0,6 bis drei Individuen pro 100 m und im letzten Drittel bis auf null Bachforellenfänge pro 100 m befischter Illerstrecke.



**Abbildung 32: Fischbestandsanalyse der Iller im Untersuchungsgebiet (2005)**

Die Abbildung 32 gibt einen Überblick über die Bestandssituation der Bachforelle in der Iller (Stand September 2005). Die rot markierten Gewässerabschnitte symbolisieren das Fangergebnis von Bachforellen. Diese verlor im Längsverlauf der Iller ihre dominante Rolle im Bestandsaufbau und gab diese unterhalb Sonthofen an die Äsche ab.

Die im Einzugsgebiet der Iller vorkommenden „anthropogenen Einflussfaktoren“, wie zum Beispiel Abwasserreinigungsanlagen, Industrieleitungen, Siedlungsflächen, Industrie- und Gewerbeflächen, Straßen- und Eisenbahnnetze,

---

Landwirtschaftliche Nutzflächen, Forstwirtschaft und weitere Landnutzungstypen, wurden erhoben:

- Im Illeroblauf (flussauf Sonthofen) sind drei **Einleitungen** (2 Autowaschanlagen, 1 Bauhofeinleitung der Stadt Sonthofen) vorhanden. Dieses geht aus Aufzeichnungen des Wasserwirtschaftsamtes Kempten hervor. Im unteren Abschnitt sind fünf Industriebetriebe ansässig, die die Iller für betriebliches Abwasser als Vorfluter nutzen.
- Die Kartierung der **Siedlungsflächen** (durchgängig städtischer Prägung) ergab an der oberen Iller einen direkt an die Iller angrenzenden Flächenanteil von 1,44 %. Im unteren Bereich (flußab Sonthofen) stellt diese Art der Landnutzung einen Anteil von 2,29 % an der gesamten angrenzenden Fläche dar.
- **Industrie- und Gewerbeflächen** finden sich an der Iller mit einem Anteil von 0,01 % und an der unteren Iller mit einem Anteil von 0,24 % wieder.
- Die den **Straßen- und Eisenbahnnetzen** zugeordneten Flächen haben einen sehr geringen Anteil am Umland des Untersuchungsbereiches. An der oberen Iller ist der Anteil so gering, dass er in den Aufzeichnungen des WWA Kempten nicht vorkommt. Unterhalb Sonthofen sind 0,24 % des Illerumlandes mit Straßen- und Eisenbahnnetzen durchzogen.
- Eine Betrachtung des Einzugsgebietes hinsichtlich **landwirtschaftlicher Nutzung** zeigt eine ausschließliche Grünlandbewirtschaftung. Der Anteil von Wiesen und Weiden steigt von 38 % im oberen Illerabschnitt auf 62 % im unteren Illerabschnitt an.
- Der **Waldanteil** an der oberen Iller beträgt 38 % des Umlandes. Davon sind 2/3 Nadelwald. Knapp 1/3 besteht aus Mischwald mit circa 1 % reinem Laubwaldanteil. Im unteren Bereich der Iller liegt der Waldanteil bei 24 %, hiervon sind 5 % Laubwald, 71 % Nadelwald und 24 % Mischwald.

- Die **übrigen Landnutzungsformen** wie Heiden und Moorheiden (nur an der oberen Iller mit 2,75 % Flächenanteil vertreten), Wald-Strauch-Übergangsstadien (Flächenanteil 1,57 % an der oberen Iller; 0,24 % an der unteren Iller) sowie Felsflächen (Flächenanteil an der oberen Iller von 1,28 %) machen nur einen sehr geringen Anteil an der Flächennutzung des Umlandes aus.

Die Erhebung des Fischbestandes und der ökologischen Parameter des Umlandes gaben keinen konkreten Hinweis auf eine lokale Eingrenzbarkeit (longitudinale Zuordnung) des Bachforellensterbens. Es ist kein eindeutiger Zusammenhang mit dem jährlich auftretenden Bachforellensterben erkennbar.

Zu bemerken ist, dass ab Sonthofen (Flkm 131) flussabwärts eine deutliche Steigerung der Industrieleitungen stattfindet und die uferbegleitenden Wälder im Untersuchungsgebiet sukzessive abnehmen. Zusammenfassend kann daher eine höhere anthropogene Beeinflussung der Iller unterhalb Sonthofens festgestellt werden.

#### **4.3.2 Illerzuflüssen: Trettach, Stillach, Breitach**

Wie in der Gesamtübersicht des Einzugsgebietes (siehe Luftbild im Anhang) dargestellt wird, kommen für die Trettach und für die Stillach nur wenige anthropogen bedingte Eintragungsmöglichkeiten für Schadstoffe in Betracht. In der Abwasserentsorgungsanlage Thanners (Flkm 124,5) wird das Abwasser der Oberstdorfer Gegend zentral entsorgt.

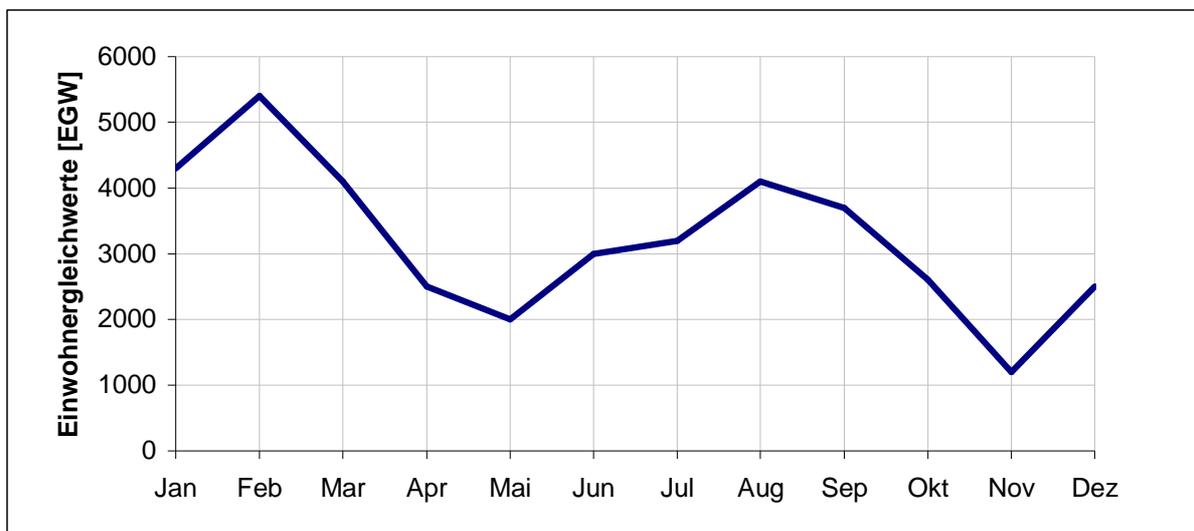
Die Landnutzung ist im Bereich der Zuflüsse geprägt von **Grünland- und extensiver Almwirtschaft. Beschneigungsteiche** bzw. **Entnahmestellen für Beschneigungstätigkeiten** in den Wintermonaten sind in die Illerzuflüsse (z.B. Breitach; siehe Kartenanhang) integriert.

Die Breitach durchläuft das temporär stark besiedelte Kleinwalsertal im angrenzenden Österreich. Die Breitach wird dort von zwei **ARA`s** (Bödmern, Riezlern) als Vorfluter genutzt. Diese ARA`s arbeiten das Abwasser im Kleinwalsertal auf. Ein starker anthropogener Einfluss auf die Breitach ist dadurch

gegeben. Nachfolgend sind die Abwasserdaten des Kleinwalsertales grafisch dargestellt (siehe Abbildung 33 bis Abbildung 36).

#### **4.3.3 Gebiets- und Abwasserdaten des Landes Vorarlberg – Kleinwalsertal (2004)**

In der Abbildung 33 wird der Abwasserzufluss in die ARA Bödmen (geografische Lage siehe Luftbild im Anhang) im Jahr 2004 dargestellt.



**Abbildung 33: Verlauf der Einwohnergleichwerte (EGW) an der ARA Bödmen/ Kleinwalsertal- 2004 (nach Jahresbericht 2004, Amt der Vorarlberger Landesregierung)**

Die Anzahl der Gästenächtigungen, die Einwohnerzahlen und der Anteil an Gewerbetreibenden, Industrie und Tagesgästen (entspricht Einwohnergleichwerte) korreliert mit dem Spitzenaufkommen der Abwasserzuflüsse in der Kläranlage Bödmen. Die Einwohnerzahlen blieben mit circa 1000 Einwohnern über das ganze Jahr 2004 gleich. Die Einwohnergleichwerte zeigten Spitzenwerte Anfang Februar und Anfang August.

Die Abbildung 34 zeigt den Abwasserzufluss in die ARA Riezlern (geografische Lage, siehe Luftbild im Anhang) im Jahr 2004.



**Abbildung 34: Verlauf der Einwohnergleichwerte (EGW) in der Kläranlage Riezlern/ Kleinwalsertal- 2004 (nach Jahresbericht 2004, Amt der Vorarlberger Landesregierung)**

Der Verlauf der Einwohnergleichwerte in der ARA Riezlern stellt sich im Jahr 2004 analog zur ARA Bödmen dar. Spitzenwerte bei Gästenächtigungen, Einwohnerzahlen, Gewerbetreibenden, Industrie und Tagesgästen können Anfang Februar und Anfang August 2004 verzeichnet werden.

#### **4.3.4 Gebiets- und Abwasserdaten des Landes Vorarlberg– Kleinwalsertal (2005)**

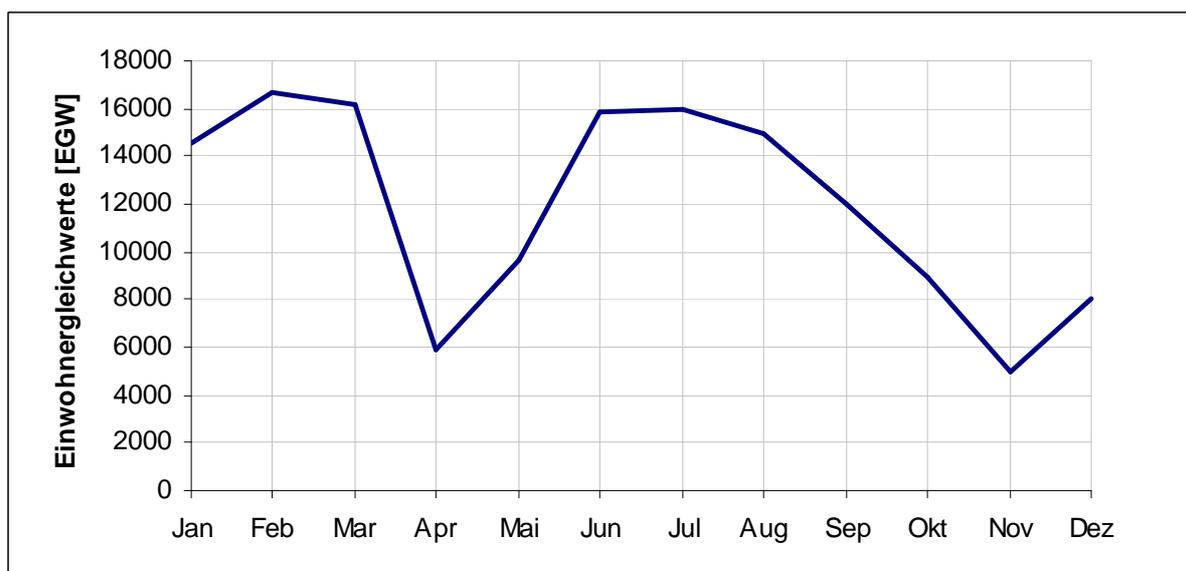
Im Jahresverlauf 2005 zeigt sich im Vergleich zum Jahr 2004 ein sehr ähnliches Bild der Abwasserzuflüsse in die Abwasserreinigungsanlage Bödmen (siehe Abbildung 35). Die Spitzenwerte der Abwasserzuflüsse lagen zwischen Juni und Anfang Oktober 2005.



**Abbildung 35: Verlauf der Einwohnergleichwerte (EGW) an der Kläranlage Bödmen/ Kleinwalsertal- 2005 (nach Jahresbericht 2005, Amt der Vorarlberger Landesregierung)**

Die Einwohnergleichwerte an der ARA Bödmen liegen im Frühjahr um circa 1000 EGW höher als im Jahr 2004.

Die Abbildung 36 zeigt die Einwohnergleichwerte an der ARA Riezlern im Jahr 2005. Beginnend im April diesen Jahres stiegen die Abwasserzuflussraten in die ARA Riezlern an, erreichten in den Monaten Juni und Juli ein Maximum und fielen dann stetig bis November ab.



**Abbildung 36: Verlauf der Einwohnergleichwerte (EGW) in der Kläranlage Riezlern/ Kleinwalsertal- 2005 (nach Jahresbericht 2005, Amt der Vorarlberger Landesregierung)**

In den Monaten Mai bis September kann ein erhöhter Einfluss von Gewerbetreibenden, Industrie und Tagesgästen, auf die Abwassermenge in der Kläranlage Riezlern festgestellt werden. Ansonsten verhalten sich die Einwohnergleichwerte in ihrem Trend wie die der Abwasserreinigungsanlage Bödmen im Jahre 2005.

Diese anthropogenen Einflüsse der Abwassereinleitungen in die Iller weisen einen zeitlichen Trend auf. Ein Zusammenhang mit den Untersuchungen zum Bachforellensterben an der Iller wird im Kapitel Schlussfolgerung diskutiert.

#### **4.3.5 Gewässerdaten WWA Kempten und Land Vorarlberg**

Die von der Vorarlberger Landesregierung, Abteilung Wasserwirtschaft, zur Verfügung gestellten Labordaten über Wasseranalysen des Illerzuflusses Breitach (siehe Tabelle 17) weisen Besonderheiten bei den mikrobiellen Auswertungen auf.

Die Belastung des Breitachwassers mit Fäkalcoliformen Keimen, Fäkalstreptokokken bzw. *Escherichia coli* in den Jahren 2004 und 2005 (im Zeitraum Juli – August) ist partiell sehr hoch. Aus den Untersuchungsergebnissen der Wasserproben aus den Jahren 2004 (siehe Abbildung 25; Erniedrigte Spaltungsaktivität von 09.08. bis 25.09.04) und 2005 (siehe Abbildung 26; Erniedrigte Spaltungsaktivität von 02.08. bis 15.10.05), wurden in der Tabelle 17 diejenigen Proben markiert, welche in diesem Zeitraum gezogen wurden.

Nach der Deutschen Trinkwasser- und Badewasserverordnung (siehe Anhang) liegt zum Beispiel der Grenzwert für Coliforme Keime bei „null Keime pro 100 mL Wasserprobe“. Die nach Flusskilometern geordneten Wasserprobenahmen in den Illerzuflüssen wiesen eine Keimzahl von null bis 1800 koloniebildende Einheiten auf. Diese Beeinträchtigung des Illerzuflusses Breitach durch Fäkalkeime in diesem Zeitraum deutet auf einen anthropogenen Einfluss aus dem Einzugsgebiet der Breitach, auf die Iller hin.

Die chemisch-, physikalischen Gewässeruntersuchungen (z.B. pH-Wert, Sulfat-, Nitratkonzentration, etc.) der Breitach und ihrer Zuflüsse zeigten in den Jahren 2004 und 2005 jedoch keine grenzwertigen Auffälligkeiten (vgl. Richtlinienauszug; siehe Anhang).

**Tabelle 17: Ausgewählte chemische und mikrobielle Gewässerdaten der Breitach (Quelle Umweltinstitut Vorarlberg) aus den Jahren 2005 (oben) und 2004 (unten)**

EINZUGSGEBIET	FLIEßGEWÄSSER	STELLE	FLKM	DATUM	QAKT	TEMP	PH	SO4	NO3_N	GES_P	BSB5	O2_S	TOC	DOC	TC	FC	FS	GKZ	E_COLI
Breitach	Schwarzbach	obh. Breitach	0,10	16.06.04		5,70	8,00	3,00	0,34	5,00	1,40	102			10	0	0	100	0
Breitach	Schwarzbach	obh. Breitach	0,10	11.08.04		8,50	8,30	5,00	0,30	5,00	1,30	111			600	20	40	1800	200
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	07.07.04	3,36	9,40	8,50	6,40	0,44	13,00	0,80	86	0,60	0,60					
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	10.08.04	1,11	10,10	8,50	10,70	0,55	34,00	2,00	91	0,60	0,60					
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	11.08.04	1,01	12,90	8,40	9,00	0,55	11,00	0,80	125			1100	20	90	800	30
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	07.09.04	1,08	8,00	8,50	6,80	0,40	12,00	0,80	89	1,70	1,10					
Breitach	Breitach	Mittelberg	9,55	16.06.04		7,20	8,20	5,00	0,32	5,00	1,20	105			200	30	40	300	10
Breitach	Breitach	Mittelberg	9,55	11.08.04		10,80	8,20	7,00	0,37	5,00	0,50	111			300	0	30	400	20
Breitach	Breitach	Mittelberg	9,55	11.08.05		8,50	8,20	7,00	0,39	5,00	1,70	111	0,54	3000	400	60	300	600	
Breitach	Breitach	Baad	14,50	16.06.04		6,30	8,10	4,00	0,25	5,00	2,60	116			10	0	0	90	0
Breitach	Breitach	Baad	14,50	11.08.04		12,70	8,30	7,00	0,25	5,00	0,10	111			40	0	40	500	0

EINZUGSGEBIET	FLIEßGEWÄSSER	STELLE	FKM	DATUM	QAKT	TEMP	PH	SO4	NO3_N	GES_P	BSB5	O2_S	TOC	DOC	TC	FC	FS	GKZ	E_COLI
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	06.06.05	3,97	6,60	8,50	7,10	0,48	24,00	0,50	82	0,30	0,30					
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	19.07.05	8,55	9,70	8,30	5,70	0,34	8,00	0,00	90	1,40	1,20					
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	10.08.05	2,42	8,10	8,50	11,20	0,75	31,00	0,90	87	1,20	1,00					
Breitach	Breitach	Riezlern	4,40	11.08.05		11,60	8,30	9,00	0,57	10,00	0,10	98		0,71	3000	600	100	600	400
Breitach	Breitach	Mittelberg	9,55	11.08.05		8,50	8,20	7,00	0,39	5,00	1,70	111		0,54	3000	400	60	300	600

### Legende:

FKM	Flusskilometer [km]
Qakt	aktueller Abfluss der Breitach [m³/s]
TEMP	aktuelle Temperatur [°C]
PH	pH-Wert
SO4-	Sulfatkonzentration [mg/L]
NO3-N	Nitratkonzentration [mg/L]
GES_P	Gesamtphosphat [mg/L]
BSB5	Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen [mg O₂/L]
O2_S	Sauerstoffsättigung [%]
TOC	Total Organic Carbon [mg/L]
DOC	Dissolved Organic Carbon [mg/L]
TC	Total Carbon [mg/L]
FC	Keimbelastung (Fäkalcoliforme) [KbE/mL]
FS	Keimbelastung (Fäkalstreptokokken) [KbE/mL]
GKZ	Gesamtkeimzahl [KbE/mL]
E_COLI	Keimzahl E-Coli [KbE/mL]

## **E Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, zur Ursachenfindung des Bachforellensterbens einen Beitrag zu liefern. Da Infektionsversuche bislang negativ verliefen, sollten die Untersuchungen klären, inwieweit hierbei möglicherweise Toxine eine Rolle spielen. Da der Nachweis spezieller Toxine bei der vorliegenden Ausgangssituation wenig Ziel führend erschien, wurden unterschiedliche Zellkulturen als „Toxizitätsindikator“ eingesetzt. Um deren Sensitivität besser einschätzen zu können, wurden diese verschiedenen Giftstoffen ausgesetzt. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Prüfung von Fließgewässerproben, die zur Erhöhung der Sensitivität um den Faktor 10 konzentriert wurden.

### **1 Methodisches Vorgehen**

Der entwickelte Zellkulturtest in dieser Studie basiert im Gegensatz zu bereits beschriebenen Untersuchungen nicht auf permanenten Zelllinien (Mory & Wakabashi, 2000), sondern auf primären Leberzellen der Bachforelle. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass primäre Zellen zumeist noch die vollständige metabolische Aktivität besitzen. Die Verwendung von metabolisch aktiven Testorganismen ist für die Erkennung der Toxizität von Substanzen erforderlich, da bestimmte Verbindungen erst nach Metabolisierung ihr toxisches Potential entfalten (Baksi & Frazier, 1990; Hightower & Renfro, 1988).

Leberzellen der Bachforelle wurden ausgewählt, da Leberschäden auch beim „Bachforellensterben“ beobachtet wurden (Schwaiger & Ferling, 2003).

#### *Gewinnung der BFL-Zellen*

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Haltung, die Fütterung und die Kondition der Fische einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Anzuchtbarkeit und Lebensfähigkeit der Zellen haben. Eine intensive Fütterung der Fische vor der Organentnahme brachte kurzlebige und instabile BFL-Zellen mit sich. Auch Stresssituationen (z.B. überaktive Fangtätigkeiten, Laichen oder zu hohe Besatzdichten) resultierten in einem schlechten Anzuchtergebnis. Vergleichbares beobachteten auch Steinberg et al. (2000). Zusätzlich wurde festgestellt, dass das Serum von mangelhaft gefütterten

Bachforellen zur Bildung von Agglutinaten im Zellmedium bzw. in der Zellkultur führte. Des Weiteren hat sich die Perfusion der Leber mit sterilem PBS bewährt; dies führte zu einer deutlichen Reduktion der Erythrozytenzahl in der Zellsuspension.

#### *Anzuchtmedium*

Zur Anzucht von Fischzellen werden je nach Fischart und Organ verschiedene Medien empfohlen. Während Wood et al. (2002) Leibovitz`s L-15 Medium für permanente Kiemenzellkulturen der Regenbogenforelle verwendet haben, benutzten Grung et al. (2007) dieses Medium für Hepatozytenkulturen dieser Fischart. Mory & Wakabayashi (2000) verwendeten für die Kultivierung von Hautzellen der Regenbogenforelle, des Goldfisches (*Carassius auratus auratus*) und der Fettköpfigen Elritze (*Pimephales promelaspromelas*) Waymouth MB 752/1 bzw. Eagle`s MEM Medium.

Bei den eigenen Untersuchungen hat sich der Einsatz von Earle`s MEM als Basis-Kulturmedium bewährt. Selbst nach fünftägiger Inkubation konnten mikroskopisch keine cytopatischen Effekte festgestellt werden (vgl. D1).

Anstelle des üblicherweise eingesetzten fetalen Kälberserums wurde Bachforellenserum verwendet. Dadurch konnte eine um circa 30% längere Haltbarkeit erreicht werden, was auf artspezifische Wachstumsfaktoren zurückgeführt werden kann (Lindl, 2002).

#### *Kultivierung der BFL-Zellen*

Der MTT-Test mit BFL-Zellen wurde mit Suspensionszellkulturen durchgeführt, da eine Anheftung der BFL-Zellen an die Wandung der Kavitäten der Mikrotiterplatten auch unter Einsatz verschiedenster Anheftungsfaktoren nicht regelmäßig erzielt werden konnte (vgl. Tabelle 16). In den Zellkulturtests von Laville et al. (2004) und Mory & Wakabayashi (2000) wurde eine Adhäsion der verwendeten Zellen erreicht; diese Autoren setzten allerdings keine primären BFL-Zellen ein, sondern permanente Zelllinien bzw. Zellen anderer Fischarten (u.a. *Pimephales promelaspromelas*).

### *Rahmenbedingungen des Zellkulturtests auf der Basis von BFL-Zellen*

Für die Durchführung der MTT-Tests mit BFL-Zellen wurden folgende Bedingungen gewählt: Klimaschrankbedingungen: CO<sub>2</sub>-Konzentration: 3,7 %; relative Luftfeuchte: 85,3 %; Temperatur: 16 °C; Zusätze zum Medium Earle`s MEM: 10 % Bachforellenserumlösung (siehe C.1), 1 % Non essential amino acids, Penicillin (50 µg/mL) / Streptomycin (50 µg/mL), HEPES-Puffer (10 mM) (siehe D.1). Darüber hinaus konnte bei den eigenen Untersuchungen beobachtet werden, dass eine Kultivierungstemperatur von 16°C zu einer verbesserten Haltbarkeit der Zellen führt. Dies stimmt mit den Angaben von Lindl (2002) überein.

### *Vorbereitung der Wasserproben*

Um die Sensitivität des Testsystems zu steigern, wurden die Freilandwasserproben um den Faktor 10 durch Lyophilisation aufkonzentriert. Dass dieses Verfahren hierzu geeignet ist, konnte in Vorversuchen mit Gliotoxin-, Zearalenon- und Microcystin-LR-dotierten Wasserproben gezeigt werden. Während bei den nicht behandelten, Gliotoxin-haltigen Proben die zytotoxische Grenzkonzentration bei ca. 0,45 µg/mL lag, war diese bei den lyophilisierten Proben um den Faktor 10 geringer. Vergleichbares konnte auch für die mit Zearalenon- und Microcystin-LR-dotierten Proben nachgewiesen werden (siehe D1).

Ein ähnliches Vorgehen verfolgten auch Aherne et al. (1990). Sie konzentrierten Flusswasserproben ebenfalls durch Lyophilisation auf das 100-fache auf und konnten dann Bleomycin in Konzentrationen von 0,005 – 0,017 µg/L nachweisen. Dies zeigt, dass die eigene Vorgehensweise zur Erfassung von Gewässertoxizitäten mit Hilfe des etablierten Testsystems durchaus geeignet ist.

## **2 Akute Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen im MTT-Test mit BFL-Zellen**

Wie bereits dargelegt, sollte die Empfindlichkeit der BFL-Zellen gegenüber verschiedenen Substanzen geprüft werden. Ausgewählt wurden hierzu Toxine mikrobiellen Ursprungs (Pilz- und Algentoxine), pharmazeutisch-wirksame

Verbindungen (z.B. 17- $\beta$ -Estradiol) und Bestandteile von häufig eingesetzten Pflanzenbehandlungsmitteln (Glyphosat).

Auf den ersten Blick mag die Einbeziehung von Pilztoxinen etwas irritieren. Es ist jedoch zu bedenken, dass Oberflächengewässer nicht selten mit Pilzen kontaminiert sind, und die Pilzkeimgehalte denen von coliformen Bakterien vergleichbar sind (Arvanitidou et al., 2005; Kiziewicz et al., 2004). Die Ursache hierfür dürften pilzinfizierte Pflanzen und Pflanzenreste sowie Sedimenteinträge aus Uferbereichen sein. Als dominante Gattungen wurden *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* identifiziert (Arvanitidou et al., 2005). Interessanterweise wurden mittlerweile nicht nur Pilze sondern auch eine Reihe von Pilztoxinen in Oberflächengewässern oder Wasser nachgewiesen. Dazu gehören u.a. Aflatoxin B<sub>1</sub>, Zearalenon,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol, Desoxynivalenol und Fumonisin B<sub>1</sub> (Hoerger et al., 2009). So wurde in der Schweiz Desoxynivalenol und Zearalenon in Konzentrationen bis zu 4,9  $\mu\text{g/L}$  bzw. 0,035  $\mu\text{g/L}$  nachgewiesen (Bucheli et al., 2008). Diese Verbindungen können entweder direkt durch im Wasser befindliche Pilze gebildet werden oder über Silosickerwässer oder Ablaufwasser aus Teichwirtschaften, in denen mykotoxinhaltige Futtermittel eingesetzt wurden, in das Fließgewässer gelangen (Bucheli et al., 2008). Um die Sensitivität von BFL-Zellen besser einschätzen zu können, wird deren Sensitivität gegenüber ausgewählten Stoffen im Vergleich zu anderen Zellarten dargestellt. Für Ergotamin und Sterigmatocystin konnten keine vergleichbaren Literaturdaten gefunden werden, aus diesem Grund werden sie in der Diskussion nicht weiter berücksichtigt.

## **Mykotoxine**

### *Fumonisin B<sub>1</sub>*

Fumonisin B<sub>1</sub> bewirkte im MTT-Test mit BFL-Zellen ab der Konzentration von 0,06  $\mu\text{g/mL}$  eine signifikante Abnahme der „Zellvitalität“. Allerdings war selbst bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{g/mL}$  nur noch eine weitere Reduktion um circa 20% zu beobachten. Eine klare Dosis-Wirkungskorrelation war nicht deutlich zu erkennen. Dennoch scheinen BFL-Zellen relativ empfindlich gegen Fumonisin B<sub>1</sub> zu sein. So konnten Keck & Bodine (2006) keine signifikante Beeinflussung der MTT-Spaltung durch aviäre Lymphozyten und Thymuszellen bei einer

Fumonisin B<sub>1</sub>-Konzentration von 50 µg/mL beobachten. Mwanza et al. (2009) wies eine ähnlich schwache Reduktion der Vitalität (19 %ig) von humanen Lymphozyten bei einer Konzentration von 20 µg/mL nach.

### *Trichothecene*

Die Versuche mit T2-Toxin und Desoxynivalenol zeigten, dass erst eine Konzentration von 75 µg/mL zu einer signifikanten Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität der BFL-Zellen geführt hat. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Ergebnissen von Versuchen, die mit anderen Zellarten durchgeführt worden sind. Nach Rotter et al. (1993) sind permanente BHK-Zellen besonders sensitiv gegenüber T2-Toxin. Nach deren Angaben liegt der EC<sub>50</sub>-Wert bei 1,6 ng/mL. SK-Zellen erwiesen sich ebenfalls sensitiver gegenüber T2-Toxin als BFL-Zellen; als zytotoxischer Grenzwert wird 0,4 µg/mL angegeben (Hanelt et al., 1994). Auch gegenüber Desoxynivalenol scheint diese Zellart sehr empfindlich zu sein (zytotoxische Grenzkonzentration: 0,4 µg/mL; Hanelt et al., 1994). Worauf diese zelltypbedingten Unterschiede zurückzuführen sind, ist weitestgehend unklar. Diskutiert werden Unterschiede im Aufbau der Zellmembran, in der Rezeptorausstattung und in der metabolischen Leistungsfähigkeit (Abbas et al. (1994); Thompson et al. (1984)).

### *Zearalenon, α- und β-Zearalenol*

Die Prüfung von Zearalenon ergab, dass bereits ab einer Konzentration von 1,17 µg/mL eine signifikante Hemmung der relativen Spaltungsaktivität von BFL-Zellen beobachtet werden konnte; für α- und β-Zearalenol war dies erst ab 37,5 µg/mL der Fall. Hep2-Zellen reagierten ähnlich sensitiv gegenüber Zearalenon, während die MTT-Spaltung von Verozellen im gewählten Konzentrationsbereich ( $\leq 10$  µg/mL) nicht beeinträchtigt wurde. Dies zeigt erneut, dass verschiedene Zellen unterschiedliche Sensitivität gegenüber ein- und denselben Stoff aufweisen. Vergleichbares kann man auch bei der Gegenüberstellung von Literaturdaten feststellen. Während bei Caco-2-Zellen bereits bei der Konzentration von  $\sim 3$  µg/mL die MTT-Spaltungsaktivität gehemmt wird (Kouadio et al., 2005) und somit ähnlich sensitiv wie primäre BFL-Zellen reagieren, erwiesen sich die SK-Zellen als weniger empfindlich (EC<sub>50</sub> > 50 µg/mL; Hanelt et al., 1994).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Zellarten gegenüber Zearalenon bzw. Zearalenonderivaten dürfte auf die oben diskutierten Ursachen zurückzuführen sein. Überrascht hat allerdings die Beobachtung, dass die MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen mit zunehmender Zearalenonkonzentration anstieg. Da dieses Resultat in unabhängig stattgefundenen Versuchen erzielt wurde, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um ein „Artefakt“ handelt. Dennoch ist festzuhalten, dass dies im Gegensatz zu den Untersuchungen von Abid-Essefi et al. (2004) steht, die eine Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen durch Zearalenon beschreiben. Die Ursache für die Diskrepanz ist unklar.

### *Gliotoxin*

Auch bei der Prüfung von Gliotoxin konnten zellartspezifische Unterschiede bezüglich der Sensitivität festgestellt werden. Bei den eigenen Untersuchungen mit BFL-Zellen wurde als  $EC_{50}$ -Wert 53  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bestimmt, während der entsprechende Wert für Hep2-Zellen bei 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lag. Die vergleichsweise Unempfindlichkeit von BFL-Zellen gegenüber Gliotoxin wird noch deutlicher wenn man die Werte mit Literaturdaten vergleicht. Dayeh et al. (2005) gibt als  $EC_{50}$ -Wert für Gliotoxin bei RT-gill-W1-Zellen 0,09 – 0,13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  an. Auch hier dürften die bereits oben diskutierten Ursachen für die Differenzen verantwortlich sein (Segner, 1998).

### *Kojisäure*

Kojisäure reduzierte bei den eigenen Untersuchungen mit BFL-Zellen ab der Konzentration von 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  die relative Spaltungsaktivität der BFL-Zellen signifikant; der  $EC_{50}$ -Wert lag bei 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Demgegenüber konnte Hanelt et al. (1994) im MTT-Test mit permanenten Schweinenierenzellen selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  keine signifikante Abweichung von der Zellkontrolle feststellen. Ähnlich unempfindlich reagieren auch HL-60 Zellen; der  $EC_{50}$ -Wert lag bei den Untersuchungen von Ueno et al. (1995) bei >200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### *Aflatoxin B<sub>1</sub>*

Im MTT-Test mit BFL-Zellen verursachte Aflatoxin B<sub>1</sub> bereits ab einer Konzentration von 0,15 µg/mL eine signifikante Reduktion der MTT-Spaltung, allerdings führten selbst 150 µg/mL nur zu einer Abnahme um 30%.

Demgegenüber scheinen Hep2-Zellen weniger sensitiv zu sein. Erst eine Konzentration von 10 µg/mL reduzierte die MTT-Spaltung um ca. 10%. Im Gegensatz dazu beobachteten Chan et al. (2003) bereits bei 0,0016 µg/mL eine Schädigung von Hep2-Zellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Inkubationsdauer der Zellen mit Aflatoxin B<sub>1</sub> um 48h länger war als bei den eigenen Versuchen.

Im Vergleich zu BFL-Zellen und Hep2-Zellen erwiesen sich Verozellen am empfindlichsten (EC<sub>50</sub>-Wert = 5 µg/mL).

### *Ochratoxin A*

Ochratoxin A reduzierte ab der Konzentration von 4,8 µg/mL die relative Spaltungsaktivität der BFL-Zellen signifikant; der EC<sub>50</sub>-Wert lag bei 48,55 µg/mL. Dieser Wert ist im Vergleich zu Untersuchungen mit HK-2-Zellen (Arbillaga et al., 2007) als niedrig anzusehen (EC<sub>50</sub>-Wert: 320 µg/mL).

### *Roquefortin*

Im MTT-Test mit BFL-Zellen führte Roquefortin ab einer Konzentration von 75 µg/mL zu einer signifikanten Reduktion der Spaltungsaktivität, allerdings betrug diese bei 150 µg/mL nur ca. 10-15%. Demgegenüber erwiesen sich MDBK – Zellen in vergleichbaren Untersuchungen als deutlich empfindlicher (EC<sub>50</sub> = 50 µg/mL; Armbruster, 1994).

### *Monacolin K<sub>S</sub>*

Monacolin K<sub>S</sub> wird von Harada et al. (2006) als ausgeprägter Hemmer der 3-Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase in humanen Leberzellen beschrieben. Die zytotoxische Grenzkonzentration lag bei der Prüfung mit BFL-Zellen bei circa 9 µg/mL, der EC<sub>50</sub>-Wert bei 45,94 µg/mL. Während V79-Zellen etwas empfindlicher zu sein scheinen (zytotoxische Grenzkonzentration: 0,78 µg/mL; Schneeweis (2000)), dürften CaCo-Zellen eine ähnliche Sensitivität aufweisen (EC<sub>50</sub> = 20,23 µg/mL; Lin et al. (2007)).

## **Algentoxin**

### *Microcystin LR*

Bei den eigenen Untersuchungen war bereits bei einer Microcystin-LR-Konzentration von 0,3 µg/mL eine Schädigung von BFL-Zellen zu beobachten. Dem gegenüber konnten Malbrouck et al. (2004) in kultivierten Hepatozyten juveniler Goldfische schon bei einer Konzentration von 0,01 µg/mL eine reduzierte Proteinphosphataseaktivität nachweisen. Frangez et al. (2003) beobachteten veränderte Aktin- und Mikrotubulstrukturen bereits bei 0,0082 µg/mL in primären, embryonalen Zellkulturen von Hasen.

Auffallend ist bei den eigenen Untersuchungen, dass Microcystin LR keine messbare Wirkung auf Hep2- bzw. Verozellen im gewählten Konzentrationsbereich (0 – 10 µg/mL) hat. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Henning et al. (1992) insofern überein, als dass auch diese Autoren keine Schäden an verschiedenen permanenten Zellen von Warmblütern (KB, NIH/3T3, H-4-II-E, HeLa, Vero, Hep-G2, Caco-2 and HL-60) feststellen konnten.

Die Ursache für die hohe Empfindlichkeit von primären Leberzellen einerseits und der relativen Unempfindlichkeit verschiedener permanenter Zellarten (u.a. Leberzellen) andererseits, dürfte in der unterschiedlichen Fähigkeit liegen, Microcystin LR intrazellulär aufzunehmen. Nach Errikson et al. (1990) soll diese Verbindung über Gallensäuretransporter in die Zelle gelangen, die anscheinend permanenten Zellarten fehlen.

## **Weitere umweltrelevante Verbindungen**

### *17-β-Estradiol*

17-β-Estradiol kann über Kläranlagen in Oberflächengewässer gelangen und dort zur Schädigung von Fischen führen (Kunst et al., 2004).

Bei den eigenen Untersuchungen mit BFL-Zellen führt eine Konzentration von 0,6 µg/mL zu einem signifikanten Abfall der relativen Spaltungsaktivität von BFL-Zellen auf unter 60 %. Bei circa 10 µg/mL kommt es zu einem weiteren Absinken der „Zellvitalität“. Auch Gagne et al. (2006) beschreiben negative Wirkungen (Abnahme der Zellvitalität, erhöhte CYP3A-Monooxygenaseaktivität, Lipidperoxidation) auf primäre Hepatozyten von Regenbogenforellen in einem

vergleichbaren Konzentrationsbereich ( $c=2,73 \mu\text{g/mL}$ ). Überraschenderweise kam es bei den eigenen Untersuchungen bei höheren Konzentrationen ( $\sim 10 - 150 \mu\text{g/mL}$ ) zu einer Umkehr der Reaktion, was mit einer Erhöhung der Spaltungsaktivität einherging. Dieses Resultat wurde in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen reproduziert. Die Ursache dafür konnte nicht geklärt werden.

### *Glyphosat*

Bei den eigenen Untersuchungen im MTT-Test verursachte Glyphosat bei der Konzentration von circa  $0,3 \mu\text{g/mL}$  bereits einen hoch signifikanten Abfall der relativen Spaltungsaktivität um 40 %; der  $EC_{50}$ -Wert liegt bei  $45,94 \mu\text{g/mL}$ . Studien zur Wirkungsweise von Glyphosat im aquatischen Bereich belegen, dass der Wirkstoff in Oberflächengewässern in einer Konzentration bis zu  $40 \mu\text{g/mL}$  vorkommen kann und besonders in Kombination mit zugesetzten Bindemitteln eine deutlich gesteigerte Toxizität auf aquatische Lebewesen hat (Lange et al. (2000), Landrieux et al. (1999), Folmar et al., 1979). Lushchak et al. (2009) wies auf eine inhibierende Wirkung durch Glyphosat ( $c= 2,5 - 20 \mu\text{g/mL}$ ) auf die Superoxid-Dismutase in Goldfischgewebe hin. Eine Beeinträchtigung dieser Funktion könnte die Ursache für die toxische Wirkung von Glyphosat auf BFL-Zellen sein.

Die folgende Tabelle 18 fasst anhand zytotoxischer Grenzkonzentrationen und  $EC_{50}$  - Werten die Empfindlichkeit von BFL-Zellen nochmals zusammen.

**Tabelle 18: Empfindlichkeit von BFL-Zellen gegenüber verschiedenen Toxinen**

<i>Toxingruppe</i>	<i>Toxine</i>	<i>Zytotoxische Grenzkonzentration*~ [µg/mL]</i>	<i>EC<sub>50</sub> [µg/mL]</i>
Fusariumtoxine	Desoxynivalenol	75,0	-
	Zearalenon	0,30	90,5
	α-Zearalenol	75,0	-
	β-Zearalenol	4,7	-
	Fumonisin B <sub>1</sub>	<0,1	-
	T-2-Toxin	75,0	-
Aspergillus- toxine	Gliotoxin	2,34	53,4
	Kojisäure	4,7	128,8
	Sterigmatocystin	>150,0	-
	Aflatoxin B <sub>1</sub>	0,30	-
Penicillium -toxine	Ochratoxin A	1,17	48,6
	Roquefortin	75,0	-
Myko- toxine	Ergotamin	75,0	-
	Monacolin K <sub>S</sub>	9,4	45,9
Algen- toxin	Microcystin LR	0,30	3,7
Umwelt- relevante Stoffe	17-β-Estradiol	0,30	-
	Glyphosat	0,30	45,9

Betrachtet man die zytotoxischen Grenzkonzentrationen der einzelnen Verbindungen, so scheinen BFL-Zellen sowohl gegenüber einigen Mykotoxinen (Gliotoxin, Fumonisin B<sub>1</sub>, Kojisäure, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A, Zearalenon), als auch gegen weiteren Verbindungen, wie 17-β-Estradiol, Glyphosat und Microcystin LR empfindlich zu sein. Da letztere anthropogen wie auch auf natürliche Weise in Gewässer eingetragen werden können, erschien die Prüfung der Wasserproben mit BFL-Zellen zielführend zu sein. Allerdings zeigten die Untersuchungen auch, dass BFL-Zellen nicht immer gegenüber bestimmten Toxinen empfindlicher waren als die parallel getesteten Vero- und Hep2-Zellen

(z.B. bei Gliotoxin). Aus diesem Grund wurden die Feldproben mit zwei weiteren Zellkultursystemen (Vero- und Hep2-Zellen) untersucht. Diese Vorgehensweise entspricht auch den Empfehlungen von Bopp & Lettieri (2008); sie regen an, dass zur Beurteilung von Gewässertoxizität mehrere Zellkulturarten eingesetzt werden sollen.

### **3 Feldproben**

Die Untersuchung der Wasserproben von 2004 und 2005 im MTT-Test mit BFL-Zellen lassen auf eine Erhöhung der Toxizität ab Ende Juli bzw. Anfang August schließen. Während die Toxizität der Illerproben zu Beginn der Untersuchungen des Jahres 2004 im Bereich der Referenzproben aus dem Quellgebiet von Stillach und Trettach lag, war ab dem 09. August eine Erniedrigung der Zellvitalität (circa 20%) festzustellen. Vergleichbares konnte auch im Jahr 2005 beobachtet werden; ab Ende Juli bis zum Ende der Untersuchungsperiode (Mitte Oktober) wurde eine Reduktion der relativen Spaltungsaktivität der BFL-Zellen um circa 60 % gemessen. In diesen Zeiträumen fand auch ein vermehrtes Sterben von Bachforellen statt. Dieses begann im Jahr 2004 um den zehnten September und im Jahr 2005 um den achten September mit dem ersten Auffinden von erkrankten oder toten Bachforellen.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass Wasserproben der Breitach, die zu Beginn des Kleinwalsertales (Schellenoy) stromab der Abwasserreinigungsanlagen Bödmen und Riezlern gezogen wurden, zu einer um circa 50 % niedrigeren Spaltungsaktivität von BFL-Zellen führten, als Referenzproben aus Stillach und Trettach. Es bleibt zu überprüfen, inwieweit sich diese im Jahr 2005 generierten Ergebnisse reproduzieren lassen und möglicherweise die Leistungsfähigkeit der Abwasserreinigungsanlagen überschritten worden ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Feldproben mit Vero- und Hep2-Zellen waren insofern überraschend, als sowohl 2004 als auch 2005 keine Toxizität mit diesen Zellen in den Wasserproben festgestellt werden konnte. Dies weist darauf hin, dass primäre BFL-Zellen offensichtlich sensitiver gegenüber nicht näher bestimmten Wasserinhaltsstoffen reagieren, als die permanenten Vero- bzw.

---

Hep2-Zellen. Die Ursachen hierfür könnten in den bereits oben diskutierten unterschiedlichen metabolischen Leistungsfähigkeiten, Rezeptoren oder Stoffaufnahmesystemen liegen (Segner (1998); Hanelt et al. (1994); Abbas et al. (1994); Thompson et al. (1984)).

Um festzustellen wo möglicherweise Ursachen für den Eintrag von unerwünschten Stoffen vorhanden sein könnten, wurden ergänzende Kartierungen des Illereinzugsgebietes durchgeführt.

Neben kleineren Emmisionsquellen (u.a. Großparkplätze, Landnutzung) war auffällig, dass 2004 und 2005 ein vermehrter Abwasserzufluss zu den Abwasserreinigungsanlagen Bödmern und Riezlern im Kleinwalsertal in den Monaten Juli bzw. August auftrat. Darüber hinaus waren in den gleichen Zeiträumen erhöhte Keimgehalte in Wasserproben des Vorfluters Breitach gemessen worden. Auffallend ist dabei der Zusammenhang zu den Ergebnissen der Zytotoxizitätsprüfung der Feldproben mit BFL-Zellen, bei der eine erniedrigte Spaltungsaktivität in dieser Zeit nachgewiesen wurde.

Zweifelsfrei lassen die eigenen Untersuchungen erkennen, dass in den Wasserproben der Iller von August bis Oktober 2004 und 2005 Substanzen vorhanden waren, die toxisch auf BFL-Zellen wirkten. Daraus die Schlussfolgerung zu ziehen, dass diese allein für das Bachforellensterben verantwortlich seien, wäre vorschnell. Allerdings können diese Resultate als weitere Anhaltspunkte für die Stützung der „Toxizitätshypothese“ gewertet werden.

## F Zusammenfassung

Die Ursache des Bachforellensterbens ist bis dato noch ungeklärt. Da vorangegangene Untersuchungen keine Übertragbarkeit dieser „Krankheit“ zeigten, wird vermehrt über toxische Ursachen diskutiert. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, eine Methode zur Erfassung von Toxizität in Oberflächengewässern zu etablieren.

Hierzu wurde ein MTT-Test auf der Basis von Bachforellenleberzellen (BFL-Zellen) eingesetzt, dessen Sensitivität mit 17 Substanzen überprüft wurde. Parallel dazu wurden ausgewählte Substanzen auch mit Vero- und Hep2-Zellen getestet. Um festzustellen ob das Wasser der Iller im Jahresverlauf „Toxizität“ aufweist, wurden in den Jahren 2004 und 2005 insgesamt 294 Proben gezogen. Zur Erhöhung der Sensitivität des Testsystems wurden diese durch Lyophilisation auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens reduziert. Parallel dazu wurde eine Kartierung des Illereinzugsgebietes durchgeführt.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- BFL-Zellen erwiesen sich als relativ sensitiv gegenüber Fumonisin B<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Microcystin LR, Zearalenon,  $\beta$ -Zearalenol, 17- $\beta$ -estradiol, Glyphosat, Monacolin K<sub>S</sub>, Ochratoxin A, Kojisäure und Gliotoxin. Weniger empfindlich waren sie gegen Desoxynivalenol,  $\alpha$ -Zearalenol, T2-Toxin, Roquefortin, Ergotamin und Sterigmatocystin.
- In den Jahren 2004 und 2005 trat ab dem 09.08. bzw. 02.08. bei der Untersuchung der Illerwasserproben eine Erniedrigung der relativen Spaltungsaktivität im MTT-Test mit primären BFL-Zellen auf. Permanente Vero- bzw. Hep2-Zellen zeigten im MTT-Test dagegen keine Reaktion.

Neben kleineren Emmisionsquellen (u.a. Großparkplätze, Landnutzung) war auffällig, dass 2004 und 2005 ein vermehrter Abwasserzufluss zu den Abwasserreinigungsanlagen Bödmen und Riezlern im Kleinwalsertal in den Monaten Juli bzw. August auftrat. Darüber hinaus waren in den gleichen Zeiträumen erhöhte Keimgehalte in Wasserproben des Vorfluters Breitach gegenüber dem restlichen Jahresverlauf gemessen worden. Auffallend ist dabei

der Zusammenhang zu den Ergebnissen der Zytotoxizitätsprüfung der Feldproben mit BFL-Zellen, bei der eine erniedrigte Spaltungsaktivität in dieser Zeit nachgewiesen wurde.

Die erzielten Ergebnisse können als Unterstützung für die „Toxinhypothese“ als Ursache des „Bachforellensterbens“ gewertet werden; für deren Spezifikation sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

## G Summary

The cause of the brown trout disease is still unknown to date. As preceding investigations showed no transmission of this "disease", toxic causes are in discussion. The aim of this study was to develop a method for detection of toxicity in surface waters. Therefore a MTT-test with brown trout liver cells was established and its effectiveness was proved with 17 substances.

In addition, selected substances were tested as well with permanent Vero- and Hep2-cells. To investigate a potential toxicity of water samples of the Iller, 294 samples were taken in the years 2004 and 2005. These samples were lyophilised (10:1) to improve the sensitivity of the test system. At the same time a field mapping of the catchment area of the Iller took place.

The following results were achieved:

- BFL cells turned out relatively sensitive towards fumonisin B<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>, microcystin LR, zearalenone, β-zearalenol, 17-β-estradiol, glyphosate, monacolin K<sub>S</sub>, ochratoxin A, kojic acid and gliotoxin; they were less sensitive against desoxynivalenol, α-zearalenol, T2-toxin, roquefortine, ergotamine and sterigmatocystin.
- The Iller water samples (starting from 09.08.2004 respectively 02.08.2005) caused in both years a reduction of the relative "cell vitality" of primary BFL cells in the MTT-test system. On the contrary, permanent Vero- or Hep2 cells showed no reaction.

Beside smaller sources of emission (e.g. great parking sites, land use) it was remarkable that in July/August 2004 and 2005 an increased influx appeared to the sewage treatment plants Bödmen and Riezlern in Kleinwalsertal. In the same periods, raised germ contents had been measured in water samples of the prefloder Breitach compared to the remaining course of the years. Remarkable is the correlation to the cytotoxicity test results of Iller water samples on BFL cells; a reduced "cell vitality" was proved in this time.

The achieved results support the hypothesis that toxicity causes the "brown trout disease". For specification other investigations are required.

---

## H Literaturverzeichnis

ABBAS, T.K., SHIER, W.T., MIROCHA, C.J. (1984): Sensitivity of cultured human and mouse fibroblasts to trichothecenes. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 67, 607-10.

ABDEL-WAHHAP, M.A., HASAN, A.M., ALY, S.E., MAHROUS, K.F. (2005): Absorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Mutation Research*. 582, 20-27.

ABDEL-WAHHAP, M.A., EL-GHAWALBY, N., MOSTAFA, M., SULTAN, A., EL-SADANY, M., FATHY, O., SALAH, T., EZZAT, F. (2007): Epidemiology of hepatocellular carcinoma in lower Egypt, Mansoura Gastroenterology Center. *Hepatogastroenterology*. 54, 157 – 62.

ABID-ESSEFI, S., OUANES, Z., HASSEN, W., BAUDRIMONT, I., CREPPY, E., BACHA, H. (2004): Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology In Vitro*. 18, 467-74.

AHERNE, G.W., HARDCASTLE, A., NIELD, A.H. (1990): Cytotoxic drugs and the aquatic environment: Estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmacology*. 42, 741-2.

ARBILLAGA, L., AZQUETA, A., EZPELETA, O., LOPEZ DE CERAIN, A. (2007): Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: Evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis*. 22, 35–42.

ARMBRUSTER, G. (1994): Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen des Mykotoxins Roquefortin. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

---

ARVANITIDOU, M., KANELLOU, K., VAGIONA, D.G. (2005) : Diversity of Salmonella spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. Environmental Research. 99, 278 - 284.

BAATH, (2003): Untersuchungen zum Gesundheitsstatus von Bachforellen. Schriftenreihe des Landesfischereivereins Bayern e.V., Heft 9. ISBN-3-8289-1690-2.

BAER, K.N., ZIEGENFUSS, M.C., BANKS, D., LING, Z. (1999): Suitability of high-hardness combo medium for ecotoxicity testing using algae, daphnids, and fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 63, 289-296.

BAKSI, S.M., FRAZIER, J.M. (1990): Review: Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research. Aquatic Toxicology. 16, 229-256.

BALTRIUKIENE, D., KALVELYTE, A., BUKELSKIENE, V. (2007): Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in desoxynivalenol – treated cell lines. Alternatives to Laboratory Animals. 35, 53-59.

BARILE, F.A. (1994): Introduction to *in vitro* cytotoxicology: Mechanisms and methods. CRC Press, Boca Raton, Florida, 213.

BARTHOLOMEW, G.A. (1964): The roles of physiology and behaviour in the maintenance of homeostasis in the desert environment. In: Symposia of the Society for Experimental Biology (Hrsg.), Homeostasis and feedback mechanisms, Academic Press, New York. 18, 7-29.

BELDEN, J.B., GILLIOM, R.J., MARTIN, J.D., LYDY, M.J. (2007): Relative toxicity and occurrence of pesticide mixtures in streams draining agricultural watersheds dominated by corn and soybean production. Integrated Environmental Assessment and Management. 3, 90–100.

BERNET, D. (2002): Biomonitoring in Fließgewässern des Kantons Bern - Synthesebericht. Fischnetz-Publikation. Universität Bern, Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Bern, (Kontaktprojekt 99/16), S. 51.

---

BERNDT D.G., CAUDWELL, F.B., COHEN, P., SILVA, E.F.D., SILVA, O.B.D., COHEN, P.T.W. (1987): Isolation and sequence-analysis of a cDNA clone encoding a type-1 protein phosphatase catalytic subunit – homology with protein phosphatase-2a. FEBS Letters 223, 340-346.

BISSON, M., HONTELA, A. (2002): Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozep in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposes *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology. 180, 110-117.

BONE, Q., MARSHALL, N.B. (1995): Biologie der Fische, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. ISBN-10: 3437203339.

BOPP, S.K., LETTIERI, T. (2008): Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacology, 8:8.

BORENFREUND, E. , PUERNER, J.A. (1987): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). Methods in Cell Science. 9 , 7-9.

BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. (1985): Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red uptake. Toxicology Letters. 24, 119-124.

BORN, O. (2003): Zwei Jahre Expositionsversuch an der Iller. In: Bayerns Fischerei und Gewässer, Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes e.V., Heft 9, 15-24.

BOSSUYT, B.T.A., JANSSEN, C.R. (2003): Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 136, 253-264.

BRANDAO, J.C., BOHETS, H.H.L., VAN DE VYVER, I.E., DIERICKX, P.J. (1992): Correlation between the in vitro cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. *Chemosphere*. 25, 553-562.

BRAUNBECK, T. (1989): Cytopathologische Veränderungen in der Fischleber durch Umweltchemikalien – Beiträge zur Ökotoxikologie. Dissertation an der Universität Heidelberg.

BRAUNBECK, T. (1994a): Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen zum Nachweis lethaler und sublethaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. *PAÖ* 8, 533-558.

BRINGMANN, G., KÜHN, R. (1980): Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water research*. 14, 231-241.

BUCHELI, T.D., WETTSTEIN, F.E., HARTMANN, N., ERBST, M., VOGELSANG, S., FORRER, H.-R., SCHWARZENBACH, R.P. (2008): Fusarium Mykotoxins: Overlooked Aquatic Micropollutants? *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 56, 1029 – 1034.

BUNDESAMT FÜR WASSERWIRTSCHAFT, INSTITUT FÜR GEWÄSSERÖKOLOGIE, FISCHEREIBIOLOGIE UND SEENKUNDE (2007): Proliferative Darkening Syndrom – Untersuchungen der Auslöser des Krankheitsbildes „Schwarze Bachforelle“. <http://www.baw-igf.at/cms/content/view/138/221/lang,de/>

BURCKHARDT, B. C., WOLFF, N.A., BURCKHARDT, G. (2000): Electrophysiologic characterization of an organic anion transporter cloned from winter flounder kidney (fROAT). *Journal of the American Society of Nephrology*. 11, 9-17.

BURKHARDT-HOLM, P., GIGER, W., GUTTINGER, H., OCHSENBEIN, U., ARMIN, P., SCHEURER, K., SEGNER, H., STAUB E., SUTER, M. J. (2005): Where have all the fish gone? The reason why fish catches in Swiss rivers are declining. *Environmental Science Technologie*. 39, 441A-447A.

- BURHENNE, M. (2000): Biotestsystem mit Bodenalggen zur ökotoxikologischen Bewertung von Schwermetallen und Pflanzenschutzmitteln am Beispiel von Cadmium und Isoproturon. Dissertation an der Humboldt-Universität zu Berlin.
- BURTON, G. A. (1991): Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry*. 10, 1585-1627.
- CAPONE, D.G., REESE, D., KIENE, R.P. (1983): Effects of metals on methanogenesis, sulfate reduction, carbon dioxide evolution and microbial biomass in anoxic salt marsh sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 45, 1586-1591.
- CARDOZO, T.R., ROSA, D.P., FEIDEN, I.R., ROCHA, J.A.V., D'ÁVILA DE OLIVEIRA, N.C., PEREIRA, T.S., PASTORIZA, T.F., MARQUES, D.M., DE LEMOS, C.T., TERRA, N.R., VARGAS, V.M.F. (2006): Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research*. 603, 83 -96.
- CASPER, S.J., KRAUSCH, J.M. (1980): Pteridophyta und Anthophyta, 1. Teil.- In: Ettl, H., Gerloff, J. & H. Heynig [Hrsg.]: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 23.- Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- CASPER, S.J., KRAUSCH, J.M. (1981): Pteridophyta und Anthophyta, 2. Teil.- In: Ettl, H., Gerloff, J. & H. Heynig [Hrsg.]: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 24.- Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 539.
- CASTANO, A., CANTARINO, M.J., CASTILLO, P., TARASONA, J.V. (1996): Correlations between the RTG-2 Cytotoxicity test EC<sub>50</sub> and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere*. 32, 2141-2157.
- CASTANO, A., VEGA, M.M., TARAZONA, J.V. (1995): Acute toxicity of selected metals and phenols on RTG-2 and CHSE-214 fish cell lines. *Environmental Contamination and Toxicology*. 55, 222-229.
- CLEAVES, H. J., MILLER, S. L. (1998): Oceanic protection of prebiotic organic compounds from UV radiation. *The National Academy of Sciences of USA*. 95, 7260-7263.

COOK, C.D.K., GUT, B.J., RIX, E.M., SCHNELLER - SEITZ, J.M. (1974): Water plants of the world: A manual for the identification of the genera of freshwater macrophytes. Junk, The Hague. i-viii, 561.

CURDS, C.R., COCKBURN, A. (1968): Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoxenic culture. Journal of Genetic Microbiology. 54, 343-358.

CHAN, H-T., CHAN, C., HO, J.W. (2003): Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B<sub>1</sub>-induced cytotoxicity in hepatoma cells. Toxicology. 188, 211-217.

DAYEH, V.R., GROMINSKY, S., DEWITTE-ORR, S.J., SOTORNIK, D., YEUNG, C.R., LEE, L.E., LYNN, D.H., BOLS, N.C. (2005): Comparing a ciliate and a fish cell line for their sensitivity to several classes of toxicants by the novel application of multiwell filter plates to Tetrahymena. Research in Microbiology. 156, 93-103.

DEKONING, J., KAATTARI, S. (1992): An improved salmonid lymphocyte culture medium incorporating plasma for *in vitro* antibody production and mitogenesis. Fish and Shellfish Immunology. 5, 275-285.

D`EUSTACHIO, A.J., JOHNSON, D.R. (1968): An instrumental approach to rapid microbiology. Internal publication, E.I du Pont de Nemours and Co. Inc., Wilmington, Delaware, USA.

DIERICKX, P.J., NOBLE, E. (1997): Purification and characterisation of the soluble glutathione S-transferase isoenzymes in rat kidney derived NRK cells. Biochemistry and Molecular Biology International. 41, 1013-23.

DEVILLER, P. (1995): Natural allergens and recombinant allergens. Allergie et Immunologie. 27, 316-9.

DIVE, D., DUEE, J.P., LECLERC, H. (1971): An epidemic which occurred among fresh water fish. Bacteriological study. Annales de Institut Pasteur de Lille. 22, 75-84.

DIVE, D., ROBERT, S., BEL, C., BONNEMAIN, H., FOURMAX, M.N., ANGRAND, E., EL BOUHOUTI, R., GUERY, L., BRUN, L., MURAT, M., LE DU, A., DEMARQUE, Y., HANSSENS, O. (1989B): A bioassay using the measurement of the growth inhibition of a ciliate protozoan : *Colpidium campylum* Stokes. *Hydrobiologia*. 188/189, 181-188.

ERIKSSON, J.E., GRÖNBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J.P., MERILUOTO, J.A.O. (1990): Hepatocellular uptake of <sup>3</sup>H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1025, 60-66.

ESCHER, M. (2003): Das "Schwarzforellensyndrom" in der Schweiz. *Bayerns Fischerei und Gewässer, Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes Bayern e.V.* 9, 51-57.

EUROPÄISCHE UNION (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik (Wasserrahmenrichtlinie). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*. L 327, 72.

FAIRCHILD, J.F., RUESSLER, D.S., HAVERLAND, P.S., CARLSON, A.R. (1997): Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32, 353- 357.

FENCHEL, T., BLACKBURN, T.H. (1979): *Bacteria and mineral cycling*. Academic Press, New York/San Francisco.

FENT, K. (2007): *Ökotoxikologie, Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 3. Auflage. ISBN 978-3-13-109993-8.

FOLMAR, L.C., SANDERS, H.O., JULIN, A.M. (1979): Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archiv of Environmental Contamination Toxicology*. 8, 269-278.

FORT, D.J., ROGERS, R.L., THOMAS, J.H., BUZZARD, B.O., NOLL, A.M., SPAULDING, C.D. (2004): Comparative sensitivity of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* as test species for the FETAX Model. *Journal of Applied Toxicology*. 24, 443-457.

FRANGEZ, R., ZUZEK, M.C., MRKUN, J., SUPUT, D., SEDMAK, B., KOSEC, M. (2003): Microcystin LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. *Toxicol.* 41, 999-1005.

FRESHNEY, R. (1987): *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique*. Alan R. Liss, Inc., New York. 177.

FURUKAWA, Y., KANEKO, K., YAMANAKA, K., O` HALLORAN, T.V., NUKINA, N. (2008): Complete Loss of Post-translational Modifications Triggers Fibrillar Aggregation of SOD1 in Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of biological chemistry*. 283, 24167-24176.

GAGNE, F., BLAISE, C., ANDRE, C. (2006): Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 329 – 336.

GOATCHER, L.J., QUERESHI, A.A., GOUDET, I.D. (1984): Evaluation and refinement of the *Spirillum voltans* test for use in toxicity screening. In: *Toxicity screening procedures using bacterial systems*. Marcel Dekker, New York, 89-107.

GOSSET, W.S. (1907): t-Verteilung, stochastische Student-Verteilung mit angegebener Wahrscheinlichkeitsverteilung. In: *Brockhaus Enzyklopädie*. 2005 – 2007. Bibliografisches Institut & F. A. Brockhaus AG.

GOODNOW, R.A., HARRISON, M.D., MORRIS, J.D., SEETING, K.B., LADUCA, R.J. (1990): Fate of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* strains in alpine soils and waters and in synthetic snow samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2223-2227.

GROVEL, O., POUCHUS, Y.F., VERBIST, J-F. (2003): Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Toxicon*. 42, 297-300.

GRUNG, M., LICHTENTHALER, R., AHEL, M., TOLLEFSEN, K-E., LANGFORD, K., THOMAS, K.V. (2007): Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*. 67, 108 – 120.

HANELT, M., GAREIS, M., KOLLARCZIK, B. (1994): Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia*. 128, 167 – 174.

HANFLAND, S., RUPPE, J. (2003): Beobachtungen zum Verlauf des Bachforellensterbens in ausgewählten Fließgewässern in Bayerns Fischerei und Gewässer. Heft 9: Bachforellensterben in Bayern.

HARADA, L.M., CARRILHO, A.J., OLIVEIRA, H.C., NAKANDAKARE, E.R., QUINTAO, E.C. (2006): Regulation of hepatic cholesterol metabolism in CETP/LDLr mice by cholesterol feeding and by drugs (cholestyramine and lovastatin) that lower plasma cholesterol. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 33, 1209-15.

HAUER, W. (2007): Fische, Krebse, Muscheln in heimischen Seen und Flüssen. Stocker Leopold Verlag. ISBN: 3702011439.

HAUNSCHMID, R., VENIER, R., LINDNER, R. (2003): ATFIBASE – Entwicklung und Etablierung eines Systems zur Erfassung und Analyse fischökologischer Zustandsparameter. *Angewandte geografische Informationsverarbeitung XV./ Beiträge zum AGIT – Symposium Salzburg 2003*. Hrsg.: Strobl, Blaschke, Griesebner. Herbert Wichmann Vlg., Heidelberg: 130-134 und <http://www.baw-igf.at/cms/content/view/138/318/lang,de/>

HENNING, K., CREMER, J., MEYER, H. (1992): Cytotoxicity of cyanobacterium *microcystis aeruginosa*. *Journal of Veterinary Medicine*. 39, 307 – 310.

- 
- HEIJNEN, L., MEDEMA, G. (2006): Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water Health*. 4, 487-98.
- HIGHTOWER, L.E., RENFRO, J.L. (1988): Recent applications of fish cell culture to biomedical research. *Journal of Experimental Zoology*. 248, 290-302.
- HOERGER, C.C., SCHENZEL, J., STROBEL, B.W., BUCHELI, T.D. (2009): Analysis of selected phytotoxins and mycotoxins in environmental samples. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 395, 1261 -1289.
- ISLAM, M.A., HEUVELINK, A.E., DE BOER, E., STURM, P.D., BEUMER, R.R., ZWIETERING, M.H., FARUQUE, A.S., HAQUE, R., SACK, D.A., TALUKDER, K.A. (2007): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from patients with diarrhoea in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*. 56, 380-5.
- JUNGWIRTH, M., HAIDVOGL, G., MOOG, O., MUHAR, S., SCHMUTZ, S. (2003): *Angewandte Fischökologie an Fließgewässern*. ISBN 3-8252-2113-X, Facultas Verlags- und Buchhandels AG.
- KECK, B. B., BODINE, A. B. (2006): The effects of fumonisin B<sub>1</sub> on viability and mitogenic response of avian immune cells. *Poultry Science Association*. 85, 1020-1024.
- KEITER, S., RASTALL, A., KOSMEHL, T., WURM, K., ERDINGER, L., BRAUNBECK, T., HOLLERT, H. (2006): Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the Upper Danube River. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science and Pollution Research International*. 13, 308-319.
- KIRBY, M.F., SHEAHAN, D.A. (1994): Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the algae *Scenedesmus subspicatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 120-126.

KIZIEWICZ, B., KOZLOWSKA, M., GODLEWSKA, A., MUSZYNSKA, E., MAZALSKA, B. (2004): Water fungi occurrence in the River Suprasl-bath Jurowce near Bialystok. *Wiad Parazytological*. 50, 143 - 50.

KLIMMEK, S. (2003): Charakterisierung der Biosorption von Schwermetallen an Algen. Dissertation, TU Berlin.

KOLLER – KREIMEL, V., JÄGER, P. (2001): Guter Zustand und gutes ökologisches Potential – neue Schutz- und Sanierungsziele in der europäischen Wasserpolitik. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft*, Jg. 53. 5/6, 117-123.

KOLBINGER, A. (2002): Fischbiologische Kartierung der Durchgängigkeit niederbayerischer Fließgewässer – Dissertation, TU München.

KOUADIO, J.H., MOBIO, T.A., BAUDRIMONT, I., MOUKHA, S., DANO, S.D., CREPPY, E.E. (2005): Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*. 213, 56 -65.

KOUTNY, M., ZAORALKOVA, L. (2005): Miniaturized kinetic growth inhibition assay with denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans*. *Chemosphere*. 60, 49-54.

KOTAK, B.G., SEMALULU, S., FRITZ, D.L., PREPAS, E.E., HRUDEY, S.E., COPPOCK, R.W. (1996): Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin LR in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Toxicon*. 34, 517-525.

KRAAK, M.H.S., LAVY, D., PEETERS, W.H.M., DAVIS, C. (1992): Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 23, 363-369.

KÜMMERER, K. (2003): Significance of antibiotics in the environment. *Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks*. Springer, Heidelberg, Germany.

- 
- KUNST, S., KLOTZ, G., TERNES, T., WENDZEL, A. (2004): Endokrin wirksame Substanzen in Kläranlagen – Vorkommen, Verbleib, Wirkung. Arbeitsbericht der ATV-DVWK-AG IG-5.4.
- LANDRIEUX, T., FIEN, R., LANGE, F. T., BRAUCH, H. J. (1999): Bestimmung von Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in deutschen Fließgewässern. *Vom Wasser*. 92, 257.
- LANGE, F. T., POST, B. (2000): Occurrence of Glyphosate and AMPA in German Rivers and their behaviour in drinking water treatment. Seminar on Glyphosate and water. Sept. 2000, Brüssel.
- LANNAN, C. N., WINTON, J.R. (1984): "Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids." *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*. 20, 671-676.
- LAVILLE, N., AIT-AISSA, S., GOMEZ, E., CASELLAS, C., PORCHER, J.M. (2004): Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*. 196, 41-55.
- LINDL, T. (2002): *Zell- und Gewebekultur*. Spectrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Heidelberg Berlin, ISBN 3-8274-1194-7.
- LIN, W.Y., HSU, W.Y., HISH, C.H., PAN, T.M. (2007): Proteome changes in Caco-2 cells treated with monascus-fermented red mold rice extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, 8987-94.
- LUSHCHAK, O.V., KUBRAK, O.I., STOREY, J.M., STOREY, K.B., LUSHCHAK, V.I. (2009): Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76, 932-937.
- MADONI, P., ESTEBAN, G., GORBI, G. (1992): Acute toxicity of cadmium, copper, mercury, and zinc to ciliates from activated sludge plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 49, 900-905.

- MALBROUCK, C., TRAUSCH, G., DEVOS, P., KESTEMONT, P. (2004): Effect of Microcystin-LR on protein phosphatase activity and glycogen content in isolated hepatocytes of fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus L.* *Toxicol* 44, 927-932.
- MARK, U., SOLBE, J. (1998): Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database V – The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere*. 36, 155-166.
- MCDANIEL, M., SNELL, T.W. (1998): Probability distributions of toxicant sensitivity for freshwater rotifer species. *Journal of Environmental Toxicology*. 14, 361-366.
- MCKIMM, J.M. (1977): Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long – term toxicity. *Journal of Fish Research Board Canada*. 34, 1148 – 1154.
- MELZER, A., HELD, K., HARLACHER, R. (1985): Die Makrophytenvegetation des Rachelsees im Bayerischen Wald. *Bericht Bayerwald Boten Ges.* 56m, 223-226.
- MELZER, A. (1988): Der Makrophytenindex – eine biologische Methode zur Ermittlung der Nährstoffbelastung von Seen. *Habilitationschrift TU München*.
- MINERVINI, F., FORNELLI, F., FLYNN, K.M. (2004): Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, desoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro*. 18, 21-8.
- MIRANDA C. L., COLLODI P., ZHAO X., BARNES D. W., BUHLER D. R. (1993): Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 305, 320-327.
- MOOG, O., CHOVANEC, A, HINTEREGGER, J., RÖMER, A. (1999): Richtlinie zur Bestimmung der saprobiologischen Gewässergüte von Fließgewässern. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wasserwirtschaftskataster, Wien.

- 
- MOOSER, V., PALL, K. (2008): Leitfaden zur Erhebung der biologischen Qualitätselemente Makrophyten. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Referat VII / 1b – Gewässerökologie, Wien.
- MORY, M., WAKABAYASHI, M. (2000): Cytotoxicity evaluation of synthesized chemicals using suspension cultured fish cells. *Fisheries Science*. 66, 871-875.
- MOSMANN, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63.
- MOSER, R. (2000): Mysteriöses Bachforellensterben 1997 und 1999. *Sportanglerbund Journal*, Mitgliederzeitschrift des Sportanglerbundes Vöcklabruck, Österreich.
- MUNN, M.D., GILLIOM, R.J. (2001): Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms. Water-resources investigations report 01-4077. National Water Quality Assessment Program. U.S. Geological survey, Branch of Information Services, Box 25286, Denver. CO 80225-0286, 20 – 41.
- MUYSEN, B.T.A., JANSSEN, C.R. (2001): Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. *Chemosphere*. 45, 507-514.
- MWANZA, M., KAMETLER, L., BONAI, A., RAJLI, V., KOVACS, M., DUTTON, M.F. (2009): The cytotoxic effect of fumonisin B<sub>1</sub> and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using the Methyl Thiazol on human and pig lymphocytes using the Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) assay. *Mycotoxicological Research*. 25, 233-238.
- NEBEKER, A.V., SCHUYTEMA, G.S., OTT, S.L. (1995): Effects of cadmium on growth and bioaccumulation in the northwestern salamander *Ambystoma gracile*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 29, 492-499.

- OUANES, Z., ABID, S., AYED, I., ANANE, R., MOBIO, T., CREPPY, E., BACHA, H. (2003): Induction of micronuclei by zearalenone in vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: Protective effect of vitamin E. *Mutagenic Research*. 538, 63-70.
- OROS, D. R., WERNER, I. (2005): Pyrethroid insecticides: An analysis of use patterns, distributions, potential toxicity and fate in the Sacramento-San Joaquin Delta and Central Valley. White paper for the interagency ecological program. SFEI Contribution 415. San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA.
- PARDOS, M., BENNINGHOFF, CH., THOMAS, R.L. (1998): Photosynthetic and population growth response of the test algae *Selenastrum capricornutum* Printz to zinc, cadmium and suspended sediment elutriates. *Journal of Applied Phycology*. 11, 145-151.
- PESTEMER, W., AUSBURG, B., GÜNTHER, P. (1998): Vergleich des OECD-Entwurfes "Terrestrial Plant Growth Test" mit Ergebnissen aus Freilandversuchen. In: Verfondern, M., Scheele, B. (Hrsg.). Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien. Band 11: Terrestrische Systeme, Jul-Sept. -441, Kernforschungsanlage Jülich GmbH: Jülich. 94-109.
- PESTEMER, W., PUCELIK-GÜNTHER, P. (1997): Standardized bioassays for the determination of ED(10)-NOEL and ED (50)-values for herbicides and selected following crops in soil. *Berichte an der Biologischen Bundesanstalt. Land- und Forstwirtschaft*. 29.
- PESTEMER, W., PUCELIK-GÜNTHER, P. (1999): Vergleich dreier Biotestmethoden zur Ermittlung des NO-Observable-Effekt levels (ED(10)) und weiterer Kenndaten der Dosis – Wirkungs - Beziehung zwischen dem Herbizid Clomazone und ausgewählten Nachbarkulturen im Boden. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst*. 51, 32-37.
- PHILIPPO, A. (1990): Interaction between components of electroplating industry wastes. Influences of the receiving water on the toxicity of the effluent. *Environmental Pollution*. 65, 251-267.

RODRIGUEZ-CEA, A., AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E. (2003): Micronucleus test in freshwater fish species: An evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 442-8.

ROYSTON, P. (1982): Algorithm AS 181: The W test for Normality. *Applied Statistics*, 31, 176–180.

ROTHMALER, W. (2002): Exkursionsflora von Deutschland, Band 4 Gefäßpflanzen. 9. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin.

ROTTER, B.A., THOMPSON, B.K., CLARKIN, S., OWEN, T.C. (1993): Rapid colorimetric bioassay for screening of fusarium mycotoxins. *Natural Toxins*. 1, 303 – 307.

ROTT, E., HOFMANN, G., PALL, K., PFISTER, P., PIPP, E. (1997): Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern. Teil 1: Saprobielle Indikaion. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien. 73.

RUPPE, J. (2006): mündliche Mitteilung.

SAITO, K., HAYAKAWA, T., KAWABATA, R., MEGURO, D., KASAI, K. (2009): In vitro antibacterial and cytotoxicity assessments of an orthodontic bonding agent containing benzalkonium chloride. *Angle Orthodontist*. 79, 2.

SANATH KUMAR, H., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I. (2001): Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 334-8.

SANO, L.L., KRÜGER, A.M., LANDRUM, P.F. (2005): Chronic toxicity of glutaraldehyde: Differential sensitivity of three freshwater organisms. *Journal of Aquatic Toxicology*. 71, 283-296.

SCHIMMEL, S.C., HANSEN, D.J., FORESTER, J.H. (1974): Sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*): An estuarine fish suitable for chronic (entire life-cycle)

bioassays. In: Proc. 28th Annual Conf. Southeastern Association game and fish community (Ed. W.A. Rodgers), Columbia, S.C. 392-398.

SCHMITZ, R.P.H., EISENTRÄGER, A., DOTT, W. (1998): Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). Journal of Microbiological Methods. 31, 159-166.

SCHMUTZ, S., KAUFMANN, M., VOGEL, B., JUNGWIRTH, M., MUHAR, S. (2000): A multi-level concept for fish- based, river-type-specific assessment of ecological integrity of Running Waters. Kluwer Academic Publishers, London. 279-289.

SCHNEEWEIS, I. (2000): Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen von Monacolinen, Citrinin und Mycophenolsäure. Dissertation an der Technischen Universität München.

SCHNEIDER, S. (2000): Entwicklung eines Makrophytenindex zur Trophieindikation von Fließgewässern. Shaker Verlag, Aachen. 207.

SCHOLZ, M., STAB, S., DZIOCK, F., HENLE, K. (2005): Lebensräume der Elbe und ihrer Auen. ISBN 3-89998-010-7. Weißensee Verlag, Berlin.

SCHOPER, U., LAMPERT, W. (1977): Effects of sublethal concentrations of the herbicide atrazin on growth and reproduction of *Daphnia pulex*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 17, 269-277.

SCHUBERT, M. (2001): Untersuchungen zum Schlupferfolg und zur Eihüllenbelastbarkeit von Äschenrognern ausgewählter Gewässer. Schriftenreihe des Landesfischereiverband Bayern e.V.

SCHWAIGER, J., FERLING, H. (2003): Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen in Bayerns Fischerei und Gewässer. Heft 9: Bachforellensterben in Bayern.

SCHWAIGER, J. (2003): Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen in BUWAL. Das mysteriöse Bachforellensterben. [www.fischerweb.ch](http://www.fischerweb.ch)

SCHWAIGER, J., GERST, M., FERLING, H., GUILLON, N., MALLOW, U. (2006):  
Bachforellensterben in Bayern – Abschlussbericht zu den Untersuchungen 2002 –  
2004, Forschungsvorhaben 73e 04010069. Bayerisches Landesamt für Umwelt.  
<http://www.bayern.de/LFW/technik/gewaesseroekologie/oekotoxikologie/bachforellen.htm>

SCHWAIGER, J. (2006): mündliche Mitteilung.

SCHWARZ, J. (1997): Numerische Mathematik. Teubner Verlag. 4. Auflage.

SEGNER, H. (2004): Cytotoxicity assays with fish cells as an alternative to the acute lethality test with fish. *Atla-Alternatives to laboratory animals*. 32, 375-382.

SEGNER, H. (1998): Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *Fish Ecotoxicology*. ISBN 3-7643-589-X, 1.

SLABBERT, J.L. (1986): Improved Bacterial growth test for rapid water toxicity screening. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 37, 565-569.

SOMMER, U. (1997): Biologische Meereskunde. ISBN-3-540-23057-2.

STEINBERG, C., WEIGERT, B., THORWEIHE, U. (2000): Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen. Tagungsband in der Schriftenreihe Wasserforschung, Band 6. [www.tu-berlin.de](http://www.tu-berlin.de)

STERBA, G. (1990): Süßwasserfische der Welt. Urania Verlag, Leipzig.

STUHLBACHER, A., MALTBY, L. (1992): Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 22, 319-324.

THOMULKA, K.W., MCGEE, D. J., LANGE, J.H. (1993): Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 51, 538-544.

THOMPSON, W.L., WANNEMACHER, R.W. (1984): Detection and quantitation of T-2 mycotoxin with a simplified protein synthesis inhibition assay. *Applied Environmental Microbiology*. 48, 1176-80.

TCHOUNWOU, P.B., WILSON, B., ISHAQUE, A., RANSOME, R., HUANG, MING-JU., LESZCZYNSKI, J. (2000): Toxicity assessment of atrazine and related triazine compounds in the microtox assay, and computational modeling for their structure-activity relationship. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067. 2, 63-74.

TRIEBSKORN, R. (2003): Biomarkeruntersuchungen an einheimischen Fischen: Moderne Instrumente zur Erfassung von komplexen Gewässerbelastungen. In: Heft 9: Bachforellensterben in Bayern – Vorträge zum Symposium in Wielenbach. Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes Bayern e.V.

TÜMPLING, F. (1999): Methoden der Biologischen Wasseruntersuchung. G.Fischer, Stuttgart, New York.

UENO, Y., UMEMORI, K., NIIMI, E-C., TANUMA, S-I., NAGATA, S., SUGAMATA, M., IHARA, T., SEKIJIMA, M., KAWAI, K-I., UENO, I., TASHIRO, F. (1995): Induciton of Apoptosis by T-2 Toxin and other Natural Toxins in HL-60 Human Promyelotic Leukemia Cells. *Natural Toxins*. 3, 129-137.

UYSAL, D. (2007): The effect of cadmium ions on the growth rate of the freshwater macrophyte Duckweed *Lemna minor*. *Ekoloji*. 16, 9-15.

VASSEUR, P., DIVE, D., SOKAR, Z., BONNEMAIN, H. (1988): Interactions between copper and some carpamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere*. 17, 767-782.

VESELY, D.L. (1983): Ergotamine and dihydroergotamine enhance guanylate cyclase activity. *Research Communications in Chemical and Pathological Pharmacologies*, 40, 245-54.

WARD, J.V., STANFORD, J.A. (1995A): The serial discontinuity concept. Extending the model to floodplain rivers. *Regulated Rivers: Research and management*. 15, 125-139.

WICKLUM, D., SMITH, D.E.C., DAVIES, R.W. (1997): Mortality, preference, avoidance, and activity of a predatory leech exposed to cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32, 178-183.

WOOD, C.M., ELETTI, B., PART, P. (2002): New methods for the primary culture of gill epithelia from freshwater rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry*. 26, 329-344.

WON, S.J., NOVILLO, A., CUSTODIA, N., RIE, M.T., FITZGERALD, K., OSADA, M., CALLARD, I.P. (2005): The Freshwater Mussel (*Elliptio complanata*) as a Sentinel Species: Vitellogenin and Steroid Receptors. *Integrative and Comparative Biology*. 45, 72-80.

WOELZ, J., ENGWALL, M., MALETZ, S., OISMAN, TAKNER, H., VAN BAVEL, B., KAMMANN, U., KLEMPT, M., WEBER, R., BRAUNBECK, T., HOLLERT, H. (2008): Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine – a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution International*. 15, 536 – 53.

WWA – KEMPTEN (2005): mündliche Mitteilung.

YU, S.Z. (1995): Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterol Hepatology*. 10, 674-684.

ZAMBRANO, F., CANELO, E. (1996): Effects of microcystin LR on the partila reactions of the Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio Linneo*). *Toxicol*. 34, 451-458.

ZEGURA, B., HEATH, E., CERNOSA, A., FILIPIC, M. (2009): Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of

wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere. 75, 1453 – 1460.

## I Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIE BACHFORELLE (SALMO TRUTTA FORMA FARIO).....	11
ABBILDUNG 2: EINFLUSS DES BESATZZEITPUNKTES AUF DIE KLINISCHE MANIFESTATION DES BACHFORELLENSTERBENS AN DER VERSUCHSANLAGE ILLER IN KEMPTEN (2000/2001) .....	15
ABBILDUNG 3: KRITERIEN ZUR BEURTEILUNG DES GEWÄSSERZUSTANDES (ANGELEHNT AN EG-WRRL; EU, 2000) .....	17
ABBILDUNG 4: WIRKUNGSVERNETZUNG VON UMWELTAKTIVEN STOFFEN AUF VERSCHIEDENEN BIOLOGISCH-ÖKOLOGISCHEN EBENEN (ABGEÄNDERT NACH FENT, 2007) .....	18
ABBILDUNG 5: AUSWAHL AN LABORMETHODEN ZUR ERFASSUNG VON GEWÄSSERGÜTEN .....	25
ABBILDUNG 6: DEPROTONIERUNG VON 3-METHYL-3-AMINO-7 DIMETHYLAMINOPHENAZIN DURCH PH – WERT VERÄNDERUNG (BLAUROTE FÄRBUNG – PH 6,8 ZU ORANGEGELBER FÄRBUNG – PH 8) .....	33
ABBILDUNG 7: REDUKTION EINES TETRAZOLIUMSALZES (MTT-(3-(4,5-DIMETHYL- DIAZOLYL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM-BROMID, R <sub>1,2,3</sub> =C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ) ZU FORMAZAN ..	34
ABBILDUNG 8: VORGEHENSWEISE DER ANGEWANDTEN METHODIK.....	43
ABBILDUNG 9: BACHFORELLENLEBERZELLEN (BFL-ZELLEN; SCHWARZE PFEILE) UND ERYTHROZYTEN (ROTE PFEILE) IM ZELLMEDIUM.....	53
ABBILDUNG 10: PRIMÄRE BFL-ZELLEN; BEISPIELABBILDUNGEN FÜR SCHLECHTEN ZELLZUSTAND (ROTE UMRANDUNG: AGGLUTINATIONEN).....	59
ABBILDUNG 11: PRIMÄRE BFL-ZELLEN; BEISPIELABBILDUNGEN FÜR GUTEN ZELLZUSTAND .....	59
ABBILDUNG 12: EINFLUSS DES ALTERS DER BFL-ZELLKULTUR AUF DIE MTT- SPALTUNGSAKTIVITÄT (+/- SD, N=3) .....	61
ABBILDUNG 13: ABHÄNGIGKEIT DER GEBILDETEN FORMAZANMENGE VON DER INKUBATIONSDAUER (+/- SD, N=4) DER BFL-ZELLEN .....	62
ABBILDUNG 14: EINFLUSS DER ANREICHERUNG (FAKTOR 10:1) ABGESTUFTER TOXINKONZENTRATIONEN VON GLIOTOXIN UND ZEARALENON AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN (+/- SD, N=3, * * = P<0,01, * = P<0,05; ZELLKONTROLLE 100% [SD= 5,1]) .....	63
ABBILDUNG 15: EINFLUSS DER ANREICHERUNG (FAKTOR 10:1) ABGESTUFTER TOXINKONZENTRATIONEN VON MICROCYSTIN LR AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN (+/- SD, N=3, * * = P<0,01, * = P<0,05) .....	65

ABBILDUNG 16: EINFLUSS DER FUSARIENTOXINE FUMONISIN B1, T-2-TOXIN UND DESOXYNIVALENOL AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05) .....	66
ABBILDUNG 17: EINFLUSS DER FUSARIENTOXINE ZEARALENON, A-ZEARALENOL UND $\beta$ -ZEARALENOL AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05) .....	67
ABBILDUNG 18: EINFLUSS VON GLIOTOXIN, KOIJSÄURE, STERIGMATOCYSTIN UND AFLATOXIN B1 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05) .....	68
ABBILDUNG 19: EINFLUSS VON ROQUEFORTIN UND OCHRATOXIN A AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05) .....	70
ABBILDUNG 20: EINFLUSS DER TOXINE ERGOTAMIN UND MONACOLIN KS AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05) .....	71
ABBILDUNG 21: EINFLUSS VON MICROCYSTIN LR AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST .....	72
ABBILDUNG 22: EINFLUSS DER TOXINE 17- $\beta$ -ESTRADIOL UND GLYPHOSAT AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05).....	73
ABBILDUNG 23: EINFLUSS DER TOXINE GLIOTOXIN, AFLATOXIN B1, ZEARALENON UND MICROCYSTIN LR AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON HEP2-ZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3, ** = P<0,01, * = P<0,05; ZELLKONTROLLE 100 % [SD= 2,7]).....	74
ABBILDUNG 24: EINFLUSS DER TOXINE ZEARALENON, GLIOTOXIN, AFLATOXIN B1 UND MICROCYSTIN LR AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON VEROZELLEN IM MTT-TEST (+/- SD, N=3; , ** = P<0,01, * = P<0,05; ZELLKONTROLLE 100 % [SD= 3,5]) .....	75
ABBILDUNG 25: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2004 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD=6,3]; N=9) UND VERGLEICH MIT REFERENZWASSERPROBEN (STILLACH/TRETTACH,1:1; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE KARTENANHANG) .....	77
ABBILDUNG 26: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2005 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON BFL-ZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD=7,1]; N=7) UND VERGLEICH MIT REFERENZPROBENAHMEN DER ZUFLÜSSE (STILLACH, TRETTACH, BREITACH – OBERLAUF BZW. UNTERLAUF; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE KARTENANHANG) 80	

---

ABBILDUNG 27: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2004 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON VEROZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD=4,9], REFERENZ SD=5,7, N=3) UND REFERENZWASSERPROBEN DER ZUFLÜSSE (STILLACH/TRETTACH, 1:1; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE KARTENANHANG) .....	82
ABBILDUNG 28: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2005 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON VEROZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD = 6,7]; N=3) UND VERGLEICH MIT REFERENZPROBENAHMEN DER ZUFLÜSSE (STILLACH, TRETTACH, BREITACH – OBERLAUF BZW. UNTERLAUF; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE KARTENANHANG) .....	83
ABBILDUNG 29: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2004 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON HEP2-ZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD = 5,4]; N=3) UND VERGLEICH MIT REFERENZWASSERPROBEN DER ZUFLÜSSE (STILLACH/TRETTACH, 1:1; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE KARTENANHANG) .....	84
ABBILDUNG 30: EINFLUSS DER WASSERPROBENKONZENTRATE (FAKTOR 10:1) DER ILLER DES JAHRES 2005 AUF DIE RELATIVE SPALTUNGSAKTIVITÄT VON HEP2-ZELLEN IM MTT-TEST (ZELLKONTROLLE 100 % [SD=7,9]; N=3) UND VERGLEICH MIT REFERENZPROBENAHMEN DER ZUFLÜSSE (STILLACH, TRETTACH, BREITACH – OBERLAUF BZW. UNTERLAUF; PROBENAHMESTANDORTE SIEHE ANHANG).....	85
ABBILDUNG 31: UNTERSUCHUNGSGEBIET ZUR ERHEBUNG DER ÖKOLOGISCHEN RANDPARAMETER AN DER ILLER (VERÄNDERT NACH WWW.GEODATEN-BAYERN.DE) .....	87
ABBILDUNG 32: FISCHBESTANDSANALYSE DER ILLER IM UNTERSUCHUNGSGEBIET (2005) .....	88
ABBILDUNG 33: VERLAUF DER EINWOHNERGLEICHWERTE (EGW) AN DER ARA BÖDMEN/ KLEINWALSERTAL- 2004 (NACH JAHRESBERICHT 2004, AMT DER VORARLBERGER LANDESREGIERUNG) .....	91
ABBILDUNG 34: VERLAUF DER EINWOHNERGLEICHWERTE (EGW) IN DER KLÄRANLAGE RIEZLERN/ KLEINWALSERTAL- 2004 (NACH JAHRESBERICHT 2004, AMT DER VORARLBERGER LANDESREGIERUNG) .....	92
ABBILDUNG 35: VERLAUF DER EINWOHNERGLEICHWERTE (EGW) AN DER KLÄRANLAGE BÖDMEN/ KLEINWALSERTAL- 2005 (NACH JAHRESBERICHT 2005, AMT DER VORARLBERGER LANDESREGIERUNG) .....	93
ABBILDUNG 36: VERLAUF DER EINWOHNERGLEICHWERTE (EGW) IN DER KLÄRANLAGE RIEZLERN/ KLEINWALSERTAL- 2005 (NACH JAHRESBERICHT 2005, AMT DER VORARLBERGER LANDESREGIERUNG) .....	93
ABBILDUNG 37: BEFRAGUNGSLEITFADEN "ÖKOLOGISCHE RANDPARAMETER" .....	141

## J Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: SENSIBILITÄT AUSGEWÄHLTER TESTORGANISMEN GEGENÜBER CADMIUM UND ATRAZIN (ANGELEHNT AN OROS & WERNER, 2005; BURTON, 1991)	27
TABELLE 2: VERWENDETE GERÄTE FÜR DIE AUFBEREITUNG DER WASSERPROBEN	35
TABELLE 3: GEBRAUCHSMATERIAL	35
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIAL	36
TABELLE 5: CHEMIKALIEN	36
TABELLE 6: VERWENDETE TOXINE UND UMWELTAKTIVE STOFFE	38
TABELLE 7: VERWENDETE GERÄTE UND VERBRAUCHSMITTEL ZUR HERSTELLUNG DER TOXINLÖSUNGEN	39
TABELLE 8: VERWENDETE CHEMIKALIEN ZUR HERSTELLUNG DER TOXINLÖSUNGEN	39
TABELLE 9: VERWENDETE MEDIEN UND ZUSÄTZE ZUR HERSTELLUNG DER TOXINLÖSUNGEN	39
TABELLE 10: VERWENDETE GERÄTE FÜR DIE ETABLIERUNG DES TESTSYSTEMS	39
TABELLE 11: GERÄTE FÜR DIE ELEKTROBEFISCHUNG UND ZUR ERHEBUNG DER ÖKOLOGISCHEN RANDPARAMETER	40
TABELLE 12: BEURTEILUNG VON EINFLUSSFAKTOREN AUF ISOLIERTE ZELLKULTUREN WÄHREND DER GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG	54
TABELLE 13: ÜBERSICHT ÜBER DEN ZUSTANDSVERLAUF DER BFL-ZELLKULTUR MIT VERSCHIEDENEN ZELLKULTURMEDIEN	56
TABELLE 14: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLSTABILITÄT VON DER KOMBINATION, ART UND KONZENTRATION VON ANTIBIOTIKAZUSÄTZEN ZU DEN MEDIEN (INKUBATIONSZEIT=48H)	57
TABELLE 15: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLSTABILITÄT VON DER VERWENDUNG VERSCHIEDENER SEREN	57
TABELLE 16: EINFLUSS VON ANHEFTUNGSFAKTOREN AUF DIE ADHÄSION DER BACHFORELLENLEBERZELLEN AN DIE WANDUNG VON KAVITÄTEN EINER MIKROTITERPLATTE	58
TABELLE 17: AUSGEWÄHLTE CHEMISCHE UND MIKROBIELLE GEWÄSSERDATEN DER BREITACH (QUELLE UMWELTINSTITUT VORARLBERG) AUS DEN JAHREN 2005 (OBEN) UND 2004 (UNTEN)	95
TABELLE 18: EMPFINDLICHKEIT VON BFL-ZELLEN GEGENÜBER VERSCHIEDENEN TOXINEN	105

## K Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärung

LC <sub>50</sub> (EC <sub>50</sub> )	Letalkonzentration in Wasser, Boden oder Luft, bei der 50 % der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Beobachtungszeitraumes sterben.
NOEL	(No observed effect level). Dosis, die keinen feststellbaren negativen Effekt (Toxizität) erzeugt.
MTT	Bei MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) handelt es sich um ein gelbes Salz, welches mittels mitochondrialer Dehydrogenasen in einen stark blauen, kristallinen, wasserunlöslichen Farbstoff umgewandelt wird. Hierbei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen umgewandeltem Farbstoff und mitochondrialer Aktivität und somit auch zur „Vitalität“ der Zellen (Mosmann, 1983).
Mykotoxine	Schimmelpilzgifte; Stoffwechselprodukte aus Pilzen, die bei Menschen und anderen tierischen Warmblütern bereits in geringsten Mengen giftig wirken.
Einsömmrig	Altersbestimmung bei Fischen (1nen Sommer alt)
Hepatozyten	Leberzellen
Rheophilen	strömungsliebend
Exophthalmus	Hervortreten des Augapfels
Interstizial	Poren, Kieslücken, Zwischenräume
PBS	Phosphate buffered saline
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
Q	ABFL-Zellenussmenge
kg	<u>K</u> ilogramm
log	<u>L</u> ogarithmus
min	<u>M</u> inute
s	<u>S</u> ekunde
SD	Standardabweichung ( <u>S</u> tandard <u>D</u> eviation)

---

ARA	<u>A</u> bwasser <u>r</u> einigungs <u>a</u> n <u>l</u> a <u>n</u> g <u>e</u>
T°	Tagesgrade bei der Erbrütung von Fischen (Tagesgrade/Wassertemperatur = Erbrütungsdauer)
Richtlinie 2006/11/EG	Richtlinie 2006/11/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 betreffend die Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft (ABl. L 64 vom 4.04.2006)
RL 76/464	Richtlinie des Rates vom 4. Mai 1976 (ABl. Nr. L 129 vom 18.5.1976, S. 23) betreffend die Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft
FCS	Fätales Kälber Serum
Korpulenzfaktor	Konditionsfaktor bei Fischen. Er gibt Rückschlüsse auf den körperlichen Zustand und die Vitalität von Fischen. $K = (100 \times \text{Körpergewicht [g]}) / \text{Länge [cm]}^3$
zytotoxische Grenzkonzentration	Konzentration bei der eine erste signifikante Abweichung von der Zellkontrolle auftritt

## L Anhang

### Auszüge aus der Trinkwasserrichtlinie (Grenzwerte):

#### III. Grenzwerte für chemische Stoffe

Lfd. Nr.	Bezeichnung	Grenzwert mg/l	berechnet als	entsprechend etwa mmol/m <sup>3</sup>	zul. Fehler d. Meßwertes ± mg/l	festgelegtes Verfahren/Bemerkungen
a	b	c	d	e	f	g
8	Aluminium	0,2	Al	7,5	0,04	
9	Ammonium	0,5	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30	0,1	geogen bedingte Überschreitungen bleiben bis zu einem Grenzwert von 30 mg/l außer Betracht
10	Barium	1	Ba	7	0,2	
11	Bor	1	Ba	90	0,2	
12	Calcium	400	Ca	10000	40	
13	Chlorid	250	Cl	7000	25	
14	Eisen	0,2	Fe	3,5	0,01	
15	Kalium	12	K	300	0,5	geogen bedingte Überschreitungen bleiben bis zu einem Grenzwert von 50 mg/l außer Betracht
16	Kiedahlstickstoff	1	NH <sub>4</sub> <sup>-</sup>	71		
17	Magnesium	50	Mg	2050	2	geogen bedingte Überschreitungen bleiben bis zu einem Grenzwert von 120 mg/l außer Betracht
18	Mangan	0,05	Mn	0,9	0,01	
19	Natrium	150	Na	6500	6	
20	Phenole	0,0005	Phenol C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> OH	0,005		- ausgenommen natürliche Phenole, die nicht mit Chlor reagieren - ist eingehalten, wenn der Grenzwert der Anlage 4 Nr. 3 "Geruchsschwellenwert" eingehalten wird
21	Phosphor	6,7	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	70	0,1	Grenzwert entspricht 5 mg/l P <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
22	Silber	0,01	Ag	0,1	0,004	bei Zugaben von Silber oder Silberverbindungen für die Aufbereitung von Trinkwasser gilt Anlage 3 Nr. 4
23	Sulfat	240	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2500	5	geogen bedingte Überschreitungen bleiben bis zu einem Grenzwert von 500 mg/l außer Betracht
24	Gelöste oder emulgierte Kohlenwasserstoffe: Mineralöle	0,01			0,005	
25	Mit Chloroform extrahierbare Stoffe	1	Abdampf- rückstand			ist eingehalten, wenn der Grenzwert der Anlage 4 Nr. 7 "Oxidierbarkeit" eingehalten wird
26	Oberflächenaktive Stoffe a) anionische  b) nicht ionische	  0,2	a) Methylen blauaktive Substanzen  b) bismut- aktive Substanz		  0,1	a) Bestimmung anionischer Tenside mittels Methylenblau gegen Dodecylbenzol- sulfonsäuremethylester als Standard  b) Bestimmung nicht-ionischer Tenside mit modifiziertem Dragendorff-Reagens gegen Nonylphenol-dekaethoxylat

## II. Physikalisch-chemische Kenngrößen

Lfd. Nr.	Bezeichnung	Grenzwert	berechnet als	zul. Fehler d. Meßwertes	festgelegtes Verfahren/Bemerkungen
a	b	c	d	e	f
4	Temperatur	25 °C	-	± 1 °C	Grenzwert gilt nicht für erwärmtes Trinkwasser
5	pH-Wert	nicht unter 6,5 und nicht über 9,5  a) bei metallischen oder zementhaltigen Werkstoffen, außer passiven Stählen, darf im pH-Bereich 6,5-8,0 der pH-Wert des angegebenen Wassers nicht unter dem pH-Wert der Calciumcarbonat-sättigung bleiben  b) Bei Faserzementwerkstoffen darf im pH-Bereich 6,5-9,5 der pH-Wert des abgegebenen Wassers nicht unter dem pH-Wert der Calciumcarbonat-sättigung bleiben	-	± 0,1	elektrochemische Messung Gaselektrode;  für Wasserversorgungsanlagen mit einer Abgabe bis 1000 m <sup>3</sup> pro Jahr ist auch photometrische Messung zulässig;  der pH-Wert der Calciumcarbonatsättigung wird durch Berechnung bestimmt;  Schwankungen des pH-Wertes
6	Leitfähigkeit	2000 µS/cm	-	± 100 µS/cm	elektrometrische Messung
7	Oxidierbarkeit	5 mg/l	O <sub>2</sub>	-	maßanalytische Bestimmung der Oxidierbarkeit mittels Kaliumpermanganat/ Kaliumpermanganatverbrauch

## I. Sensorische Kenngrößen

Lfd. Nr.	Bezeichnung	Grenzwert	berechnet als	zul. Fehler d. Meßwertes	festgelegtes Verfahren/Bemerkungen
a	b	c	d	e	f
1	Färbung *) (spektraler Absorbtionskoeff. Hg 436 nm)	0,5 m	-	-	Bestimmung des spektralen Absorbtionskoeffizienten mit Spektralphotometer oder Filterphotometer
2	Trübung *)	1,5 Trübungseinheit/ Formazin	-	-	Bestimmung des spektralen Streukoeffizienten
3	Geruchsschwellenwert	2 bei 12 °C 3 bei 25 °C	-	-	stufenweise Verdünnung mit geruchsfreiem Wasser und Prüfung auf Geruch

\*) Kurzzeitige Überschreitungen bleiben außer Betracht.

## Mikrobiologische Parameter

( Fundstelle des Originaltextes: Bürgerliches Gesetzbuch I. I 2001, 970 )

### Teil I:

Allgemeine Anforderungen an Wasser für den menschlichen Gebrauch

Lfd. Nr.	I	Parameter	I	Grenzwert (Anzahl/100 ml)
1	I	Escherichia coli (E. coli)	I	0
2	I	Enterokokken	I	0
3	I	Coliforme Bakterien	I	0

### Teil II:

Anforderungen an Wasser für den menschlichen Gebrauch, das zur Abfüllung in Flaschen oder sonstige Behältnisse zum Zwecke der Abgabe bestimmt ist

Lfd. Nr.	I	Parameter	I	Grenzwert
1	I	Escherichia coli (E. coli)	I	0/250 ml
2	I	Enterokokken	I	0/250 ml
3	I	Pseudomonas aeruginosa	I	0/250 ml
4	I	Koloniezahl bei 22 Grad C	I	100/ml
5	I	Koloniezahl bei 36 Grad C	I	20/ml
6	I	Coliforme Bakterien	I	0/250 ml

### Erhebung ökologischer Parameter - Befragungsleitfaden

Name : \_\_\_\_\_

Funktion: \_\_\_\_\_

#### Anthropogene Einflüsse auf die Iller bzw. deren Zuflüsse

	Art
Industrie/Gewerbe	
Haushalt-/Kommunalabwässer	
Abwasserreinigungsanlagen	
Landwirtschaft	
Forstwirtschaft	
Verkehr	
"Altlasten"	
Tourismus/Freizeit	
Wasserbauliche Maßnahmen	

Anmerkungen:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Abbildung 37: Befragungsleitfaden "Ökologische Randparameter"**

## M Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	31.05.1976
Geburtsort	Wegscheid, Deutschland
Familienstand	ledig
Nationalität	Deutsch

### SCHULBILDUNG / STUDIUM / PROMOTION

seit Jan. 2004	<b>Technische Universität München/Weihenstephan; Department für Tierwissenschaften, Lehrstuhl für Tierhygiene</b> Zum „Bachforellensterben in Bayern“ – Beurteilung der Gewässergüte mit zellbiologischen Methoden
Okt. 2003 - März 2005	<b>Technische Universität München/Weihenstephan</b> Internationaler Masterstudiengang „Sustainable Resource Management“ in englischer Sprache Schwerpunkte: Water and Soil Management Wildlife and Protected Area Management Studentensprecher
Okt. 1998 – April 2003	<b>Fachhochschule Weihenstephan</b> Studium der Biotechnologie/Umweltbiotechnologie <b>Technische Universität München (TUM) - Lehrstuhl für Tierhygiene und Forschungsanstalt für Umwelt und Gesundheit (GSF) Neuherberg / München</b> Prämierte Diplomarbeit (VDI, VdBiol) „Einfluss von erhöhter UVB – Strahlung („Ozonloch“) auf Stresshormonentwicklung („heat shock proteins“)
1992 – 1994	<b>Fachoberschule Passau (technischer Zweig)</b> Fachgebundene Hochschulreife

### BERUFSAUSBILDUNG

Sept. 1994 – Juni 1997	<b>Wacker Chemie GmbH, Burghausen</b> Ausbildung zum Chemielaboranten Prämierung: „Verband deutscher Chemiebetriebe“: „Verbesserung der Handlungskompetenz in der Ausbildung“. Projekt: Energie- und Stoffströme im Werk Burghausen
------------------------	--

**BERUFSPRAXIS**

Seit Okt. 2009	<b>SchueTo-Ingenieurbüro für Umwelttechnik;</b> Geschäftsführer
Jan. 2007 – Okt. 2009	<b>Ziviltechnikkanzlei – Dr. Kofler / Österreich, Steiermark</b> Interner Konsulent bzw. Abteilungsleitung in den Bereichen Energie- und Gewässermanagement
Sept. 2003 – Jan. 2004	<b>Technische Universität München / Lehrstuhl für Tierhygiene</b> Simulation „Ozonbelastung mit Stressdetektion (HSP70; HSP90) in aquatischen Lebewesen“
Sept. 2001 – Jan. 2002	<b>California Institute of Technology (CALTECH) / Los Angeles, Kalifornien, USA</b> “Directed evolution of P450-monoxygenases”; Enzymtechnologie – enzyme engineering/“biogas production”.
April 2000 – Aug. 2002	<b>Technische Universität München / Lehrstuhl für Tierhygiene</b> Praktikum und studentische Hilfskraft im Bereich Gewässer- und Fischökologie
Oktober 2000	<b>Gründung der Firma „SchueTo-Umwelttechnik“</b> Gründung mit Businessplan und Teilnahme bei „Flügge“ im Bereich Erneuerbare Energien – Biogas-, Wasserkraftanlagen, Holzvergasung
Sept. 2000	<b>Wasserwirtschaftsamt Passau</b> Praktikum im Bereich Gewässerökologie/-chemie und Abwasserreinigung
Okt. 1997 – Jan. 1998	<b>Wacker Chemie GmbH, Burghausen</b> Gruppenleiter Qualitätskontrolllabor (Silikone)
Sept. 1997	<b>IHK – Passau</b> Metallverarbeitungslehrgang (Elektro- bzw. WIG – Schweißen)

**WEHRDIENST / ZIVILDIENTST**

Juli 1997 – Aug. 1997	Zivildienst
Jan. 1998 – Okt. 1998	Wehrdienst

**SPRACHEN**

Englisch fließend (Wort und Schrift);	Spanisch (Grundkenntnisse)
---------------------------------------	----------------------------