

Charakterisierung des Gütezustands des Neckars bei Tübingen auf der Basis struktureller, limnologischer und ökotoxikologischer Bewertungskriterien

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Krisztina Vincze
aus Debrecen, Ungarn

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 26.06.2015

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Triebskorn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz-R Köhler

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Hintergrund	1
Beschreibung und Ziele der Promotionsarbeit	3
Methoden.....	6
Ergebnisse.....	15
Diskussion.....	23
Schlussfolgerungen.....	32
Literatur.....	33
Kapitel 1: Kartierung des Neckars im Umkreis von Tübingen	40
Kapitel 2:Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryos	67
Kapitel 3:Charakterisierung des Gesundheitszustandes von residenten Fischen und Wirbellosen mit Hilfe von Biomarkern im Neckar bei Tübingen (Passives Umweltmonitoring)	97
Kapitel 4: Impact of wastewater on fish health: A case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools	135
Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten	173
Publikationsliste	175
Danksagung	177

Zusammenfassung

Hintergrund

Seit dem 19. Jahrhundert kommt es durch zunehmende Industrialisierung und rapide wirtschaftliche Entwicklung in Europa zu einer stetig steigenden Produktion und Anwendung von Chemikalien. Laut Europäischer Chemikalienagentur (European Chemicals Agency (ECHA) 2014) sind allein in Europa über 12.000 Substanzen registriert. Diese gelangen trotz strenger Regulation der zuständigen Behörden sowie modernisierter Kläranlageneliminierung und Recyclingverfahren in viele Fälle zusammen mit ihren Metaboliten über diverse Wege und Prozesse schließlich in die Umwelt. Aufgrund subtiler chronischer Wirkungen sowie Mischwirkungen dieser Stoffe können Gefahren für aquatische Ökosysteme nicht ausgeschlossen werden (Eggen et al. 2004).

Die Ökotoxikologie beschäftigt sich mit der Analyse und dem Verständnis der Auswirkungen chemischer Substanzen auf die Umwelt und auf die Lebewesen (Fent 2003). Um die vielfältigen Fragestellungen in der Ökotoxikologie beantworten zu können, wurden sehr unterschiedliche Untersuchungsmethoden entwickelt, die im Labor oder/und im Freiland angewendet werden.

Toxizitätstests, die im Labor durchgeführt werden, können schnell Informationen mit hoher Reproduzierbarkeit über die möglichen Effekte von Chemikalien auf Lebewesen liefern (Newman and Evans 2006). Dabei werden oft verschiedene Modellorganismen (Zebrafische, Daphnien, Leuchtakterien usw.) sowie *in vitro* Studien eingesetzt. Allerdings sind solche Untersuchungen trotz Einbeziehung von Sicherheitsfaktoren bei der Risikobewertung meistens nicht direkt mit den Verhältnissen in der Umwelt vergleichbar (Sibley et al. 1999), da meist nur Effekte von Einzelsubstanzen in kurzen Zeitrahmen bei nichteinheimischen Modellorganismen betrachtet werden. Effekte unter Langzeitbelastung, die sich über mehrere Generationen hinweg manifestieren können, sind oft schwer nachzuweisen (Eggen et al. 2004). Ein weiteres Defizit ist der Informationsmangel bezüglich komplexer Mischungstoxizität. Dies kann in einer Risiko-Unterschätzung von Einzelsubstanzen im Vergleich zu einer Exposition gegenüber komplexen Chemikaliengemischen resultieren (Backhaus and Faust 2012). In der Umwelt ist zudem mit dem Einfluss einer Reihe biotischer (Resistenz, Fressfeinde, Nahrungsangebot, Parasitierung, Fortpflanzungszeit etc.) und abiotischer (Temperatur, Bioverfügbarkeit, Sauerstoffgehalt, UV-Strahlung, Wetterereignisse etc.) Faktoren zu rechnen, die sich zum einen auf die

Stressreaktion von Lebewesen und zum anderem auf das Verhalten von Schadstoffen auswirken können (Perrodin et al. 2011).

Ökotoxikologische Freilandstudien bieten eine Möglichkeit, die Belastungen von Lebensräumen und die Konsequenzen der Schadstoffpräsenz und deren Mischungen *in situ* zu erfassen. Durch vielfältige chemisch-analytische Methoden kann ein breites Spektrum von Umweltchemikalien sowohl in den Lebewesen selbst (nach Bioakkumulation) als auch in deren Umwelt detektiert werden (Popiel and Sankowska 2011). Dadurch wird einerseits ein Einblick in die Art der Exposition möglich, andererseits können die biologischen Reaktionen der Organismen plausibler interpretiert werden.

Ein Effekt-orientiertes Umweltmonitoring mit ausgewählten Indikator-Spezies stellt ein effektives Werkzeug für die retrospektive Charakterisierung der Auswirkungen von Belastungsereignissen dar. In zahlreichen Studien (zum Beispiel (Carballo et al. 2005; Tetreault et al. 2012) wurde im Rahmen eines passiven Monitorings der Gesundheitszustand residenter Individuen untersucht, um anthropogene Einflüsse in deren Habitat nachzuweisen. Bei der Evaluierung passiver Monitoringstudien muss jedoch beachtet werden, dass die Freilandorganismen eine heterogene Altersstruktur und eine unbekannt „Vergangenheit“ aufweisen, außerdem kann eine Langzeitbelastung zu einer Toleranz führen (Köhler et al. 1999). Neben dem passiven Monitoring wird in der Ökotoxikologie auch das aktive Monitoring angewendet (Wester et al. 2002). Hierbei werden unbelastete Organismen in einem bestimmten Habitat für einen definierten Zeitraum exponiert (zum Beispiel in Käfigen oder Bypass-Systemen). Ein bedeutender Vorteil des aktiven Monitorings ist die Möglichkeit, durch gezielte Probenahmen punktuell toxische Einträge zu identifizieren (Grizzle et al. 1988). Allerdings sollten einige fundamentale Unterschiede zwischen residenten und aktiv exponierten Organismen berücksichtigt werden: Im Gegensatz zu residenten Tieren können die Individuen, die im aktiven Monitoring eingesetzt werden, kurzfristigen Schadstoffeinträgen nicht ausweichen. Zudem werden die exponierten Individuen neben der natürlichen Nahrung mit künstlichem Futter ernährt und in einer hohen Dichte gehalten (Bernet et al. 2001).

Sowohl bei Freiland- als auch bei Laborstudien ist der Gewinn von Informationen über den physiologischen Zustand der Monitor- (passiv oder aktiv) und Testorganismen, um Einflüsse von chemischen Stressoren nachweisen zu können, von zentraler Bedeutung. Dabei können Techniken mit spezifischen Biomarkern eingesetzt werden (Nogueira et al. 2010). In der

Ökotoxikologie sind Biomarker definiert als biologische Veränderungen von Organismen (von der molekularen über die zelluläre und physiologische Ebene bis hin zu Verhaltensänderungen), die durch Exposition gegenüber Chemikalien verursacht werden (Peakall 1994). Dazu zählen zum Beispiel: Verminderte Integrität von DNA und Membranen, Induktion von Stressproteinen und Biotransformationsenzymen, ultrastrukturelle Veränderungen von Zellen, immunologische Effekte usw. Um die Reaktionen der Organismen zu detektieren und zu quantifizieren ist eine Reihe von Biomarkertechniken nötig. Dabei sollte aber berücksichtigt werden, dass mit Hilfe von Biomarkern meistens nur in eingeschränktem Maße spezifische Toxizitäten abgebildet werden können. Daher ist die Etablierung einer ausgesuchten Biomarkerpalette notwendig, um ökologisch relevante Aussagen treffen zu können.

Inhalt und Ziele der Promotionsarbeit

Der Neckar kann in vielerlei Hinsicht als Modell für ein mitteleuropäisches Fließgewässer in einem dicht besiedelten und vielfach genutzten Einzugsgebiet betrachtet werden (Braunbeck et al. 2009). Im Einzugsgebiet des Neckars leben heute etwa 5 Millionen Menschen. Die intensive Nutzung als Brauchwasserressource und Wasserstraße sowie die Wasserkraftgewinnung und die zahlreichen Kläranlagen beeinflussen die ökologische Balance des Fließgewässers in hohem Maße (Ikone- Integrierende Konzeption Neckar-Einzugsgebiet 2003). Durch Fortschritte in der Reinigung kommunaler und industrieller Abwässer hat sich die Gewässergüte des Neckars in den letzten Jahrzehnten zwar deutlich verbessert (Regierungspräsidium Stuttgart. 2005), eine entsprechende Erholung der Fischpopulationen hat sich jedoch noch nicht eingestellt (Braunbeck et al. 2009).

Im vorliegenden Projekt wurde der ökologische und ökotoxikologische Zustand des Neckars charakterisiert. Die Untersuchungen wurden an mehreren Probestellen bei Tübingen (zwischen Hirschauer Wehr und Lustnauer Wehr) jeweils ober- und unterhalb potentieller Eintragsquellen für Spurenstoffe (Tübinger Kläranlage, Ammer, Steinlach) durchgeführt. Zu Beginn der Arbeiten wurde im Auftrag des Kreisfischereivereins Tübingen im Sommer 2011 eine Habitatkartierung in den später mit Biomarkern untersuchten Neckarabschnitten realisiert. Die Kartierung bezog sich auf zwei Aspekte: Zum einem wurden Strukturparameter, wie Fließgeschwindigkeit, Uferstruktur, Bodenbeschaffenheit, Gewässerbreite und Tiefe etc. untersucht, zum anderem wurde exemplarisch die Verteilung

der Taxa sowie die Biomasse wirbelloser Fischnährtiere bestimmt. Die weiteren Untersuchungen, die sowohl eine limnologische Charakterisierung der Probestellen (pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Härtegrad, Nährstoffe und Chlorid) als auch eine ökotoxikologische Bewertung toxischer Potentialen Wasser- und Sedimentproben umfassten, wurden sowohl 2011 als auch 2012 im Frühling und Herbst durchgeführt. Der Embryotest mit dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) sowie Analysen von Stressproteinen in geschlüpften Larven dienten hierbei dem Nachweis entwicklungstoxischer und proteotoxischer Wirkpotentiale.

Um tatsächliche Effekte bei Freilandorganismen zu zeigen, wurden an den Probestellen sowohl im Frühling als auch im Sommer/Herbst 2011 im Rahmen eines passiven Monitorings Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Flussflohkrebse (*Gammarus roeseli*) entnommen. Mit Hilfe unterschiedlicher Biomarker (Analyse des Stressproteins Hsp70, Mikrokern-Test, Histopathologie) konnten mögliche proteo- und genotoxische Wirkungen sowie generelle Schädigungen der Organismen auf verschiedenen biologischen Ebenen erfasst werden.

Obwohl die limnologischen Parameter sowie das Nahrungsangebot und die Strömungs- und Strukturbedingungen den Habitatansprüchen von Weißfischen entsprachen, konnten mittels Elektrofischerei nur sehr wenig Döbel, die primär untersucht werden sollten, unterhalb der Tübinger Kläranlage gefangen werden. Auffällig war auch das Fehlen weiterer Fischarten. Um dennoch Auswirkungen der Wasserqualität auf Fische zeigen zu können, wurde im Jahr 2012 zusätzlich eine Expositionsstudie (aktives Monitoring) durchgeführt. Hierbei wurden Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) in Edelstahl-Schwimmkäfigen ober- und unterhalb der Kläranlage für 10 bzw. 30 Tage exponiert. Die Gewebe der Forellen wurden auf verschiedene akkumulierende Umweltschadstoffe sowie auf eine Reihe von Biomarkern (Mikrokern-Test, Analyse des Stressproteins Hsp70, B-Esterase Assay, Histopathologie) hin untersucht.

Inhalte der vorliegenden Arbeit sind in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt.

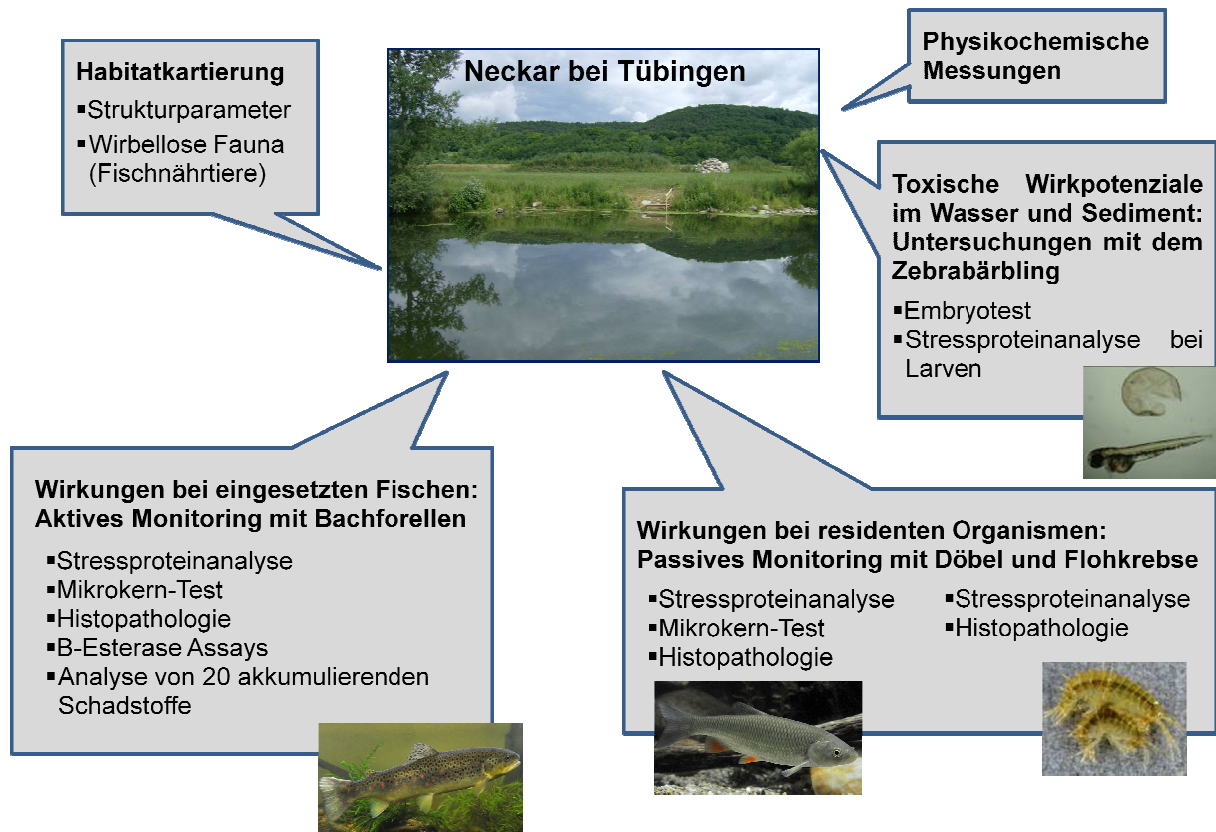


Abbildung 1: Graphische Zusammenfassung der Inhalte der Arbeit*.

*Bildquellen: Flussflohkrebs- Katharina Peschke; Döbel und Bachforelle- Lubomir Hlasek, www.hlasek.com

Durch die Promotionsarbeit werden zum einen spezifische/lokale Fragestellungen beantwortet, zum anderen werden auch allgemein/universal anwendbare Kenntnisse erworben.

Die Ziele der Promotionsarbeit sind:

- Der Gewinn von Informationen über fischrelevante Aspekte, wie Nahrungsangebot (Fischnährtiere, Makrozoobenthos) und physikochemische bzw. strukturelle Eigenschaftendes untersuchten Gewässerabschnitts (Neckar bei Tübingen).
- Die Identifizierung potenzieller Belastungsquellen und die Beurteilung ihrer Wirkung auf den Gesundheitszustand residenter und aktiv exponierter Monitoringorganismen anhand einer umfassenden Biomarkerpalette.

- Beurteilung der Auswirkungen der Kläranlage Tübingen auf die Fischgesundheit und die Erarbeitung möglicher Erklärungen für die geringen Abundanzen für Fische unterhalb der Kläranlage.
- Die Evaluierung und Beurteilung der Eignung und Effizienz (1) der untersuchten Fischen und Wirbellosen als Monitoringorganismen und (2) der angewandten Biomarker- und Monitoringmethoden als Tools in der Ökotoxikologie.

Methoden

Test- und Monitoringorganismen

Der Zebrabärbling

Zebrabärblinge (*Danio rerio*) sind ursprünglich in den Zuflüssen des Ganges in Indien, Bangladesch und Pakistan beheimatet. Taxonomisch gehören diese 5-6 cm großen Fische zur Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Der Zebrabärbling ist ein weit verbreiteter Modellorganismus, denn er ist leicht zu halten, verfügt über einen kurzen Generationszyklus (Geschlechtsreife nach 3-4 Monaten) und pflanzt sich über das ganze Jahr hinweg fort. Die Weibchen laichen große Mengen von Eiern ab, durch deren durchsichtige Hülle morphologische Missbildungen der Embryonen leicht erkennbar sind (Eawag 2008).

Der Flussflohkrebs

Flussflohkrebs (*Gammarus roeseli*) gehören der Familie Gammaridae an. Die Art besiedelt vor allem langsam fließende Flussunterläufe und gilt als relativ anspruchsvoll in Bezug auf ihr Habitat. Gammariden ernähren sich hauptsächlich von Falllaub und totem pflanzlichem Material. Ihre Fortpflanzungsphase dauert in der Regel von April bis Spätherbst, die Weibchen können bis zu sechs Bruten pro Saison austragen. Die hohe Fortpflanzungskapazität spiegelt sich auch in hohen Individuendichten wieder, daher sind Flohkrebse als Fischnährtiere von großer ökologischer Relevanz (Pöckl 1993).

Der Döbel

Der Döbel (*Leuciscus cephalus*) ist eine robuste und anpassungsfähige Fischart aus der Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Er besiedelt Fließgewässer, Grabensysteme und stehende Gewässer aller Art. Die Fischart ernährt sich überwiegend von Wirbellosen und Anflugsnahrung, aber auch von Pflanzenteilen und Plankton. Döbel werden mit ca. 3 Jahren geschlechtsreif, die Laichzeit dauert in der Regel von April bis Juni. Die Länge adulter Tiere kann 50 cm überschreiten (Dußling and Berg 2001).

Die Bachforelle

Die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) gehört zur Familie der Lachsfische (Salmonidae). Diese Fischart ist äußerst empfindlich gegen Gewässerverunreinigungen und benötigt zwingend sauberes und sauerstoffreiches Wasser. Die Bachforelle ernährt sich hauptsächlich von Wirbellosen, einige Individuen spezialisieren sich jedoch auch auf kleine Fische. Die durchschnittliche Länge der Bachforelle beträgt ca. 20-35 cm. Ihre Laichzeit dauert von Oktober bis Januar (Gerstmeier and Romig 1998).

Freilandtechniken

Habitatkartierung am Neckar

Die Kartierung des Neckars wurde im Juni- Juli 2011, zwischen dem Hirschauer Wehr und dem Lustnauer Wehr bei Tübingen durchgeführt. Die kartierte Strecke war ungefähr 10 km lang und wurde in 6 Bereiche unterteilt (Abb. 2). Die untersuchten Fließbereiche sind durch schnell fließendes, die Staubereiche durch (nahezu) stehendes Wasser charakterisiert, der Übergang zwischen diesen beiden Bereichen wird als Übergangsbereich bezeichnet.

Die Strukturkartierung erfolgte angelehnt an Böttger (2003). Dabei wurden Werte für Temperatur, Tiefe, Breite und Fließgeschwindigkeit, sowie Einläufe, Einleitungen, Verzweigungen, Bodenstruktur, Wasserpflanzen, Uferstruktur, Ufervegetation, Umgebung, Fischwanderhindernisse und weitere fischrelevante Aspekte aufgenommen.

An allen sechs Gewässerabschnitten wurden an mehreren repräsentativen Stellen mit Hilfe eines „Squarefoot-Samplers“ Wirbellose entnommen und in 70% Ethanol konserviert. Im Labor erfolgte anschließend die Bestimmung der Tiere bis zur Ordnung. Alle Organismen, die

derselben Ordnung angehörten, wurden gezählt, getrocknet und gewogen, um die Gesamtmasse und die prozentualen Masseanteile der Ordnungen in der Probe zu beurteilen.

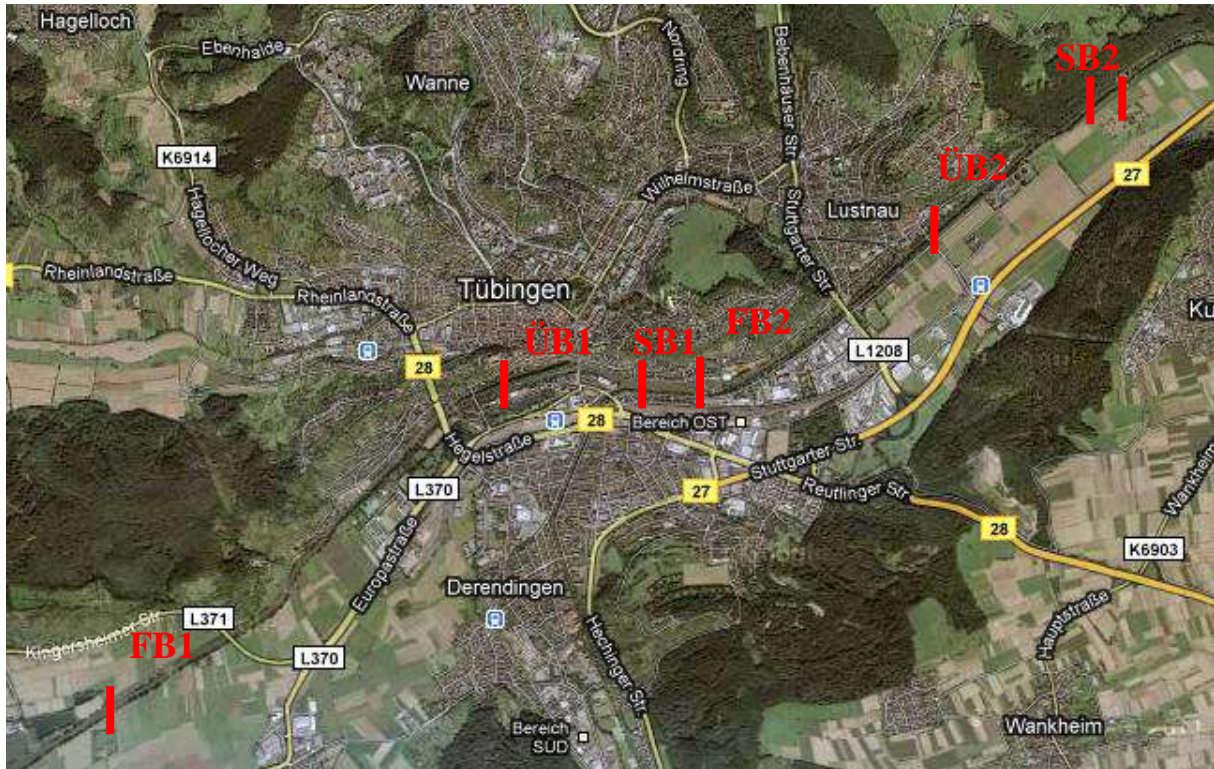


Abbildung 2: Die kartierten Gewässerabschnitte des Neckars: 1- Fließbereich unterhalb Hirschauer Wehr (FB1), 2- Übergangsbereich nach Hirschauer Wehr (ÜB1), 3- Staubereich bei Wehr Brückenstraße (SB1), 4- Fließbereich unterhalb Wehr Brückenstraße (FB2), 5- Übergangsbereich vor Lustnauer Wehr (ÜB2), 6- Staubereich vor Lustnauer Wehr (SB2)*.

*Bildquelle: GoogleMaps

Probestellen des ökotoxikologischen Umweltmonitorings

Entlang des Neckars wurden vier Probestellen zwischen Tübingen-Hirschau und Tübingen–Lustnau ober- und unterhalb der Tübinger Kläranlage (Probestellen 1 und 2) sowie ober- und unterhalb des Einlaufs der Ammer (Probestellen 3 und 4) für das aktive und passive Umweltmonitoring ausgewählt (Abb. 3). Die Probestellen 1, 2, und 3 liegen in dem kartierten Bereich.

Die Tübinger Kläranlage ist mit einer konventionellen Abwasserreinigungstechnologie ausgestattet. Sie verfügt über keine zusätzlichen Ausbaustufen, wie beispielsweise Ozonierung oder Aktivkohlefilterung. Neben der Kläranlage stellt die Ammer, ein Zufluss des

Neckars, eine weitere mögliche Belastungsquelle dar. Vor einigen Jahren wiesen Studien auf eine starke Belastung der Ammer mit polychlorierten Biphenylen (PCBs) hin (Beisswenger 2010). Die Steinlach, ein weiterer Zufluss des Neckars, der zwischen den Probestellen 3 und 4 einmündet, kann als eher unbelastetes Fließgewässer betrachtet werden (Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg 2012). Generell kann jedoch ein Eintrag von Spurenstoffen, der bislang eher weniger untersucht wurde, nicht ausgeschlossen werden, da an die Steinlach z.B. die Kläranlage Steinlach-Wiesatz oberhalb von Tübingen angeschlossen ist, durch die Stoffeinträge erfolgen könnten.



Abbildung 3: Probestellen am Neckar. PS1- unterhalb der Kläranlage Tübingen; PS2- oberhalb der Kläranlage Tübingen, unterhalb des Ammer-Einlaufs; PS3- oberhalb des Ammer-Einlaufs; PS4- Referenzstelle außerhalb Tübingens, Richtung Hirschau*.

*Quelle: OpenStreetMap

Messungen physikochemischer Parameter

Um die physikochemischen Grundverhältnisse der Probestellen zu beurteilen, wurden im Frühling und Herbst 2011-2012 vor Ort diverse limnologische Parameter wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit sowie der Gehalt an Nährstoffen und Chlorid gemessen. Bei dieser Gelegenheit wurden ebenfalls Wasser- und Sedimentproben entnommen. Im Jahr 2011 wurden PS1, PS3 und PS4, im Jahr 2012 alle vier Probestellen beprobt. Diese wurden im Labor mit dem Fischembryotest, der mit Eiern des Zebraäbrlings durchgeführt wird, untersucht.

Passives Umweltmonitoring und Probenahmen

An den Probestellen 1,2,3, und 4 (siehe Abb. 3) wurden im Frühling (Mai) und Sommer (Juli) 2011 in Kooperation mit dem Kreisfischereiverein Tübingen mittels Elektrofischerei Döbel entnommen. Laut Projektplan sollten an jeder Probestelle mindestens 10 Döbel gefangen werden. Es ergaben sich aber deutlich geringere Fangzahlen als erwartet. Die Fische wurden mit Tricaine-Methansulfonat betäubt und mittels Genickschnitt getötet. Für die spätere Durchführung des Mikrokern-Tests mit Erythrozyten wurde mit einer Pipette unmittelbar nach dem Genickschnitt Blut entnommen, mit Hilfe eines Deckglases auf Objektträger aufgetragen und in reinem Methanol fixiert. Parallel dazu wurden Gewebeproben für histopathologische Untersuchungen und für die Stressproteinanalysen aus Kieme, Leber, Niere und Gonade entnommen und in Glutardialdehyd fixiert (Histopathologie) bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren (Stressproteinanalyse).

Im Frühling (Mai) und Herbst (November) 2011 wurden zusätzlich an allen vier Probestellen 20 Flussflohkrebse für histopathologische Untersuchungen gesammelt, dekapitiert und sofort in Glutardialdehyd fixiert. Für die Analyse des Stressproteins Hsp70 wurden an allen Probestellen weitere 20 Individuen gesammelt. Diese wurden der Länge nach gemessen und in flüssigem Stickstoff konserviert.

Aktives Umweltmonitoring und Probenahmen

Im Rahmen des aktiven Monitorings wurden jeweils 30 Bachforellen (18 Monate alt) in durchströmbaren Edelstahl-Schwimmkäfigen (Abb. 4) unterhalb und oberhalb der Kläranlage Tübingen (Probestellen 1 und 2, siehe Abb. 3) für 10 bzw. 30 Tage exponiert. Die Tiere wurden alle zwei Tage *ad libitum* mit Forell pellets gefüttert, zu diesen Zeitpunkten wurde ebenfalls die Mortalität notiert. Als Referenz wurden zusätzlich 15 unbelastete Bachforellen aus der Fischzucht Lohmühle in Alpirsbach untersucht.

Es wurden nach 10 Tagen 12 Forellen unterhalb und 14 oberhalb der Kläranlage, nach 30 Tagen die restlichen überlebenden Bachforellen (9 unterhalb und 10 oberhalb der Kläranlage) beprobt. Hierzu wurden sie mit Tricaine-Methansulfonat betäubt und durch Genickschnitt getötet. Für den Mikrokern-Test, Histopathologie und Stressproteinanalyse wurden die Proben auf die gleiche Weise entnommen wie im Abschnitt „Passiven Monitoring“ beschrieben. Zusätzlich wurde das Gehirn der Fische für den B-Esterase Assay herauspräpariert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Für chemisch-analytische Nachweise von Spurenstoffen wurden die Restgewebe (Muskeln und innere Organe) der Bachforellen gekühlt (bei 4 °C) ins Labor transportiert und bei -80 °C gelagert. Die chemischen Analysen wurden im Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart (Arbeitsgruppe von Dr. Bertram Kuch) durchgeführt. Dabei wurden 20 akkumulierende Umweltschadstoffe, darunter 16 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), DDE, das Desinfektionsmittelabbauprodukt Methyltriclosan sowie zwei synthetische Duftstoffe, Galaxolide und Tolanide, untersucht.

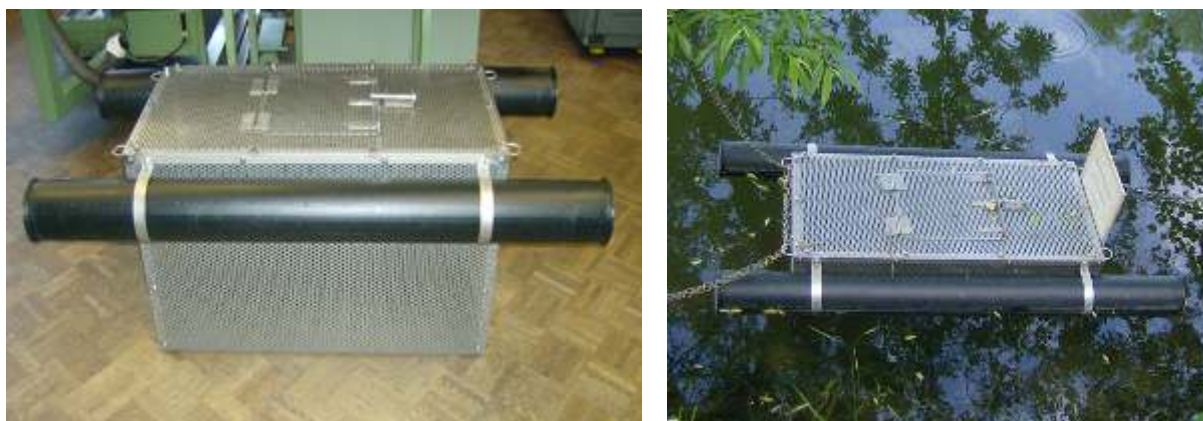


Abbildung 4: Durchströmbarer Edelstahl-Schwimmkäfig, der im aktiven Monitoring eingesetzt wurde.

Labortechniken

Der Fischembryotest mit Eiern des Zebraäbrblings

Da die ersten 14 Tage eine der empfindlichsten Phasen im Lebenszyklus des Zebraäbrblings darstellen, kann durch den Fischembryotest (FET) beurteilt werden, ob Schadstoffe oder komplexe Umweltproben die Ontogenese und das Überleben der Embryonen und Larven beeinflussen (Nagel 2002). Im vorliegenden Fall wurden hierzu die frisch gelegten Fischeier in Petrischalen überführt und in einem Wärmeschrank gegenüber Neckarsediment, das mit Oberflächenwasser überschichtet wurde, für 120 Stunden exponiert. Als Negativkontrolle diente Kunstwasser (ISO 1996). Die physiologischen Effekte der Schadstoffe im Embryo wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops zu festgelegten Zeitpunkten nach der Befruchtung beobachtet und notiert. Während des Tests wurden diverse letale (Koagulation, nicht ausgebildete Somiten, fehlender Herzschlag und nicht abgelöster Schwanz) und subletale (fehlende Spontanbewegung, deformierter Kopf oder Somiten, generelle Missbildung oder Unterentwicklung, Störungen des Herzschlags bzw. Blutkreislaufsystems und Ödeme) Endpunkte erfasst. (Nagel 2002). Der Schlupf der Tiere wurde ebenfalls registriert.

Histopathologie

Mit Hilfe histopathologischer Untersuchung ausgewählter Organe ist es möglich, die durch Belastung verursachten strukturellen und funktionellen Veränderungen auf Organebene bzw. auf zellulärer Ebene zu erforschen (Wester et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeproben wie folgt behandelt: Nach vollzogener Fixierung folgte bei Kieme und Niere der Fische sowie bei den Gammariden ein Entkalkungsschritt, danach wurden die Proben in Paraffin (Fischgewebe) bzw. Kunststoff (Gammariden) eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom Schnitte von 3-5 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden im folgenden Schritt mit Hämatoxylin-Eosin, bzw. Richardson-Blau oder Alcianblau-PAS (Periodic Acid Schiff) angefärbt. Hierdurch ist es möglich, verschiedene zelluläre Bestandteile selektiv darzustellen bzw. zu differenzieren (Lammer 2005). Die Bewertung der Gewebeschnitte erfolgte im Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 2) anhand einer mehrstufigen Skala, wobei zelluläre wie auch entzündliche Veränderungen, Nekrosen, der Zustand der Kapillaren, das quantitative Verhältnis der im Organ vorkommenden Zelltypen, Vakuolen im Zytoplasma, Ablösung von Epithelien usw. betrachtet wurden. Auch

Veränderungen der Gonaden, die Rückschlüsse auf endokrine Wirkungen geben können, wurden beurteilt.

Der Mikrokern-Test mit Fisch-Erythrozyten

Mikrokerne sind DNA-Fragmente, die während der Zellteilung durch diverse Fehlfunktionen nicht in die Tochterzellen transportiert werden, sondern im Cytoplasma verbleiben. Auf diese Weise können genotoxische Einwirkungen identifiziert werden. (Al-Sabti and Metcalfe 1995). Die zellkernhaltigen Erythrozyten von Fischen können aufgrund ihrer großen Anzahl sowie ihrer guten Anfärbbarkeit auch in kleinen Blutvolumina für ökotoxikologische Untersuchungen verwendet werden (Schnurstein and Braunbeck 2001). Die Blutaussstriche wurden in der vorliegenden Studie vor Ort im Freiland in Methanol fixiert. Im Labor erfolgte die Färbung mit Giemsa Lösung. Auf diese Weise werden die Erythrozyten blau gefärbt und der Kern wird wesentlich stärker hervorgehoben als das umgebende Zytoplasma. Dadurch sind Mikrokerne neben dem normalen Zellkern relativ einfach zu erkennen. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 2).

Analyse des Stressproteins Hsp70

Hitzeschockproteine (auch Stressproteine genannt) haben eine hohe Bedeutung für das Überleben von Zellen und Organismen (Edington et al. 1989), da sie bei der korrekten Faltung anderer Proteine helfen und sie vor Schädigungen schützen. Sie werden nach Molekulargewicht in Familien eingeteilt. Eine wichtige Familie stellt die Hsp70-Familie dar. Die meisten Stressproteine in dieser Familie werden kontinuierlich synthetisiert, ihre Konzentration kann jedoch bei Belastung oder unter extremen Bedingungen zunehmen. Dadurch ist es möglich, Stressreaktionen von Lebewesen nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden Stressproteine nach der von Köhler et al. (1999) beschriebenen Methode untersucht. Hierzu wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebe in einem Extraktionsgemisch aus Puffer und Proteasehemmer mechanisch homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 20.000 g wurden die Homogenate 1:2 mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und erhitzt. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (1976) bestimmt und die Proteine wurden in Acrylamid-Minigelen mittels Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden sie durch einen Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die Filter mit

einem spezifischen, gegen Hsp70 gerichteten Antikörper inkubiert und danach über einen zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper und einer anschließenden Enzymreaktion gefärbt. Auf der Basis densitometrischer Messungen wurde die Intensität der Proteinbanden quantifiziert.

B-Esterase Assay

Acetylcholinesterasen (AChE) und Carboxylesterasen (CbE) sind Enzyme der Gruppe der B-Esterasen, die beide durch Organophosphate und Carbamate gehemmt werden können (Laguerre et al. 2009). AChE ist für die Hydrolyse des Neurotransmitters Acetylcholin verantwortlich (Fulton and Key 2001), während verschiedene Isoenzyme der CbE eine Rolle im Metabolismus und bei der Detoxifikation verschiedener Umweltchemikalien, wie z.B. Arznei- und Pflanzenschutzmittel spielen (Wheelock et al. 2008). Durch die Messung der Aktivität der B-Esterasen in den Geweben können Rückschlüsse über allgemein toxische sowie neurotoxische Wirkungen gezogen werden. Für die Assays wurden die in Stickstoff gefrorenen Gehirnproben der Bachforellen in einer Extraktionslösung (enthält Puffer und Protease-Inhibitor-Cocktail) mechanisch homogenisiert und anschließend bei 20.000 g zentrifugiert. Der Gesamtproteingehalt der Homogenate wurde nach Lowry et al. (1951), modifiziert durch Markwell et al. (1978), bestimmt. Im Anschluss wurde die AChE-Aktivität nach Zugabe von 5,5-Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB) als Substrat spektrophotometrisch gemessen. Die Aktivität der beiden CbE-Isoenzyme wurde in ähnlicher Weise, durch die Zugabe von 4-Nitrophenyl Acetat (4-NPA) bzw. 4-Nitrophenyl Valerat (4-NPV) als Substraten photometrisch bestimmt

Ergebnisse

Kapitel 1: Vincze K, Scheil V, Triebkorn R (2011): Kartierung des Neckars im Umkreis von Tübingen. Als Ergebnisbericht dem Regierungspräsidium Tübingen und dem Kreisfischereiverein Tübingen vorgelegt, August 2011

Im ersten Kapitel der Arbeit werden verschiedene Gewässerabschnitte im Neckar bei Tübingen strukturell sowie auf der Basis der Erhebung von Abundanzen, Diversität und Biomasse von Makrozoobenthosorganismen hinsichtlich ihrer Eignung als Fischhabitate überprüft. Die Untersuchungen wurden im Auftrag des Kreisfischereivereins Tübingen zwischen dem Hirschauer und Lustnauer Wehr auf einer Strecke von ca. 12 km vorgenommen.

Von den sechs untersuchten Neckarabschnitten erwiesen sich die zwei Fließbereiche FB1 und FB2 (hier liegen die Probestellen PS4 und PS3) als geeignetste Lebensräume für junge und adulte Fische. Hier befinden sich zahlreiche naturnahe Stellen, und die Abschnitte verfügen über eine relativ vielfältige Boden- und Strukturbeschaffenheit. Zusätzlich kommen Wasserpflanzen nahezu entlang der ganzen Strecke vor. Das Nahrungsangebot für Fische an wirbellosen Tieren war divers (Egel, Wenigborster, Wasserasseln, Flohkrebse, Käfer, Zweiflüglerlarven, Steinfliegen, Köcherfliegen, Eintagsfliegen) und reichlich.

Der Übergangsbereich und der Staubereich oberhalb des Wehrs Brückenstraße (ÜB1 und SB1) weisen überwiegend ein Bodengestalt aus feinkörnigem Material und Steinblöcken auf. Es kommt auch mit Algen bewachsener, steiniger Untergrund vor. Die langsam fließenden Abschnitte dienen als gute Jungfischhabitate. Fischnährtiere traten im Staubereich in hoher Diversität, aber mit vergleichsweise geringem Trockengewicht auf. Im Übergangsbereich kamen weniger Wirbellosenordnungen vor, diese weisen jedoch ein relativ hohes Trockengewicht auf.

Bei dem Übergangsbereich vor dem Lustnauer Wehr (ÜB2, entspricht PS2) ist die Uferstruktur und das Sediment nur mäßig variabel. Die Abundanz an Wirbellosen war hoch, die Artenvielfalt bzw. Diversität jedoch relativ gering.

Der Lebensraum Staubereich vor dem Lustnauer Wehr (SB2) weist eine sehr geringe Bodensubstrat- und Tiefenvarianz auf. Unterwasserpflanzen sind kaum vorhanden und das Wehr erschwert das Passieren von Fischen. Fischnährtiere kamen mit mittlerer Biomasse vor,

die Diversität war jedoch vergleichsweise gering. Dieser Gewässerabschnitt ist als stark beeinträchtigt zu bezeichnen und bietet kein geeignetes Habitat für anspruchsvollere Fische.

Die Ergebnisse der Habitatkartierung sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Habitatkartierung und fischrelevante Aspekte.

Abschnitt	Struktureigenschaften	Makrozoobenthos	Eignung als Jung/Laichfischhabitat
Fließbereich 1 (PS4)	naturnah, vielfältig, schnell fließend	divers und reichlich	sowohl für Jung- als auch für Laichfische gut geeignet
Übergangsbereich 1	niedrige Varianz, mittlere Fließgeschwindigkeit	niedrige Artenvielfalt jedoch hohe Abundanz	eher für Jungfische geeignet
Staubereich 1	anthropogen geprägt, mäßig variabel, langsam fließend	hohe Diversität und niedrige Masse	eher für Jungfische geeignet
Fließbereich 2 (PS3)	naturnah, vielfältig, schnell fließend	divers und reichlich	sowohl für Jung- als auch für Laichfische geeignet
Übergangsbereich 2 (PS2)	mäßig variabel, mittlere Fließgeschwindigkeit	hohe Abundanz und niedrige Artenvielfalt	gut geeignet für Jungfische, mittel geeignet für Laichfische
Staubereich 2	stark beeinträchtigt, sehr geringe Varianz, langsam fließend	niedrige Diversität und Masse	eher ungeeignet für Jung- und Laichfische

Kapitel 2: Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler H-R, Tribskorn R (2014): Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13

Im zweiten Kapitel der Arbeit liegt der Fokus auf der Ermittlung physikochemischer Basisparameter sowie embryo- und proteotoxischer Wirkpotentiale in Wasser- und Sedimentproben des Neckars im Frühling und Herbst 2011-2012. Hierzu wurden entlang des Flussverlaufs vier Probestellen ober- und unterhalb der Tübinger Kläranlage sowie ober- und unterhalb des Einlaufs der Ammer untersucht.

Generell wurden bei allen Neckarabschnitten gute Sauerstoff-, pH- und Härteverhältnisse detektiert. Gemäß der chemischen Gewässerklassifikation nach UBA-LAWA (Federal Environmental Agency 2013) entsprachen die Ammonium-Werte "anthropogen unbelasteten" Bedingungen, während anhand der Nitrat-N-Werte überwiegend eine "deutliche Belastung" und hinsichtlich der Nitrit-N-Werte eine "geringe Belastung" vorlag. Auffällig waren die hohen Chlorid-Werte unterhalb der Tübinger Kläranlage (PS1) und die extrem hohen Ortho-Phosphat-P-Level (im Mai 2011) an der Referenzstelle in Hirschau (PS4) sowie oberhalb des Ammer-Einlaufs (PS3).

Die einzelnen Probestellen zeigten starke saisonale Schwankungen bezüglich ihrer embryo- und proteotoxischen Potentiale. Die Wasser- und Sedimentproben des Neckars riefen vielfältige Effekte während der Entwicklung der Zebrabärblingsembryonen (*Danio rerio*) hervor. Zu den beobachteten Entwicklungsdefiziten zählen eine modifizierte Herzschlagfrequenz, Bildung von Ödemen, schwache Pigmentierung sowie Schwanz- und Augendeformationen. Zudem traten oft Entwicklungszögerungen auf. Ebenfalls konnten sowohl Erholungseffekte (wie z.B. im Mai 2011) als auch ein abrupter Mortalitätsanstieg nach dem Schlupf (wie z.B. im September 2012) beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle wurde an Probestelle 4 im Jahr 2011 und an allen Probestellen im September 2012 eine signifikant erhöhte Mortalität detektiert. Zusätzlich konnte eine verringerte Schlupfrate an den Probestellen 1 (Mai 2011), 2 (oberhalb der Tübinger Kläranlage, unterhalb des Ammer-Einlaufs, (Mai und September 2012) und 4 (Mai und September 2011 und 2012) ermittelt werden.

Die Analyse des Stressproteins Hsp70 in Zebraabärblingslarven lieferte Hinweise auf proteotoxische Wirkungen an PS1 (Mai 2011 und 2012), PS2 (September 2012) und PS3 (Mai 2012).

Die Schwankungen innerhalb der analysierten physikochemischen Parameter und teratogenen bzw. proteotoxischen Effektpotentiale können durch die variierenden Stoffeinträge z.B. aus der Landwirtschaft, über Regenüberlaufbecken und Kläranlagen sowie durch die wechselnden Witterungsbedingungen erklärt werden.

Die Ergebnisse des Embryotests und der limnologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des Embryotests und der limnologischen Untersuchungen.

Probe -stelle	Embryotest und Stressproteinanalyse beim Zebraabärbling				Anmerkungen Limnologie
	Frühling 2011	Herbst 2011	Frühling 2012	Herbst 2012	
PS1	niedrige Schlupfrate, proteotoxische Effekte	keine Effekte	proteotoxische Effekte	proteotoxische Effekte, erhöhte Mortalität	erhöhte Chloridwerte
PS2	keine Probenahme*	keine Probenahme*	niedrige Schlupfrate	erhöhte Mortalität niedrige Schlupfrate, proteotoxische Effekte	keine Anmerkungen
PS3	keine Effekte	keine Effekte	proteotoxische Effekte	erhöhte Mortalität	hohes Phosphat-Level (Frühling 2011)
PS4	erhöhte Mortalität, niedrige Schlupfrate	erhöhte Mortalität, niedrige Schlupfrate	niedrige Schlupfrate	erhöhte Mortalität, niedrige Schlupfrate	hohes Phosphat-Level (Frühling 2011)

*Im Jahr 2011 konnten aufgrund der hohen Wassertiefe an PS2 keine Proben entnommen werden.

**Kapitel 3: Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R: Charakterisierung des Gesundheitszustandes von residenten Fischen und Wirbellosen mit Hilfe von Biomarkern im Neckar bei Tübingen (Passives Umweltmonitoring).
*Unveröffentlichte Daten***

In diesem Kapitel der Arbeit wurde die Wasserqualität der in Kapitel 2 genannten vier Neckar-Abschnitten bei Tübingen im Jahr 2011 anhand des Gesundheitszustandes residenter Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Flussflohkrebse (*Gammarus roeseli*) beurteilt.

Untersuchungen mit Gammariden haben gezeigt, dass diese Tiere geeignete Indikatoren zur ökotoxikologischen Gewässercharakterisierung sind, da sie eine hohe Sensitivität und gut erkennbare physiologische Antworten auf eine Exposition gegenüber Umweltchemikalien zeigen. An allen Probestellen wurden mit Kratzern (*Pomphorhynchus laevis*, Acanthocephala) parasitierte Flussflohkrebse gefunden. Der Parasitenbefall stellt eine erhebliche Belastung für den Wirt dar, daher war der Gesundheitszustand parasitierter Flohkrebse generell schlecht. In der Mitteldarmdrüse, dem Entgiftungsorgan der Gammariden, waren an allen Probestellen sowohl im Frühling als auch im Herbst deutliche Effekte wie verstärkte Vakuolisierung und Ablösung des Mikrovillisaumes, deformierte Zellkerne, Karyolyse und Nekrose zu erkennen. Der Zustand der Mitteldarmdrüsen war im Frühling generell schlechter als im Herbst. In den weiblichen Gonaden, die Rückschlüsse auf endokrine Wirkungen geben können, traten im Frühling überwiegend spätvitellogene und reife Oozyten auf, während im Herbst zum Großteil früh- und spätvitellogene bzw. atretische (Ruhestadium) Oozyten beobachtet wurden. Bezüglich des Reifestadiums weiblicher Gonaden ergaben sich im Herbst signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen. Besonders auffällig war dabei die Probestelle 4 (Referenzstelle in Tübingen-Hirschau). Hier war der Anteil atretischer Eier die höchste. Intersex-Tiere, deren Auftreten weitere Hinweise auf die Präsenz endokrin wirksamer Substanzen liefern kann, wurden nicht gefunden. Die Analyse des Stressproteins Hsp70 in Flohkrebsen ergab weder signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Probestellen, noch saisonale Unterschiede zwischen Frühling und Herbst.

Im Mai und Juli ergaben die Probenahmen von Döbeln deutlich geringere Fangzahlen als vorgesehen. Nur an Probestelle 4 konnte eine für die statistische Auswertung ausreichende Anzahl an Fischen gefangen werden. Aus diesem Grund war ein Vergleich der einzelnen Probestellen hinsichtlich des Gesundheitszustandes residenter Döbel nicht möglich. Sowohl im Frühling als auch im Herbst wurde, ähnlich zu den Ergebnissen der Untersuchungen mit

Flohkrebsen, eine hohe Parasitierungsrate der Döbel mit Kratzern festgestellt. Die Ergebnisse des Mikrokern-Tests mit Fisch-Erythrozyten deuteten im Vergleich zu spontaner Mikrokernbildung auf eine leicht erhöhte Mikrokernanzahl hin. Die untersuchten Döbel wiesen starke Schädigungen in ihren Organen auf. In den Kiemen wurden anhand histopathologischer Untersuchungen Fusionen von Sekundärlamellen, Hyperplasien von Pflasterzellen, Hypertrophien und Hyperplasien von Schleimzellen sowie in einigen Fällen Nekrosen von Chloridzellen festgestellt. In den Lebern traten Entzündungsherde, Zellkern- Irregularitäten, Nekrosen und dilatierte Kapillaren auf. Zu Schädigungen der Nieren zählten Entzündungen, starke Vakuolisierung und teilweise Nekrosen in den Tubuli sowie Dilatierungen der Bowman-Kapsel. Generell befanden sich die Fische in der Reaktionsphase, im Frühling traten jedoch auch einige sehr geschädigte Individuen auf. Die Gonade der untersuchten Freilandfische war dagegen kompakt, es konnten keine Hinweise auf endokrine Einwirkungen beobachtet werden. An Probestelle 4 konnten saisonale und organspezifische Unterschiede ermittelt werden: Im Frühling wies das Ovar der Döbel reifere Eistadien auf als im Sommer, zudem zeigte die Kieme stärkere Schädigungen als die Leber und Niere. Harmonisierend mit den histopathologischen Daten ergaben die Resultate der Stressproteinanalyse der Nieren im Frühling einen höheren Hsp70-Level im Vergleich zu den Ergebnissen der Sommerprobenahme.

Die Ergebnisse des passiven Monitorings sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse des passiven Monitorings

Organismus	Probestelle			
	PS1	PS2	PS3	PS4
Flussflohkrebs	Parasitierung durch Kratzer, beschädigte Mitteldarmdrüse	Parasitierung durch Kratzer, beschädigte Mitteldarmdrüse	Parasitierung durch Kratzer, beschädigte Mitteldarmdrüse	Parasitierung durch Kratzer, beschädigte Mitteldarmdrüse, hoher Anteil atretischer Eier
Döbel	geringer Fanganzahl	geringer Fanganzahl	geringer Fanganzahl	Parasitierung durch Kratzer, leicht erhöhte Mikrokern, Leber, Kieme und Niere beschädigt, erhöhtes Hsp70-Level im Frühling

Kapitel 4: Vincze K, Scheil V, Kuch B, Köhler H-R, Triebkorn R (2015): Impact of wastewater on fish health: A case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research: 1-18*

Ziel der im vierten Kapitel enthaltenen Arbeiten war die Erfassung der Auswirkungen der Kläranlage Tübingen (am Neckar) auf die Fischgesundheit sowie die Bewertung der eingesetzten Monitoring- und Untersuchungsmethoden hinsichtlich deren Eignung zur ökotoxikologischen Gewässercharakterisierung. Hierzu wurden junge Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) ober- und unterhalb der Kläranlage (PS2 und PS1 im Rahmen des passives Monitorings) in Schwimmkäfigen exponiert. Ihr Gesundheitsstatus wurde mit Hilfe einer Biomarkerbatterie, kombiniert mit chemisch-analytischen Nachweisen bioakkumulierender Umweltchemikalien beurteilt.

Während der Exposition der Bachforellen war an beiden Probestellen eine deutliche Mortalität (nach 10 Tagen 20%, nach 30 Tagen 25% unterhalb der Kläranlage bzw. nach 10 Tagen 3,3%, nach 30 Tagen 33% oberhalb der Kläranlage) zu beobachten. Die untersuchten Biomarker lieferten ein differenziertes Bild:

Mit dem Mikrokern-Test, der mit Erythrozyten durchgeführt wurde, konnten keine genotoxischen Wirkungen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Mikrokernanzahl lag generell unter 0,4 % und es ergaben sich auch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionsgruppen. Histopathologische Untersuchungen ausgewählter Organe zeigten in den Kiemen Gewebeschädigungen, wie Hyperplasien und Hypertrophien von Epithelzellen und Schleimzellen sowie Epithel-Lifting. In den Lebern wurden Entzündungsherde, Zellkerndeformationen, verringerte Energiereserven, starke Vakuolisierungen und dilatierte Kapillaren festgestellt. Die Gewebeschädigungen der Nieren umfassten Entzündungen, starke Vakuolisierungen in den Tubuli sowie Erweiterungen und Nekrosen der Glomeruli. Der Zustand von Kieme und Niere unterschied sich signifikant zwischen den Referenz-Individuen der Forellenzucht und den für 30 Tage unterhalb der Kläranlage exponierten Bachforellen. Die Geschlechtsorgane der Fische wiesen keine Abnormalitäten auf und gaben keine Hinweise auf endokrine Wirkungen.

Die Stressproteinanalyse zeigte in der Kieme schon nach 10 Tagen, in Leber und Niere nach 30 Tagen einen signifikanten Anstieg des Hsp70-Levels an beiden Probestellen im Vergleich zur Kontrolle. Nach 30-tägiger Exposition war diese Reaktion in der Niere der unterhalb der

Kläranlage gehaltenen Fische stärker als in oberhalb exponierten Individuen. Die Aktivität der Carboxylesterase (mit NPV Substrat) war nach 10-tägiger Exposition nur bei Forellen, die unterhalb der Kläranlage exponiert waren, erniedrigt, während nach 30-tägigen Exposition dieses Phänomen in Forellen an beiden Probestellen beobachtet werden konnte.

Ergänzend zu den biologischen Daten wurden in den Geweben exponierter Bachforellen eine Reihe organischer Schadstoffe in µg/kg-Konzentrationen nachgewiesen. Darunter fielen 16 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Galaxolide (HHCB), Tolanide (AHTN) sowie Methyltriclosan (MTCS) und DDE. Nach 30-tägiger Exposition wurden bei 12 von 20 analysierten Substanzen höhere Konzentrationen gemessen als nach 10 Tagen. Unterhalb der Kläranlage konnten deutlich höhere Konzentrationen an synthetischen Duftstoffen (HHCB und AHTN), einem Desinfektionsmittelabbauprodukt (MTCS) und vier PAKs gemessen werden als oberhalb.

Am Beispiel des Neckars hat diese Studie sowohl auf biologischer als auch auf chemischer Ebene korrelierende Informationen über die möglichen Wirkungen kommunaler Abwässer auf die Fischgesundheit geliefert. Zudem wurde auch die Effektivität von Biomarkern und aktivem Monitoring evaluiert und diese als geeignete Methoden in der Ökotoxikologie bestätigt.

Die Ergebnisse des aktiven Monitorings sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des aktiven Monitorings

Untersuchungsmethode	Probestelle	
	PS1 unterhalb der KA	PS2 oberhalb der KA
Mortalität	20% (10 Tage), 25% (30 Tage)	3% (10 Tage), 33% (30 Tage)
Histologie	Schädigungen in der Kieme und Leber, Niere sehr stark beschädigt	beschädigte Kieme, Leber und Niere
Mikrokern Test	keine Unterschiede zur Kontrolle	keine Unterschiede zur Kontrolle
Stressprotein Hsp70	Erhöhtes Hsp70-Level in der Kieme und Leber, stark erhöhtes Level in der Niere	Erhöhtes Hsp70-Level in der Kieme, Leber und Niere
B-Esterase	starke CbE (NPV) Inhibition	CbE (NPV) Inhibition
Bioakkumulation organischer Schadstoffe	Erhöhte Konzentrationen an MTCS, synthetische Duftstoffe und 4 PAKs im Vergleich zur PS2	akkumulierende Schadstoffe in µg/kg-Konzentrationen

Diskussion

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, in dem Tübinger Neckarabschnitt fischrelevante Habitataspekte zu erfassen und durch eine komplexe Biomarkerpalette kombiniert mit chemisch analytischen Nachweisen Informationen zum Belastungsstatus von Fischen zu ermitteln. Zudem sollten sowohl die untersuchten Testorganismen als auch die eingesetzten Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität und Eignung für eine umfassende Gewässergütecharakterisierung evaluiert werden.

Struktureller und ökologischer Gütezustand der untersuchten Gewässerabschnitte am Neckar bei Tübingen: Fischrelevante Aspekte, mögliche Belastungsquellen und ihre Wirkungen auf aquatische Organismen

Es hat sich während der Habitatkartierung gezeigt, dass vor allem die Fließbereiche (Abschnitte bei PS4 und PS3) gute, naturnahe Lebensräume mit abwechslungsreicher Struktur und größerer Fischnährtiermasse und -diversität darstellen. In den anthropogen geprägtem Übergangsbereichen (PS2 lag beim zweiten Übergangsbereich) sowie beim ersten Staubereichen, war zwar im Vergleich zu den Fließbereichen eine geringere Artenvielfalt, jedoch eine vergleichsweise hohe Biomasse an wirbellosen Tieren zu sehen. Beide Bereiche bieten somit keine gänzlich schlechten Lebensbedingungen für die meisten Fischarten. Der Fließbereich nach dem Lustnauer Wehr (FB3), wo sich die Probestelle 1 und die Einlauf der Tübinger Kläranlage befindet, wurde im Rahmen des Auftrags durch den Kreisfischereiverein nicht kartiert. Bei allen Probenahmen war jedoch auffällig, dass in diesem Abschnitt des Neckars trotz naturnaher Umgebung und guter Strukturbedingungen nur wenige aquatische Wirbellosen und kaum Fische vorkommen. Dies wurde auch in Gesprächen mit Vertretern des lokalen Fischereivereins bestätigt. An den anderen drei Probestellen konnten Fische gefangen werden: An PS2 und PS3 ergaben sich nur geringe Fanganzahlen für Döbel, es wurden aber Individuen anderer Fischarten (Barbe, Aal, Hecht, Gründling usw.) gefangen. An PS4 wurden bei jeder Probenahme sowohl genügend Döbel als auch andere Fischarten gefangen.

Der Embryotest mit Eiern des Zebraärbblings und die Biomarkeruntersuchungen, die mit residenten und exponierten Organismen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass im gesamten untersuchten Neckarabschnitt (zwischen Tübingen-Lustnau und -Hirschau) eine vergleichbare Belastung vorhanden ist. An allen Probestellen konnten teratogene,

proteotoxische und allgemein toxische Effekte detektiert werden. Hinweise auf eindeutige genotoxische und endokrine Wirkungen wurden dagegen nicht gefunden.

Saisonale Schwankungen konnten mit Hilfe des Embryotests und durch limnologische Messungen erfasst werden. Diese stehen mit großer Wahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit den Witterungsbedingungen: Im Frühling 2011 und 2012 wies der Neckar einen leicht erniedrigten bis normalen Pegel auf, während im Herbst 2011 starke, im Herbst 2012 extrem starke Regenfälle auftraten. Diverse hydrologische Ereignisse können dabei zu unterschiedlich ausgeprägten toxischen Wirkungen von Wasser- und Sedimentproben führen, da Sediment bewegt und Schwebstoffe freigesetzt werden können. Bei starken Regenfällen steigt der Pegel an, dies kann in einer Remobilisation des Sediments und einer dadurch erhöhten Bioverfügbarkeit der Schadstoffe resultieren. Weiterhin ist mit run-off von landwirtschaftlichen und urbanen Flächen zu rechnen (Camacho-Muñoz et al. 2014; Gan et al. 2013; Hsu et al. 2007). Hinzu kommen Schadstoffeinträge über an das Gewässer angeschlossene Regenüberlaufbecken (VanLandeghem et al. 2012). Im Tübinger Bereich des Neckars kann zum Beispiel bei heftigen Regenfällen ungereinigtes Mischwasser (Ab- und Regenwasser) über Regenüberlaufbecken direkt in den Wasserkörper gelangen. Andererseits kann aber auch bei Trockenwetterabfluss im Niedrigwasserfall I die Schadstoffbelastung im Gewässer durch die geringere Verdünnung des Abwassers erhöht werden (Katip et al. 2012; Moliner-Martínez et al. 2013; Palma et al. 2010; Zhu et al. 2013).

In den untersuchten Abschnitten des Neckars stellt die Tübinger Kläranlage eine deutliche Belastungsquelle dar: An der Stelle unterhalb der Kläranlage (PS1) wurden oft erhöhte Chlorid- und Nitrat-N-Werte gemessen. Weiterhin wurden während des Embryotests im Frühling 2011 (niedrige Verdünnung von Abwasser) und Herbst 2012 (Einleitung von Mischwasser durch Regenüberlaufbecken) besonders starke Entwicklungsdefizite beobachtet. Parallel dazu wurden im Rahmen des passiven Monitorings starke Gewebeschädigungen in der Mitteldarmdrüse der Flussflohkrebse festgestellt. Weiterhin war die niedrige Abundanz residenter Fische in diesem Abschnitt auffällig. Anhand des aktiven Monitorings konnte gezeigt werden, dass über die Kläranlage bioakkumulierende Schadstoffe, wie Desinfektionsmittelreste, Duftstoffe, PAKs usw. in den Neckar gelangen, die negative Effekte (Proteotoxizität, B-Esterase-Inhibition, Gewebeschädigungen) in exponierten Fischen hervorrufen können und mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die Freilandfische einen Stressfaktor darstellen.

Sowohl das aktive als auch das passive Monitoring lieferten eindeutige Hinweise auf Belastungsfaktoren auch oberhalb der Tübinger Kläranlage bzw. unterhalb der Mündung der Ammer (PS2), die nicht mit dem Eintrag über die Kläranlage Tübingen, sondern mit Einträgen von z.B. Regenüberlaufbecken oder anderen Kläranlagen im Oberlauf des Neckars zusammenhängen können. Die ca. 22,5 km lange Ammer entspringt südwestlich von Herrenberg und fließt sowohl durch intensiv genutzte landwirtschaftliche Flächen als auch durch urbanisierte Gebiete, bevor sie in den Neckar mündet. Angeschlossen an dieses Gewässer sind zwei konventionelle kommunale Kläranlagen, die das geklärte Abwasser von 10.000 und 80.000 Einwohnerwerten in die Ammer leiten (Lange et al. 2015). Es ist bekannt, dass in der Ammer zahlreiche Umweltchemikalien, wie PAKs (100 µg/g im Sediment) (Liu et al. 2013) sowie synthetische Duftstoffe wie Galaxolide (0,26 g/L im Wasser) und Tolanide (0,06 g/L im Wasser) vorkommen (Lange et al. 2015). Diese Chemikalien konnten ebenfalls in den Geweben der unterhalb der Ammermündung exponierten Bachforellen im mittleren bzw. oberen µg/kg-Bereich nachgewiesen werden.

Im passiven Monitoring und im Rahmen des Embryotests wurden an der Probestelle in Tübingen-Hirschau (PS4) überraschend hohe proteotoxische, teratogene und allgemeintoxische Wirkungen ermittelt. Diese Stelle befindet sich außerhalb des Tübinger Stadtbereichs und es sind keine Punktquellen in direkter Nähe vorhanden. Jedoch wird ein Schadstoffeintrag durch die landwirtschaftliche Aktivität in der Umgebung vermutet. Als Beweis wurden im Frühling 2011 erhöhte Phosphat- und Nitrat-N-Werte sowie starke embryotoxische Effekte an dieser Stelle nachgewiesen (Verdacht auf Düngung). Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die Altlast einer ehemaligen Kläranlage, deren Einleitung sich in diesem Gewässerabschnitt befand, eine latente Belastungsquelle darstellt.

Die Ergebnisse sind schematisch in der Abbildung 5 dargestellt.

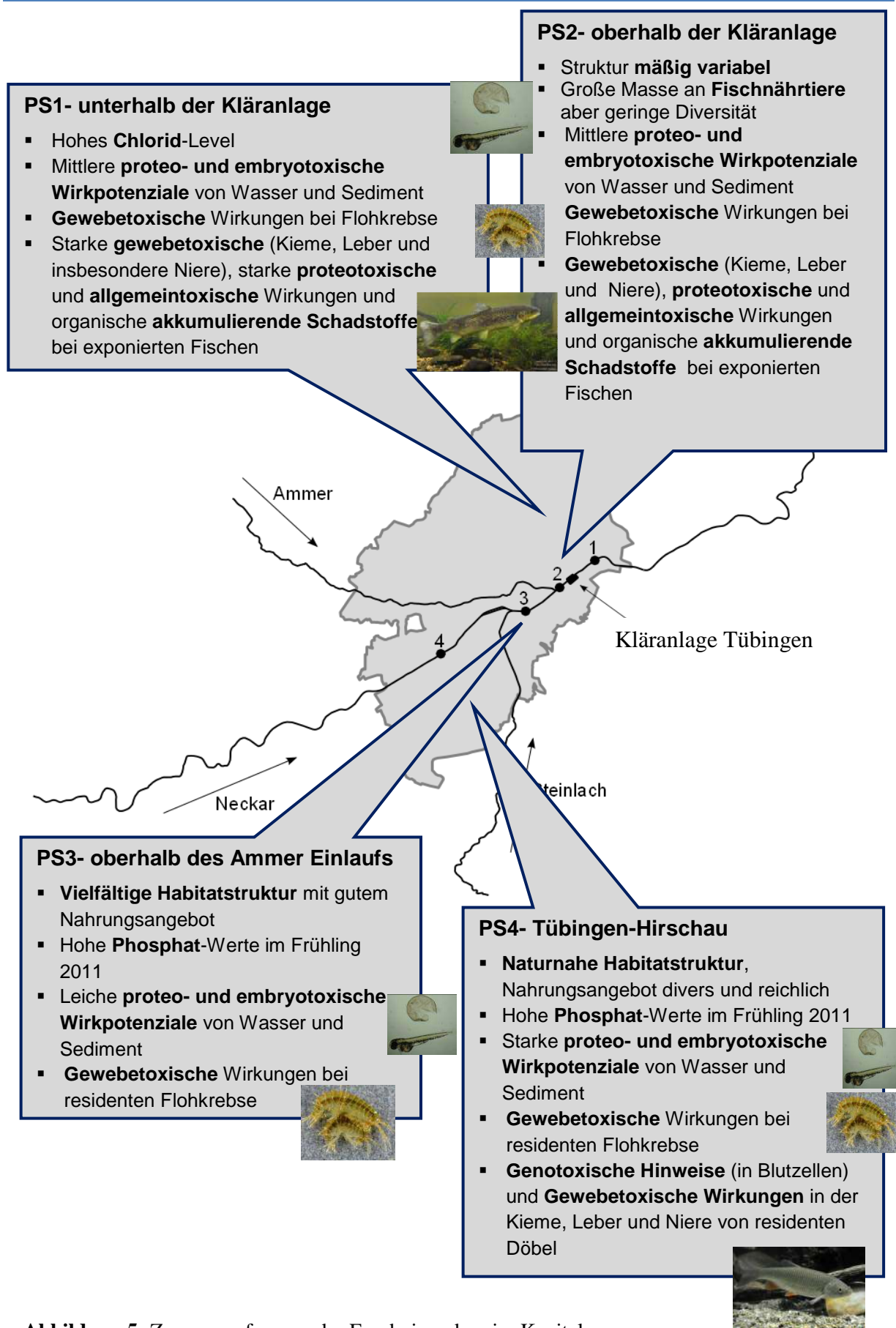


Abbildung 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der vier Kapitel.

Evaluierung und Vergleich der eingesetzten Freiland- und Labormethoden bzw. Test- und Monitororganismen als Tools zur Charakterisierung des Gesundheitszustandes von aquatischen Habitats

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Biomarker-Batterie ergänzt durch limnologische Messungen und Strukturhebungen eingesetzt, um den Gütezustand des Neckars bei Tübingen zu charakterisieren. Die Methoden erwiesen sich in der gewählten Kombination als äußerst effektive Werkzeuge, um relevante Aussagen über den ökologischen- und Belastungszustand des Neckars zu treffen, und um Schadstoff-quellen zu identifizieren. Die durchgeführten Biomarkerstudien (Histopathologie, Stressproteinanalyse, Mikrokern-Test, B-Esterase Assay) haben sich sehr gut ergänzt und bildeten diverse toxische Aspekte wie geno-, proteo-, neuro- und gewebetoxische Wirkungen sowie allgemeine Toxizität auf verschiedenen biologischen Ebenen ab.

Untersuchungen des Makrozoobenthos, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, werden oft ergänzend zur Strukturkartierung angewendet, um Rückschlüsse auf die organische Belastung, Strukturvielfalt und Strömungsvariabilität von Gewässer zu geben. Dabei werden verschiedene Indices (z.B. Saprobienindex) ermittelt (Lietz 2007). Toxische Wirkungen sind aber anhand solcher Untersuchungen nicht, bzw. schwer nachvollziehbar. Triebkorn et al. (2001) führten zum Beispiel bei unterschiedlich belasteten Abschnitte der Gewässersysteme Körsch und Aich/Krähenbach Abundanz- und Biomarkeruntersuchungen an Fischen durch, zusätzlich wurden physikalische-, chemische- und Strukturparameter der Probestellen und diverse biologische und biozönotische Attributen der Benthosfauna erfasst. Das Vorkommen und die Artzusammensetzung der Fische wurden im Großteil vom Gewässertyp, Fischwanderhindernisse und Belastungsstatus beeinflusst. Die diversen erfassten Bioindices der Makrozoobenthosgemeinschaften korrelierten mit den physikochemischen Parametern, wie Chloride-Level und Leitfähigkeit sowie mit den Biomarkerantworten bei Fischen (Böhmer et al. 2001). Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Makrozoobenthos-Indices errechnet wurden (die Bestimmung der Tiere erfolgte nur bis zum Ordnung), lieferte die Habitatkartierung ergänzend zu den Biomarkeruntersuchungen wertvolle Informationen (incl. fischrelevante Aspekte) über den ökologischen Status des Neckars bei Tübingen.

Der Fisch-Embryotest beruht auf diversen Endpunkten während der Ontogenese und ist sowohl für die Risikoabschätzung von Chemikalien (OECD TG 236) als auch für die Ermittlung von entwicklungstoxischen Potentialen komplexer Umweltproben, wie Wasser

und Sediment (z.B. (Hallare et al. 2005; Keiter et al. 2006) geeignet. Die vorliegende Arbeit hat dieses am Beispiel des Neckars bewiesen. Parallel zu unserer Studie am oberen Neckar untersuchten Hollert und Kollegen (2003) die embryotoxischen Effekte von Oberflächenwasser, nativen Wasser- und Sedimentproben sowie Sedimentextrakten des unteren Neckars mit Hilfe des Zebrafisch-Embryotests. Dabei wurden durch die Wasserproben kaum Entwicklungsdefizite verursacht und es konnte eine relativ hohe Bioverfügbarkeit partikelgebundener lipophiler Substanzen nachgewiesen werden. Der Belastungsgrad der einzelnen Probestellen war bei nativen Proben und Extrakten identisch, die Effektschwellen von nativen Wasser- und Sedimentproben waren jedoch deutlich höher als die der Sedimentextrakte.

Der Mikronukleus-Test, der mit zellkernhaltigen Fischerythrozyten durchgeführt wurde, stellt eine schnelle und kosteneffiziente Methode dar, um Erbmaterialschädigungen und Zellteilungsfehler zu identifizieren. Die Mikrokern-Daten der Erythrozyten von Döbeln des passiven Monitorings zeigten leicht erhöhte Werte im Vergleich zur spontanen Mikrokernbildung (Pavlica et al. 2011). In Erythrozyten von Bachforellen des aktiven Monitorings ergaben sich ebenfalls hohe Mikrokern-Anteile im Vergleich zu Forellen-Referenzdaten aus unbelasteten Gewässerabschnitten (Ayllón et al. 2000). Im Vergleich zu den Züchterkontrollen ließen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede nachweisen, obwohl Bachforellen bezüglich des Mikrokern-Tests zu den empfindlichsten europäischen Fischarten zählen (Rodriguez-Cea et al. 2003).

Histopathologische Veränderungen sind weitere, in der aquatischen Ökotoxikologie häufig eingesetzte strukturelle Biomarker, durch die chronische Effekte auch bei niedrigen Belastungsniveaus detektiert werden können (Wester et al. 2002). In der vorliegenden Studie konnten anhand histopathologischer Untersuchungen sowohl in Flohkrebse als auch in Fischen zahlreiche negative Effekte auf zellulärer Ebene sowie in Geweben und Organen gezeigt werden. Die einzelnen Organe der Monitororganismen reagierten unterschiedlich auf die Stress-Situation: Die Geschlechtsorgane weiblicher Gammariden zeigten sowohl saisonale als auch probestellenspezifische Unterschiede, während das Ausmaß der Schädigungen in der Mitteldarmdrüse zwischen den Gewässerabschnitten nicht variierte. In Döbeln des passiven Monitorings und Forellen des aktiven Monitorings wurden in der Kieme, Leber und Niere besonders starke Veränderungen festgestellt, während die Gonaden keine Schädigungen zeigten. Dies kann durch die Funktion und Lage der einzelnen Organe erklärt werden: Die

Kieme der Fische steht als respiratorisches Organ in direktem Kontakt mit der äußeren Umgebung (Amin et al. 1992). Von daher reagiert sie meistens sehr schnell und empfindlich auf die Präsenz von Umweltchemikalien (Yoo and Janz 2003), wie beispielsweise oberflächenaktive Substanzen, Säuren und Schadstoffpartikel (Pawert et al. 1998). Die Leber und Niere spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus sowie der Exkretion von Xenobiotika (Schwaiger et al. 1997; Livingstone 1998) und liegen im Körperinneren (Takashima and Hibiya 1995), was ggf. zu einer verzögerten oder schwächeren Stressantwort führen kann. Die männlichen und weiblichen Gonaden sind als Target-Organ für endokrine Disruptoren bekannt (Leino et al. 2005) und reagieren weniger stark auf allgemein-toxische Einwirkungen.

Die Ergebnisse der Analyse der Hitzeschockproteine Hsp70 deuteten in den Fischen des aktiven und passiven Monitorings auf saisonale und organspezifische Wirkungen sowie auf eine Abhängigkeit von der jeweiligen Expositionsdauer hin. In den Bachforellen wurden teilweise schon nach 10-tägiger Exposition proteotoxische Effekte detektiert. In Gammariden konnten jedoch anhand der Stressproteinanalyse keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen gezeigt werden. Veränderungen des Stressproteinlevels (Hsp70) indizieren proteotoxische Wirkungen, deren Ursachen vielfältig sein können. So können nicht nur Umweltchemikalien sondern auch jahreszeitlich spezifische Parameter wie Temperatur und Fortpflanzungszeit oder auch Parasitierung (Sures 2008) für den Hsp70-Level verantwortlich sein (Triebskorn 2012). Der Hsp70-Level in den Zellen kann nicht beliebig erhöht werden. Bei zu hoher Stressintensität wird die Proteinsynthese geschädigt und der Stressproteinlevel sinkt wieder ab (Destruktionsphase), wodurch sowohl im Kontrollzustand als auch unter starker Belastung niedrige Werte gemessen werden können (Eckwert et al. 1997). Aus diesem Grund ist es notwendig, diese Analysemethode mit weiteren Biomarkern (wie zum Beispiel Histopathologie, Enzym-Assays) zu kombinieren, um relevante und akkurate Aussagen über den Gesundheitszustand der Monitororganismen treffen zu können.

Die Enzyme Acetylcholinesterase und Carboxylesterase (beide zählen zu den B-Esterasen) sind weit verbreitete Expositionsbiomarker für Organophosphate und Carbamate (Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot 2000; Wheelock et al. 2008), ihre Inhibition konnte aber auch durch weitere Schadstoffe, wie zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Leticia and Gerardo 2008; Oliveira et al. 2012; Palanikumar et al. 2012) nachgewiesen werden. In Forellen des aktiven Monitorings zeigten die Messungen beider Enzyme mit NPA

als Substrat keine bzw. nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionsgruppen. Der Carboxylesterase-Assay mit NPV als Substrat ermittelte dagegen in den im Neckar exponierten Fischen eine klare Inhibition dieses Enzyms, teilweise schon nach 10-tägiger Exposition. Es ist bekannt, dass B-Esterasen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitorsubstanzen zeigen (Wogram et al. 2001). Organophosphate, Carbamate und bestimmte Xenobiotika weisen zum Beispiel eine höhere Affinität gegenüber Carboxylesterase-Isoenzymen auf als gegenüber Acetylcholinesterasen (Wheelock et al. 2008). Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, gleichzeitig mehrere B-Esterase Assays einzusetzen.

Im Rahmen des aktiven Monitorings wurden die Biomarkeruntersuchungen mit chemischen Analysen von 20 Spurenstoffen kombiniert. Die Ergebnisse dieser Analysen bestätigen die biologischen Daten und deuten auf eine Grundbelastung im Neckar in allen untersuchten Gewässerabschnitten hin. Zudem zeigen sie, dass über die Tübinger Kläranlage vermehrt Umweltschadstoffe in den Neckar eingetragen werden. Bedingt durch finanzielle Limits konnten chemische Analysen nur für ein kleines Stoffspektrum durchgeführt werden, so dass diese auch nur einen Bruchteil der im Neckar vorkommenden Schadstoffe widerspiegeln. Nicht-bioakkumulierende und leicht abbaubare Substanzen wurden nicht untersucht. Generell kann auf der Basis chemischer Analytik keine Aussage über die Wirkung der Stoffe gemacht werden. Dies gilt sowohl für die Einzelstoffe wie auch für Wirkungen von Mischungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können keine direkten Ursache-Wirkungs-Beziehungen hergestellt werden, da die Expositionsbedingungen in aquatischen Habitaten in der Regel äußerst komplex sind (Wester et al. 2002). Effekte können aus diesem Grunde nur über Plausibilitätskriterien mit den Expositionsdaten in Zusammenhang gebracht werden (Connon et al. 2012; Triebkorn et al. 2003). Daten, die zur Toxizität der nachgewiesenen Substanzen in Laborversuchen ermittelt wurden (Carlsson and Norrgren 2004; Logan 2007; Nicolas 1999; Reynaud and Deschaux 2006; Schnell et al. 2009; Simmons et al. 2010) sprechen plausibel dafür, dass die detektierten Xenobiotika den Gesundheitsstatus der Fische negativ beeinflusst haben.

Beide angewandten Monitoringmethoden deuteten auf starke Schädigungen in den Organismen hin. Die Ergebnisse haben sich gut ergänzt. Wie aber in der Einleitung bereits erwähnt wurde (Oikari 2006), sind zahlreiche Unterschiede zwischen den zwei Monitoring-Techniken und den damit untersuchten Lebewesen vorhanden. Die Käfigexposition von

Bachforellen erwies sich als eine äußerst effektive Monitoringmethode und bot die Gelegenheit, der Problematik der teilweise geringen Fangzahlen des passiven Monitorings auf den Grund zu gehen. Dadurch konnten jedoch nur die Konsequenzen einer kurz- bzw. mittelfristigen Belastung erfasst werden. Darüber hinaus ergab sich keine Möglichkeit, die genauen Auswirkungen der Käfig-Hälterung auf die Organismen zu untersuchen. Maier et al. (2015) führten wiederholt ähnliche Monitoringstudien mit Bachforellen (Alter, Herkunft und Hälterungsdichte identisch zur Exposition von Bachforellen im Neckar) am Bodenseezufluss Schussen durch, wobei dieselben Käfige verwendet wurden. In dieser aktiven Monitoringstudie trat lediglich eine minimale Mortalität der exponierten Tiere auf. Im Gegensatz dazu wurde im Neckar während des aktiven Monitorings eine deutliche Mortalität beobachtet, obwohl die physikochemischen Parameter die Ansprüche der Forellen erfüllt haben. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Käfig-Hälterung an sich keine bzw. lediglich eine geringe Stressquelle darstellt.

Generell erwiesen sich in der vorliegenden Studie sowohl Flohkrebse als auch Döbel und Forellen als sensitive Monitororganismen. Die Vergleichbarkeit der Wirbellosen- und Wirbeltier-Daten des Neckarprojekts ist relativ gut, sowohl in Bezug auf endokrine Potentiale als auch auf generelle Schädigungen. Fische bieten zwar im Vergleich zu Flohkrebsen mehr Untersuchungsmöglichkeiten und verfügen als Wirbeltiere über eine höhere Relevanz in der ökotoxikologischen Freilandforschung, in bestimmten Situationen ist jedoch ihre Exposition oder Entnahme nicht möglich. Hier bieten Studien mit Flohkrebsen, die von Frühling bis Ende Herbst in den Fließgewässern äußerst zahlreich vertreten sind, eine gute Alternative. Durch mehrere Studien wurde bereits nachgewiesen, dass neben Fischen diese Organismen ebenfalls empfindlich auf Schadstoffe reagieren können (Charles et al. 2014; Peschke et al. 2014; Schirling et al. 2006). Dennoch gibt es bislang erst wenige Studien, die den Gesundheitszustand dieser Tiere als Werkzeug zur Erfassung der Wasserqualität im Freiland nutzen.

Schlussfolgerungen

Durch die vorliegende Arbeit konnten anhand einer komplexen Freilandstudie am Neckar diverse Fragestellungen im Bereich der Ökotoxikologie beantwortet werden.

Das Neckarprojekt kann zum einen als Modellstudie betrachtet werden: Es konnte bestätigt werden, dass der Einsatz diverser Monitoring- und Biomarkermethoden ergänzt mit einer Habitatkartierung für die Charakterisierung aquatischer Lebensräume und die Identifizierung saisonaler und persistenter Eintragsquellen auf jeden Fall empfehlenswert ist. Hierbei ist zu betonen, dass ähnlich komplexe Monitoringprojekte eher selten sind. Ein aktuell laufendes großes Monitoringprojekt wird derzeit an der Schussen durchgeführt. Auch hier erwiesen sich die in der vorliegenden Arbeit genutzten Methoden als effiziente Werkzeuge für das Gewässermonitoring (Tribskorn R et al. 2013). Darüber hinaus kommt der vorliegenden Arbeit auch eine lokale Bedeutung zu: die Resultate sind sowohl für die örtlichen Fischer als auch für das Regierungspräsidium Tübingen (bezüglich Fischbesatzmaßnahmen, Eintragsminimierung durch Kläranlagen- und Regenüberlaufbeckenausbau) hochrelevant.

Literatur

- Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343:121-135.
- Amin AB, Mortensen L, Poppe T (1992) Histology atlas, normal structure of salmonids. Offset Nord AS, Norway.
- Ayllón F, Suciú R, Gephard S, Juanes F, Garcia-Vazquez E (2000) Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *salmo trutta*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 470 (2):169-176.
- Backhaus T, Faust M (2012) Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ Science and Technology* 46 (5):2564-2573.
- Bernet D, Schmidt H, Wahli T, Burkhardt-Holm P (2001) Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* l.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48 (2):140-147.
- Böhmer J, Zenker A, Ackermann B, Kappus B (2001) Macrozoobenthos communities and biocoenotic assessment of ecological status in relation to degree of human impact in small streams in southwest germany. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8 (3-4):407-419.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2):248-254.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P (2009) Fish populations under stress - the example of the lower neckar river (Fischpopulationen unter Stress – das Beispiel des unteren Neckars). *Environmental Sciences Europe (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung)* 21 (2):197-211.
- Camacho-Muñoz D, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2014) Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from seville (southern spain). *Science of The Total Environment* 468-469 (0):977-984.
- Carballo M, Aguayo S, de la Torre A, Muñoz MJ (2005) Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* l.) in a receiving rivers downstream of sewage treatment plants. *Science of The Total Environment* 341 (1-3):71-79.
- Carlsson G, Norrgren L (2004) Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Arch Environ Contam Toxicol* 46 (1):102-105.
- Charles J, Crini G, Degiorgi F, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM (2014) Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (l.) exposed to binary copper and nickel mixtures. *Environ Science and Pollution Research* 21 (2):1099-1111.
- Connon RE, Geist J, Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12 (9):12741-12771.
- Dußling U, Berg R (2001) Fische in Baden-württemberg. Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart.

- Eawag (2008) Zebrabärblinge stehen modell. Eawag News 64:4-7.
- Eckwert H, Alberti G, Kohler H-R (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* 6 (5):249-262.
- Edington BV, Whelan SA, Hightower LE (1989) Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: Additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *Journal of Cell Physiology* 139 (2):219-228.
- Eggen RI, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, Schweigert N (2004) Peer reviewed: Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 38 (3):58A-64A.
- European Chemicals Agency (ECHA) (2014) Registered substances. <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/registered-substances>. Accessed 16.11.2014.
- Federal Environmental Agency (2013) Chemical water quality classification, working group of the federal states on water issues (lawa). <http://www.umweltbundesamt.de/wasser-e/themen/fluesse-und-seen/fluesse/bewertung/chemische-gewaesserklassifikation.htm>. Accessed 10.05.2013.
- Fent K (2003) Ökotoxikologie. Georg Thieme Verlag.
- Fulton MH, Key PB (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (1):37-45.
- Gan W, Guo W, Mo J, He Y, Liu Y, Liu W, Liang Y, Yang X (2013) The occurrence of disinfection by-products in municipal drinking water in china's pearl river delta and a multipathway cancer risk assessment. *Science of The Total Environment* 447 (0):108-115.
- Gerstmeier R, Romig T (1998) Die Süßwasserfische Europas. Kosmos, Stuttgart.
- Grizzle JM, Horowitz SA, Strength DR (1988) Caged fish as monitors of pollution: Effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Journal of the American Water Resources Association* 24 (5):951-959.
- Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler HR, Triebkorn R (2005) Assessing contamination levels of laguna lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of The Total Environment* 347 (1-3):254-271.
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3 (3):197-207.
- Hsu P, Matthäi A, Heise S, Ahlf W (2007) Seasonal variation of sediment toxicity in the rivers Dommel and Elbe. *Environmental Pollution* 148 (3):817-823.
- Ikone- Integrierende Konzeption Neckar-Einzugsgebiet (2003) Gütezustand der Fließgewässer im Neckar-Einzugsgebiet. http://www.ikone-online.de/fileadmin/template/hefte/IKONE_Heft_5.pdf. Accessed 9.3.2010.

- ISO (1996) Water quality- determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* hamilton-buchanan (teleostei, cyprinidae)] iso 7346/3.
- Katip A, Karaer F, Ileri S, Sarmasik S, Aydogan N, Zenginay S (2012) Analysis and assessment of trace elements pollution in sediments of lake Uluabat, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 33 (5):961-968.
- Keiter S, Rastall A, Kosmehl T, 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* 13 (5):308-319.
- Köhler H-R, Eckwert H, Triebkorn R, Bengtsson G (1999) Interaction between tolerance and 70kda stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Applied Soil Ecology* 11 (1):43-52.
- Laguerre C, Sanchez-Hernandez JC, Köhler HR, Triebkorn R, Capowiez Y, Rault M, Mazzia C (2009) B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Pollution* 157 (1):199-207.
- Lammer E (2005) Histologie: Erstellung von Paraffinschnitte. SOP, Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg.
- Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (2012) Umweltdaten 2012 Baden-Württemberg, vol 1. ABT Print und Medien GmbH Weinheim, Stuttgart.
- Lange C, Kuch B, Metzger JW (2015) Occurrence and fate of synthetic musk fragrances in a small german river. *Journal of Hazardous Materials* 282C:34-40.
- Leino RL, Jensen KM, Ankley GT (2005) Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (1):85-98.
- Leticia A-G, Gerardo G-B (2008) Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (3):787-797.
- Lietz J (2007) Jahresbericht 2006/2007- Biologische Bewertungsverfahren im Test: Erste Ergebnisse aus dem Fließgewässer-Praxistest zur Umsetzung der WRRL in Schleswig-Holstein.
- Liu Y, Beckingham B, Ruegner H, Li Z, Ma L, Schwientek M, Xie H, Zhao J, Grathwohl P (2013) Comparison of sedimentary PAHs in the rivers of Ammer (Germany) and Liangtan (China): Differences between early- and newly-industrialized countries. *Environmental Science and Technology* 47 (2):701-709.
- Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology* 120 (1):43-49.
- Logan DT (2007) Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment*: 13 (2):302-316.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1):265-275.
- Maier D, Blaha L, Giesy JP, Henneberg A, Köhler H-R, Kuch B, Osterauer R, Peschke K, Richter D, Scheurer M, Tribskorn R Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Research* (in press).
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87 (1):206-210.
- Moliner-Martínez Y, Herraes-Hernandez R, Verdú-Andres J, Campíns-Falcó P, Garrido-Palanca C, Molins-Legua C, Seco A (2013) Study of the influence of temperature and precipitations on the levels of btx in natural waters. *Journal of Hazardous Materials* 263, Part 1 (0):131-138.
- Nagel R (2002) Dart: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- Newman MC, Evans DA (2006) Ecotoxicology. In: *Encyclopedia of environmetrics*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nicolas J-M (1999) Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology* 45 (2-3):77-90.
- Nogueira P, Pacheco M, Pereira L, Mendo S, J. RM (2010) Anchoring novel molecular biomarker responses to traditional responses in fish exposed to environmental contamination. *Environmental Pollution* 158:1783-1790.
- Oikari A (2006) Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78 (4):370-381.
- Oliveira M, Gravato C, Guilhermino L (2012) Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (teleostei, gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19 (0):206-214.
- Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M (2012) Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75 (0):187-197.
- Palma P, Alvarenga P, Palma V, Matos C, Fernandes R, Soares A, Barbosa I (2010) Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: A case study of the Alqueva reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* 17 (3):703-716.
- Pavlica M, Štambuk A, Malović L, Mladinić M, Klobučar GV (2011) DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* l.) as an indicator of pollution-related genotoxicity in the river Sava. *Environmental Monitoring and Assessment* 177 (1-4):85-94.
- Pawert M, Muller E, Tribskorn R (1998) Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue Cell* 30 (6):617-626.
- Peakall D, B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 3:157-160.

- Perrodin Y, Boillot C, Angerville R, Donguy G, Emmanuel E (2011) Ecological risk assessment of urban and industrial systems: A review. *Science of The Total Environment* 409 (24):5162-5176.
- Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Triebkorn R (2014) Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106 (0):115-125.
- Popiel S, Sankowska M (2011) Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid-phase microextraction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218 (47):8457-8479.
- Pöckl M (1993) Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*). Entwicklungszyklus und Fortpflanzungskapazität. *Natur und Museum* 123 (4):114-125.
- Regierungspräsidium Stuttgart. (2005) Eg – Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/eg), vorläufiger Bericht zur Bestandsaufnahme Teil b Bearbeitungsgebiet Neckar (Stand 24.02.2005).
- Reynaud S, Deschaux P (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77 (2):229-238.
- 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 (3):442-448.
- Rodríguez-Fuentes G, Gold-Bouchot G (2000) Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two mexican lagoons. *Marine Environmental Research* 50 (1-5):357-360.
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski KU, Nagel R, Kohler HR, Triebkorn R (2006) Bisphenol a in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (amphipoda). *Ecotoxicology* 15 (2):143-156.
- Schnell S, Martin-Skilton R, Fernandes D, Porte C (2009) The interference of nitro- and polycyclic musks with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp: An *in vitro* study. *Environmental Science & Technology* 43 (24):9458-9464.
- Schnurstein A, Braunbeck T (2001) Tail moment versus tail length--application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49 (2):187-196.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6 (1):75-86.
- Sibley PK, Benoit DA, Balcer MD, Phipps GL, West CW, Hoke RA, Ankley GT (1999) *In situ* bioassay chamber for assesment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2325-2336.

- Simmons DB, Marlatt VL, Trudeau VL, Sherry JP, Metcalfe CD (2010) Interaction of galaxolide(r) with the human and trout estrogen receptor-alpha. *Science of The Total Environment* 408 (24):6158-6164.
- Sures B (2008) Host–parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology* 73 (9):2133-2142.
- Takashima F, Hibiya T (1995) An atlas of fish histology, normal and pathological features. 2 edn. Kodansha Ltd.
- Tetreault GR, Bennett CJ, Cheng C, Servos MR, McMaster ME (2012) Reproductive and histopathological effects in wild fish inhabiting an effluent-dominated stream, Wascana creek, SK, Canada. *Aquatic Toxicology* 110–111 (0):149-161.
- Triebskorn R (2012) Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Monitoring vor inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese "Schussen Aktiv" <http://schussenaktivplus.de>. Accessed 31.10.2014.
- Triebskorn R, Amler A, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung R-M, Kneipp S, Köhler H-R, Kraiss S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J, K W (2013) SchussenAktivPlus: Reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* 25 (1):2.
- Triebskorn R, Adam S, Behrens A, Beier S, Böhmer J, Braunbeck T, Casper H, Dietze U, Gernhöfer M, Honnen W, Köhler H-R, Körner W, Konradt J, Lehmann R, Luckenbach T, Oberemm A, Schwaiger J, Segner H, Strmac M, Schüürmann G, Siligato S, Traunspurger W (2003) Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The Valimar project. *Human and Ecological Risk Assessment*: 9 (1):171-194.
- Triebskorn R, Böhmer J, Braunbeck T, Honnen W, Köhler H-R, Lehmann R, Oberemm A, Schwaiger J, Segner H, Schüürmann G, Traunspurger W (2001) The project Valimar (validation of biomarkers for the assessment of small stream pollution): Objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8 (3-4):161-178.
- VanLandeghem MM, Meyer MD, Cox SB, Sharma B, Patiño R (2012) Spatial and temporal patterns of surface water quality and ichthyotoxicity in urban and rural river basins in Texas. *Water Research* 46 (20):6638-6651.
- Wester PW, van der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwis GCM, Vos JG (2002) Aquatic toxicology:: Opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11 (3–4):289-295.
- Wheelock C, Phillips B, Anderson B, Miller J, Miller M, Hammock B (2008) Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (ties). In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 117-178, Springer New York.

- Wogram J, Sturm A, Segner H, Liess M (2001) Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7):1528-1531.
- Yoo JL, Janz DM (2003) Tissue-specific hsp70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal-contaminated creek. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (1):110-120.
- Zhu S, Chen H, Li J (2013) Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan lake basin, Eastern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96 (0):154-159.

Kapitel 1: Kartierung des Neckars im Umkreis von Tübingen

Krisztina Vincze¹, Volker Scheil¹, Rita Triebkorn^{1,2}

¹ *Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere, Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Deutschland*

² *Steinbeis-Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Deutschland*

Vorgelegt als Bericht dem Regierungspräsidium Tübingen und dem Kreisfischereiverein Tübingen, August 2011

1.1 Einleitung

Im Auftrag des Kreisfischereivereins Tübingen wurde von Juni bis Juli 2011 eine Kartierung des Neckars zwischen dem Hirschauer Wehr und dem Lustnauer Wehr durchgeführt. Die Kartierung diente vor allem der Charakterisierung von Lebensräumen in den Gewässerabschnitten, und soll für spätere Fischbesatzmaßnahmen wichtige Informationen liefern. Die Kartierung bestand aus zwei Aspekten: Zum einem wurden die Struktur- und physikalischen Parameter des Neckarabschnittes, wie zum Beispiel Temperatur, Fließgeschwindigkeit, Uferstruktur, Bodenbeschaffenheit, Gewässerbreite und Tiefe usw., bestimmt, zum anderem wurden exemplarisch die Wirbellose als Fischnährtiere untersucht. Die kartierte Strecke des Neckars ist ungefähr 10 km lang und kann in 6 Bereiche unterteilt werden (Abb. 1):

- 1: Fließbereich unterhalb Hirschauer Wehr (FB1)
- 2: Übergangsbereich nach Hirschauer Wehr (ÜB1)
- 3: Staubereich bei Wehr Brückenstraße (SB1)
- 4: Fließbereich unterhalb Wehr Brückenstraße (FB2)
- 5: Übergangsbereich vor Lustnauer Wehr (ÜB2)
- 6: Staubereich vor Lustnauer Wehr (SB2)

Fließbereiche sind durch schnell fließendes, Staubereiche durch (nahezu) stehendes Wasser charakterisiert, der Übergang zwischen diesen beiden Bereichen wird als Übergangsbereich bezeichnet (siehe auch Kartierungsbögen im Anhang).

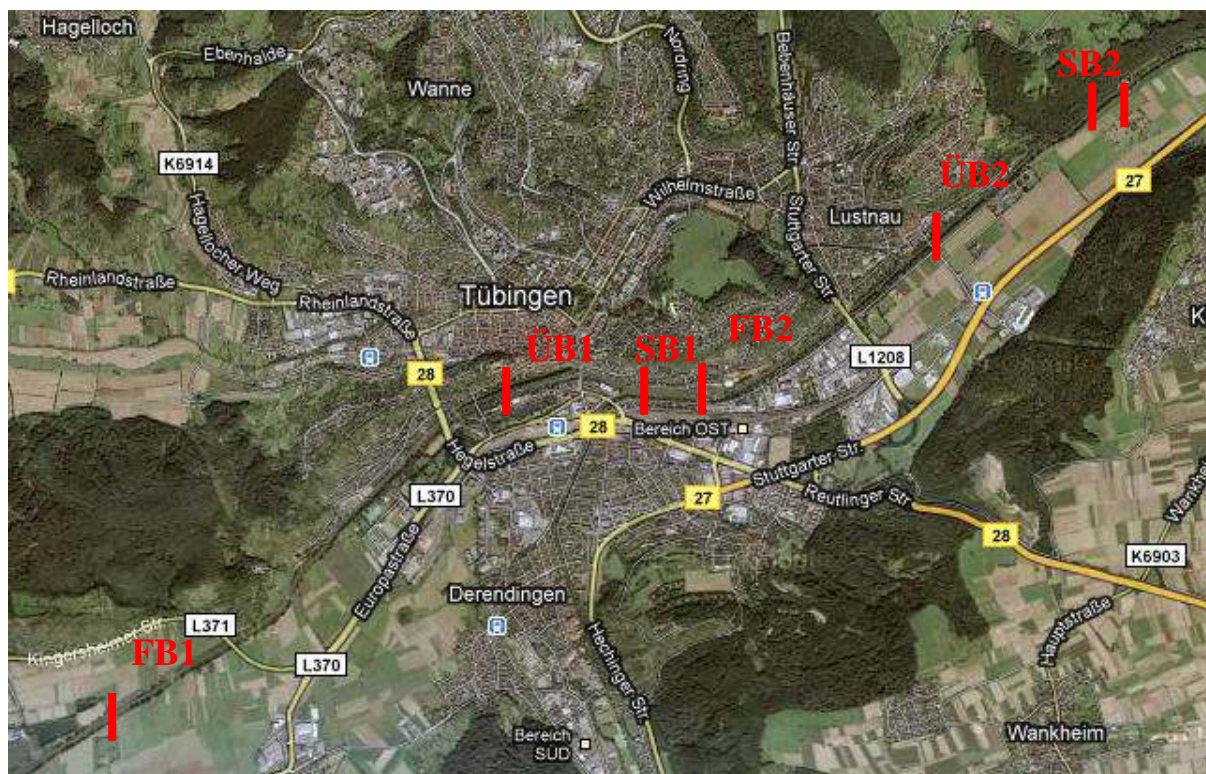


Abb. 1: Die kartierten Gewässerabschnitte des Neckars (FB = Fließbereich, ÜB = Übergangsbereich, SB = Staubereich)

1.2 Strukturbeschreibung und physikalische Parameter der Neckarabschnitte– Methoden und Ergebnisse

Bei der Strukturbeschreibung wurden vorgefertigte Formulare verwendet (siehe Anhang). Die Strukturkartierung erfolgte angelehnt an Böttger (2003). Es wurden pro Bereich vier verschiedene Formulare genutzt: Blatt 1 charakterisiert das Längsprofil des Bereiches, es werden dabei Temperaturwerte, Tiefen-, Breiten- und Fließgeschwindigkeitswerte des Gewässers, Einläufe, Einleitungen, Verzweigungen, und Fischwanderhindernisse aufgenommen. Das zweite Formular (Blatt 2) erfasst die prozentualen Anteile der im Querprofil (Blatt 3) eingetragenen Eigenschaften. Das dritte Formular (Blatt 3) wird bei der Querprofilaufnahme benutzt. Pro Abschnitt werden, in Abhängigkeit von Veränderungen innerhalb des Abschnittes, mehrere Querprofile eingelegt. Dabei werden Eigenschaften wie

Gewässerbreite, mittlere Tiefe, Fließgeschwindigkeit, Bodenstruktur, Wasserpflanzen, Uferstruktur, Ufervegetation, Umgebung und weitere fischrelevante Aspekte betrachtet. Neben der Protokollierung mittels der Formulare wurden von den Abschnitten Fotos gemacht. Weiterhin wurden relevante Eigenschaften wie Buhnen, Störsteine, Fischtreppe, Kanäle, Einleitungen, Kiesbänke usw. auf einer Karte (TK 7420) eingetragen. Da die Kilometersteine oftmals nicht vorhanden, bzw. zugewachsen waren, wurden die Flurstiegsnummer der Karte verwendet.

Die Strukturkartierung wurde zwischen dem 14.6.2011. und 21.6.2011. an allen sechs Gewässerabschnitten ausgeführt. Die Strukturkartierung erfolgte durch Krisztina Vincze (Dipl. Biol.) in Kooperation mit den Gewässerwarten des Kreisfischereivereines Tübingen: Andreas Fritz, Adolf Stradinger, und Klaus Brilisauer.

1.2.1 Fließbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs (FB1)

Der Fließbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs beträgt ungefähr 4,6 km bis zur Grenze des Übergangsbereichs beim Klosterberg (Mitte Plataneninsel). Die durchschnittliche Breite ist 26 m, die Tiefe 0,6 m. In den oberen Bereich ist die Fließgeschwindigkeit 0,5 m/s, in den unteren wird das Wasser eher langsam fließend und die Geschwindigkeit bleibt unter 0,3 m/s. Der Bereich kann als obere Barbenregion (Böttger, 2003) bezeichnet werden. Der Neckar hat in diesem Bereich zwei Verzweigungen, eine ist der Neckarkanal, welcher zum Elektrizitätswerk (bei der Rappenberghalde) umgeleitet wird, die andere ist der Flutgraben, der an der rechten Seite der Plataneninsel abfließt. Die Umgebung der oberen Strecke setzt sich hauptsächlich aus Grün- und Ackerland zusammen, im unteren Bereich fließt der Neckar durch die Stadt Tübingen.

Der Gewässergrund ist variabel, im oberen Bereich dominiert grober und feiner Kies, was optimal für Kieslaicher ist. Im unteren Bereich kommen mehrere Strecken mit Felsblöcken und Schlamm vor. Die Kartierung dieser Strecke erfolgte in einem warmen und niederschlagsarmen Zeitraum, durch die guten Wetterbedingungen war häufig der starke Bewuchs des Grundes mit Wassermoosen zu beobachten. In dem Gewässerabschnitt kam überwiegend mit Unterwasserpflanzen mehr oder weniger bewachsener Gewässergrund vor, nicht bewachsener Gewässergrund war nur stellenweise zu beobachten. Das Ufer ist teilweise aus Steinsatz, welcher mit Bäumen und Sträuchern überwachsen ist, aufgebaut, die Uferpflanzen beschatten ungefähr ein Viertel des Wassers Neophyten kommen in großen

Mengen vor, das Drüsige Springkraut (*Impatiens glandulifera*) ist an vielen der kartierten Strecken zu beobachten. Diese invasive Pflanze kommt ursprünglich aus Indien, sie wurde in Europa als Zierpflanze eingeführt. Das Springkraut bevorzugt nasse, nährstoffreiche Böden, deshalb kann es an Ufern massenhaft vorkommen. Es verbreitet sich schnell und dominiert über andere Pflanzen (M. Hejda, P. Pyšek, 2006).

Generell betrachtet ist die Strecke ziemlich lang und variabel, der größte Teil des Bereichs ist ausgebaut und entspricht nicht naturnahen Bedingungen. Der obere Fließbereich (Abb. 2) nach dem Hirschauer Wehr (bis etwa Freibad Tübingen) weist bessere Eigenschaften für Laich- und Jungfische auf, da er über mehr Substratvarianz und Unterwasserpflanzen verfügt, es befinden sich außerdem auch zahlreiche Buhnen, Unterstände und Störsteine im Abschnitt. Der untere Bereich (Abb. 3) befindet sich schon in der Stadt Tübingen, Kanu- und Rudersport werden dort ausgeführt. Das Ufer ist deutlich ausgebaut mit Steinsatz und Beton, Einleitungen, Rohrleitungen, Regenleitungen und Kanäle sind ebenfalls vorhanden. Dieser Abschnitt ist eher als Jungfischhabitat geeignet.



Abbildung 2: Der obere Fließbereich nach dem Hirschauer Wehr.



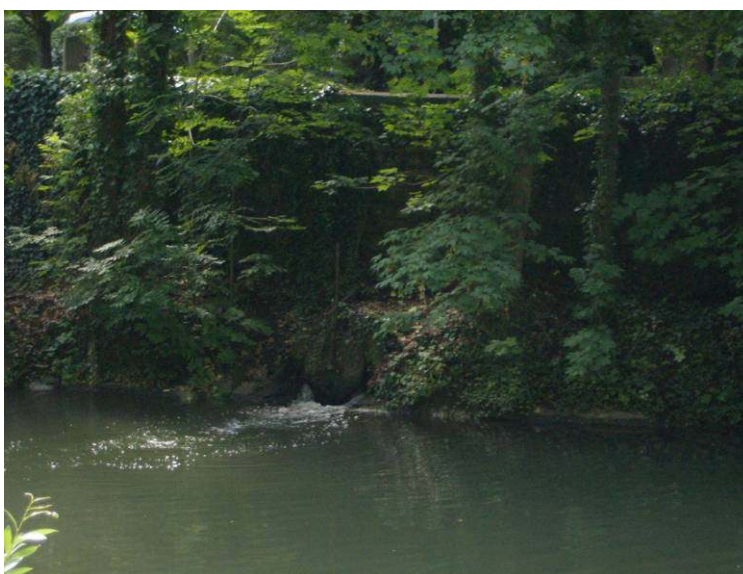
Abbildung 3: Der untere Fließbereich nach dem Hirschauer Wehr.

1.2.2 Übergangsbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs (ÜB1)

Der Übergangsbereich nach dem Hirschauer Wehr ist eine 1,3 km lange Strecke vom Klosterberg bis zum Anfang der Stauwurzel beim Flurstieg 619/2 (Jugendherberge). Die durchschnittliche Breite ist größer als im Fließbereich, sie beträgt ungefähr 32,5 m, die Tiefe ist ebenfalls größer: sie liegt bei etwa 1,35 m. Die Fließgeschwindigkeit ist langsam (0,1 m/s), der Abschnitt kann deshalb schon als Brachsenregion (Böttger, 2003) bezeichnet werden. Der Neckar ist hier gestreckt und weist nur bei der Plataneninsel eine Verzweigung (Flutgraben) auf. Mehrere Kanäle und Rohrleitungen befinden sich entlang der Strecke, deren Ursprung im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht kartiert wurde.

Der Gewässergrund besteht aus Felsblöcken, Feinkies und feinkörnigem Material, er ist entlang der Ufer teilweise mit Unterwasserpflanzen bewachsen. Das Ufer ist ausgebaut mit Steinsatz und Beton, welche zugewachsen sind. Die Vegetation beschattet die Strecke bis zu einem Viertel der Oberfläche und besteht aus Gehölz, Bäumen und Springkraut. Die Umgebung setzt sich hauptsächlich aus Siedlung und Verkehrswegen zusammen.

Generell betrachtet ist dieser Bereich stark beeinträchtigt, die Substrat- und Tiefenvarianz ist relativ gering. Steinsatz und Betonmauern am Ufer entsprechen keinen naturnahen Bedingungen. Der Abschnitt ist ziemlich stark frequentiert durch Kanus und Stocherkähne.



Der Gewässerabschnitt ist aufgrund seiner Struktur weder für Laichfische noch für Jungfische geeignet. Über die Herkunft von

Abbildung 4: Kanaleinlauf beim Flutgraben. Der Ursprung des Kanals ist nicht kartiert worden.

Rohrleitungen und Kanälen sind wenige Informationen vorhanden, es ist möglich, dass belastetes Wasser in den Neckar gelangt (Abb.4).

1.2.3 Staubereich beim Wehr Brückenstraße (SB1)

Der Staubereich bis zum Wehr Brückenstraße ist eine kurze, 0,5 km lange Strecke die als Brachsenregion gilt. Die mittlere Tiefe und Breite beträgt 65 bzw. 2 m. Die Fließgeschwindigkeit ist sehr gering, variiert zwischen 0,1 m/s und stehend. Der Neckar läuft hier gestreckt und unverzweigt. Am Wehr befindet sich ebenfalls ein Elektrizitätswerk. Der neue Fließbereich beginnt nach den Sohlabsturz. Um die Passage der Strecke für die Fische zu sichern, wurde eine Fischtreppe eingerichtet. Von der rechten Seite mündet die Steinlach ein. Die Steinlach verfügt über ein Einzugsgebiet von 144 km², ihre Wasserqualität hat sich mit dem Bau der Kläranlage des Abwasserverbandes Steinlach/Wiesaz wesentlich verbessert (WRRL, 2005).

Dieser Bereich gilt als stark beeinträchtigt. Der Gewässergrund besteht hauptsächlich aus Blöcken und Schlamm, das Ufer ist ausgebaut mit zugewachsenem Steinsatz und Mauern. Unterwasserpflanzen kommen am schmalen Uferstreifen vor, etwa die Hälfte des Bereiches verfügt aber einen nicht bewachsenen Gewässergrund. Die Ufervegetation besteht aus Bäumen und Sträuchern, die auf der breiten Fläche kaum Beschattung geben. Der Abschnitt befindet sich im direkten Siedlungsbereich der Stadt Tübingen (Abb. 5) und ist mit

Verkehrswegen umgeben. Aus diesen Gründen sind Störungsquellen vorhanden, aufgrund der niedrigen Varianz im Bezug auf Bodensubstrate und Uferstruktur ist der Bereich für Laichfische nicht geeignet. Im Abschnitt befinden sich keine Auskolkungen, Buhnen oder Unterstände. Das Öffnen und Schließen des Wehrs stellt ggf. eine Gefahr für die Fische dar, aus diesen Gründen ist das Habitat als nicht optimal zu bezeichnen.



Abbildung 5: Staubereich beim Wehr Brückenstraße.

1.2.4 Fließbereich unterhalb des Wehrs Brückenstraße (FB2)

Dieser Bereich umfasst eine 2,1 km lange Strecke nach dem Wehr an der Brückenstraße. Die ersten 0,3 km können separat charakterisiert werden. Der obere Bereich enthält mehrere Kiesbänke und kleine Inseln (Abb. 6), die Fischtreppe mündet ebenfalls hier ein. Dieser kurze Abschnitt bietet einen variablen Lebensraum für die Fische, der Grund besteht aus Kies verschiedener Korngrößen und weiterhin aus Gesteinsblöcken. Bei der Einmündung der Fischtreppe an der linken Seite ist das Wasser schnell fließend und tiefer (ca. 0,7 m), wobei die rechte Seite mit mittlerer Geschwindigkeit fließt, mit ruhigen Stellen und Auskolkungen

am Rand. Unterwasserpflanzen (Moos) und Ufervegetation (Bäume, Sträucher) sind ebenfalls vorhanden. Die Gewässertiefe liegt hier bei 0,3-0,5 m.

Diese kurze obere Region liegt zwar in der Stadt, aber durch die vielfältigen Bodensubstrate, Tiefen und unterschiedlich schnell fließende Stellen entspricht sie naturnahen Bedingungen und ist optimal sowohl für Laich- als auch für Jungfische.

Die weiteren Abschnitte sind wenig mäandrierend, kanalisiert und in ihrer Struktur nicht mehr so variabel wie die oberen dreihundert Meter. Der Bereich erstreckt sich bis zur Brücke an der Kusterdinger Straße, wo der neue Übergangsbereich beginnt. Die durchschnittliche Breite ist 34 m, die Tiefe 0,88 m. Die Strecke ist als obere Barbenregion zu bezeichnen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 m/s bis 0,3 m/s. Die Umgebung ist uneinheitlich, es kommen sowohl



Abbildung 6: Der obere Fließbereich nach dem Wehr an der Brückenstraße; zahlreiche Unterstände, Inseln und Kiesbänke

besiedelte Abschnitte als auch Grünland mit Verkehrswegen vor. Einleitungen sind vorhanden: zwei Rohrleitungen und ein Kanal mit unbekannter Herkunft laufen an der rechten Seite ein. An der linken Seite mündet die Ammer ein. Die Ammer hat ein Einzugsgebiet von 238 km², dieser Nebenfluss hat nur eine mäßige Gewässergüte (WRRL, 2005)

Der Gewässergrund besteht aus Blöcken, Kies und Grobkies, im unteren Abschnitt kommt auch Schlamm vor. Die Strecke ist im Großteil mit Wassermoos im schmalen Uferstreifen bewachsen. Es befinden sich zahlreiche Buhnen und Störsteine entlang der Strecke. Das Ufer ist meistens ausgebaut mit Steinsatz und ist mit Bäumen und Gehölz zugewachsen, die Unterstände und Schatten für die Fische bieten. Ein Problem kann der Futterplatz für Schwäne und Enten darstellen (Abb. 7), da Brotreste den Grund verschmutzen und die Bedingungen für Jungfische verschlechtern können. Die Strecke ist geeignet für Jung- und Laichfische.



Abbildung 7: Vogelfutterplatz am unteren Fließbereich nach dem Wehr an der Brückenstraße.

1.2.5 Übergangsbereich oberhalb des Lustnauer Wehrs (ÜB2)

Dieser Bereich ist eine 1,6 km lange Strecke von der Brücke an der Kusterdinger Straße bis zum Anfang der Stauwurzel vor dem Lustnauer Wehr. Hier nimmt die Tiefe des Neckars zu und beträgt ca. 1,56 m. Die Breite liegt bei 35-36 m. Dieser Abschnitt fließt langsam und unverzweigt, es ist weiterhin zu der Brachsenregion einzuordnen. Die Umgebung ist überwiegend Grünland mit Verkehrswegen, außerdem befindet sich die Tübinger Kläranlage (Abb. 8) auch in diesen Bereich. Es sind im Gewässerabschnitt keine Einläufe und Einleitungen vorhanden, der Kläranlageneinlauf befindet sich unterhalb des Lustnauer Wehrs. Die Bodenstruktur setzt sich aus Blöcken und Schlamm, weiterhin zu kleinem Teil aus Grobkies und Kies zusammen. Unterwasserpflanzen kommen nur im schmalen Uferstreifen vor. Der Ufervegetation ist reich an Bäumen, Gehölz und Springraut, welche teilweise ins Wasser hängen und ebenfalls Unterstände bieten. Es wurden Buhnen und Störsteine eingerichtet, um die Vielfaltigkeit der Strecke zu erhöhen. Die Strecke ist als stark beeinträchtigt zu bezeichnen und ist eher für Jungfische geeignet.



Abbildung 8: Kläranlagengebäude im Übergangsbereich vor Lustnauer Wehr.

1.2.6 Staubereich oberhalb des Lustnauer Wehrs (SB2)

Der letzte Bereich ist eine kurze, 0,2 km lange Strecke von Flurstieg 1252 bis zum Lustnauer Wehr. Der Neckar wird hier breiter und tiefer mit 40 m Breite bzw. 2m Tiefe. Einleitungen, Einläufe und Verzweigungen gibt es in diesem Abschnitt nicht. Die Umgebung setzt sich aus Grünland, Ackerland und Wald zusammen.

Der Gewässergrund besteht aus Sand und Schlamm, Wasserpflanzen sind hier kaum vorhanden. Das Ufer ist ausgebaut mit Mauern am Wehr, teilweise auch mit Steinsatz und Lebendverbau. Die Ufervegetation beschattet ungefähr ein Viertel der Fläche.

Dieses Bereich ist stark beeinträchtigt und entspricht nicht naturnahen Bedingungen. Ufer und Boden sind ausgebaut, die Vielfältigkeit ist sehr begrenzt. Das Wehr stellt ein Hindernis für die Wanderung von Fischen dar. Die Fischtreppe (Abb. 9) scheint für die Fische passierbar zu sein, sie ist lang, gut ausgebaut (passende Breite) und mit Wasserpflanzen bewachsen. Da der Abschnitt eher ruhig und stehend, bzw. langsam fließend ist, könnte er als Jungfischhabitat dienen, obwohl der schlammige Gewässergrund die Qualität des Habitats erniedrigt. Bühnen und Unterstände fehlen hier ebenfalls.



Abbildung 9: Lustnauer Wehr und Fischtreppe.

1.3 Bestimmung von Wirbellosen in den Gewässerabschnitten- Methoden und Ergebnisse

Wirbellosen Tieren kommt in Fließgewässern eine große Bedeutung als Fischnährtiere zu. Zudem spielen sie als Saprobier für die Zerkleinerung von organischem Material (Laub, Wasserpflanzen usw.) eine wichtige Rolle im ökologischen Gleichgewicht und für die Sauberkeit des Gewässers. Im Juli 2011 wurden in allen sechs Gewässerabschnitten Wirbellose gesammelt und bis auf die Ordnung bestimmt. Die Sammlung erfolgte an jeweils einem repräsentativen Ort pro Bereich, wobei mit Hilfe eines „Squarefoot-Samplers“ (20 x 20 cm



Abbildung 10: Sammeln von Wirbellosen im Fließbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs.

großes Metallquadrat mit Netzanhang) an drei repräsentativen Stellen pro Ort Proben entnommen wurden. An Stellen, die zu tief für den Einsatz des Squarefoot-Samplers waren, wurde auf einer entsprechend großen Fläche mit Hilfe von Keschern die Beprobung durchgeführt. Die entnommenen Tiere wurden in 70% Ethanol konserviert. Im Labor erfolgte anschließend die Bestimmung der Tiere bis zur Ordnung. Alle derselben Ordnung angehörenden Tiere wurden gezählt, getrocknet und gewogen, um die Gesamtmasse und die prozentualen Masseanteile der Ordnungen in der Probe zu beurteilen. Anschließend wurden pro Bereich alle Tiere nach Ordnung sortiert und in 70 % Ethanol aufbewahrt. Eine photographische Sammlung der vorkommenden Tierordnungen befindet sich im Anhang.

In den Proben kamen dreizehn verschiedene Wirbellosenordnungen vor:

- Strudelwürmer (Turbellaria)
- Schnecken (Gastropoda)
- Muscheln (Lamellibranchiata)
- Wenigborster (Oligochaeta)
- Egel (Hirudinea)
- Wasserasseln (Isopoda)
- Flohkrebse (Amphipoda)
- Eintagsfliegenlarven (Ephemeroptera)
- Steinfliegenlarven (Plecoptera)
- Schlammfliegenlarven (Megaloptera)
- Käfer (Coleoptera)
- Köcherfliegenlarven (Trichoptera)
- Zweiflüglerlarven (Diptera)

Im Weiteren werden die sechs Neckarabschnitte miteinander im Bezug auf Masse und Diversität (Vielfalt) verglichen. Dabei werden die wie oben folgenden Abkürzungen verwendet:

- FB1-Fließbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs
- ÜB1-Übergangsbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs
- SB1-Staubereich oberhalb des Wehrs Brückenstraße
- FB2-Fließbereich unterhalb des Wehrs Brückenstraße
- ÜB2-Übergangsbereich oberhalb des Lustnauer Wehrs
- SB2-Staubereich oberhalb des Lustnauer Wehrs

1.3.1 Zahl der Ordnungen in den Gewässerabschnitten

Die Diversität bzw. Artenvielfalt ist ein geeigneter Indikator für die Lebensraumqualität. Gute Habitate sind vielfältig und weisen in der Regel mehr Arten auf. In der vorliegenden Untersuchung wurde bis zur Ordnung, nicht bis zur Art bestimmt, dennoch kann auch dies Hinweise auf die Lebensraumqualität liefern. Abb. 11 zeigt die Anzahl der vorkommenden Ordnungen an den untersuchten Gewässerabschnitten.

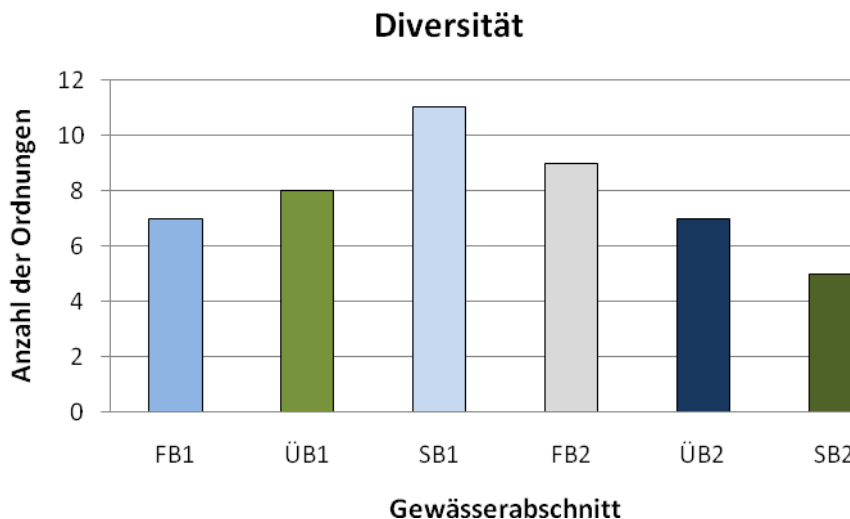


Abbildung 11: Anzahl der Wirbellosenordnungen an den untersuchten Gewässerabschnitten.

Es ergaben sich deutliche Unterschiede bei der Diversität in den verschiedenen Gewässerabschnitten. Die meisten Ordnungen (11) kamen im Staubereich beim Wehr an der Brückenstraße vor, die geringste Zahl an Ordnungen (5) weist der Staubereich am Lustnauer Wehr auf. Die Fließ- und Übergangsbereiche verfügen über 7-9 Invertebraten-Ordnungen. Nach den Strukturdaten hätte man erwarten können, dass die zwei Fließbereiche die meisten Ordnungen aufweisen, da die Habitate dort variabler sind, aber der Staubereich am Wehr Brückenstraße ist anscheinend auch ein geeignetes Habitat für einige Wirbellosenarten.

1.3.2 Wirbellosenmasse in den Gewässerabschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Trockenmasse der gesammelten Wirbellosen pro Abschnitt bestimmt. Die folgenden zwei Graphen (Abb. 12) zeigen die insgesamt erhobene Anzahl an Wirbellosen sowie das jeweilige Trockengewicht.

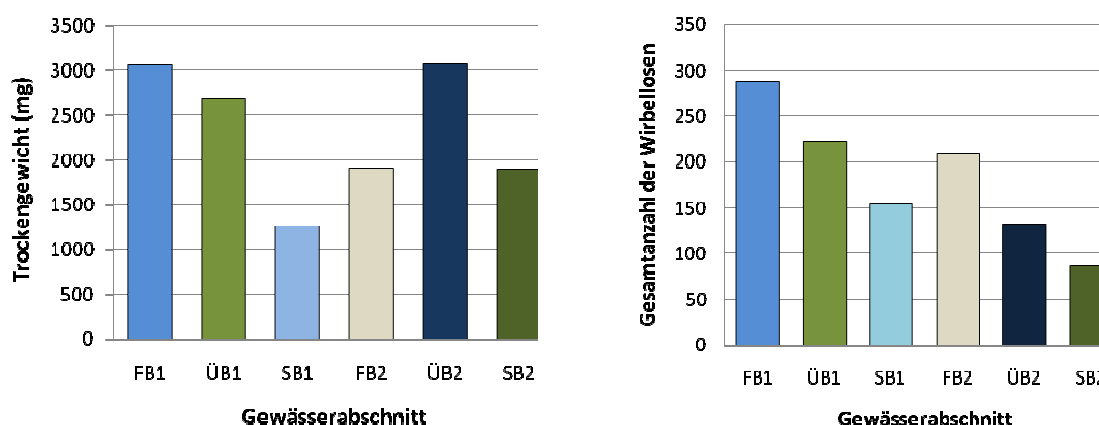


Abbildung 12: Trockengewicht (links) und Gesamtanzahl (rechts) der Wirbellosen an den untersuchten Gewässerabschnitten.

Das höchste Trockengewicht weisen die beprobten Wirbellosen im Fließbereich nach dem Hirschauer Wehr und diejenigen aus dem Übergangsbereich nach dem Wehr Brückenstraße auf. Die Beprobungen der zwei Staubereiche ergaben die geringsten Trockengewichte. Wenn man die Gesamtanzahl der Tiere betrachtet, verfügt der erste Fließbereich über die zahlenmäßig meisten Fischnährtiere, gefolgt vom Übergangsbereich nach dem Hirschauer Wehr und dem Fließbereich nach dem Wehr an der Brückenstraße. Der zweite Übergangsbereich hat ein geringe Tierzahl an den Probestellen, jedoch dennoch ein hohes Gesamtgewicht. Betrachtet man die detaillierte Aufstellung der Beprobung, so wird

deutlich, dass in ÜB2 bei einer eher geringen Gesamt tierzahl die Amphipoden (Flohkrebse) und Gastropoden (Schnecken) dominieren und stark zum hohen Trockengewicht beitragen. Die prozentualen Anteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Trockengewicht und an der Gesamtanzahl der Wirbellosen pro Gewässerabschnitt sind in folgenden Diagrammen (Abb. 13-18) dargestellt.

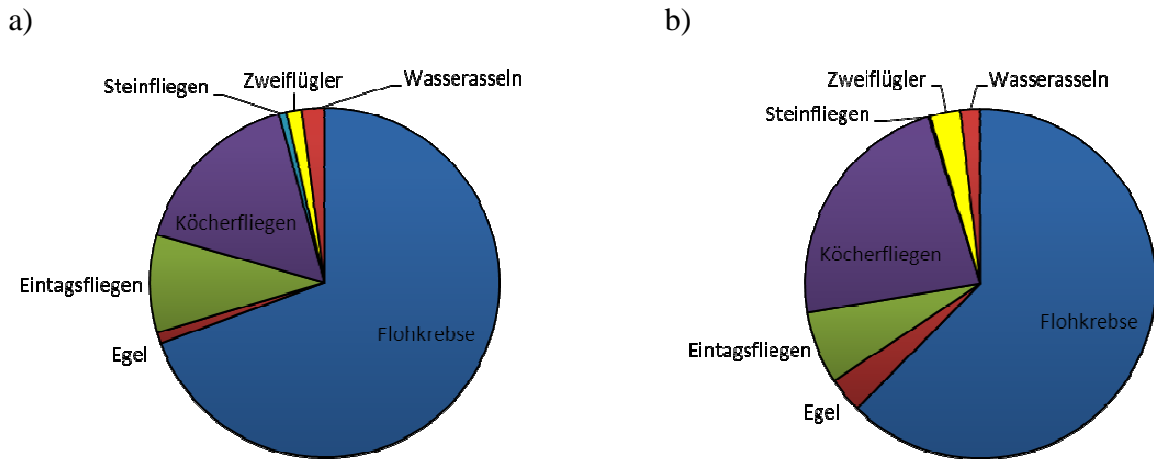


Abbildung 13: FB1: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamtrockengewicht.

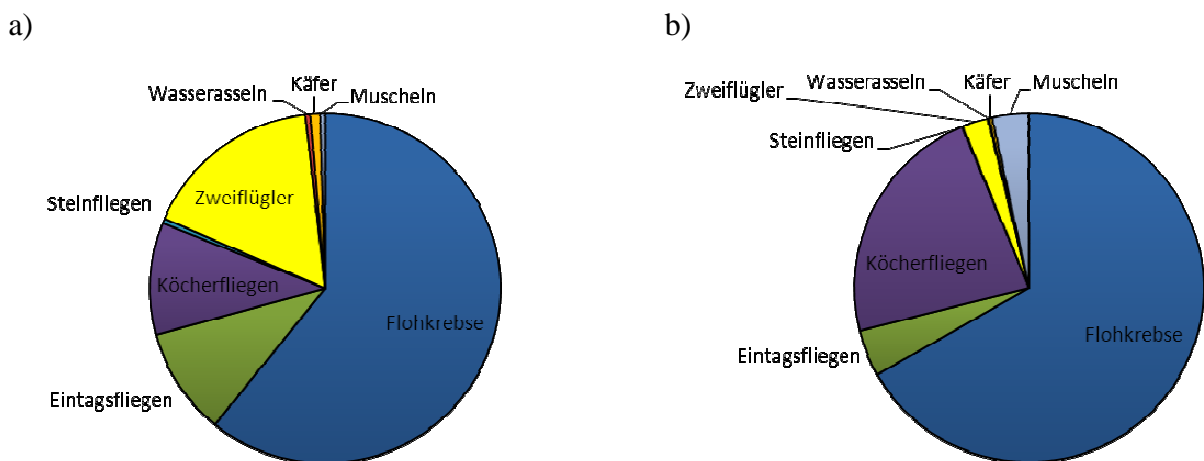


Abbildung 14: ÜB1: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamtrockengewicht.

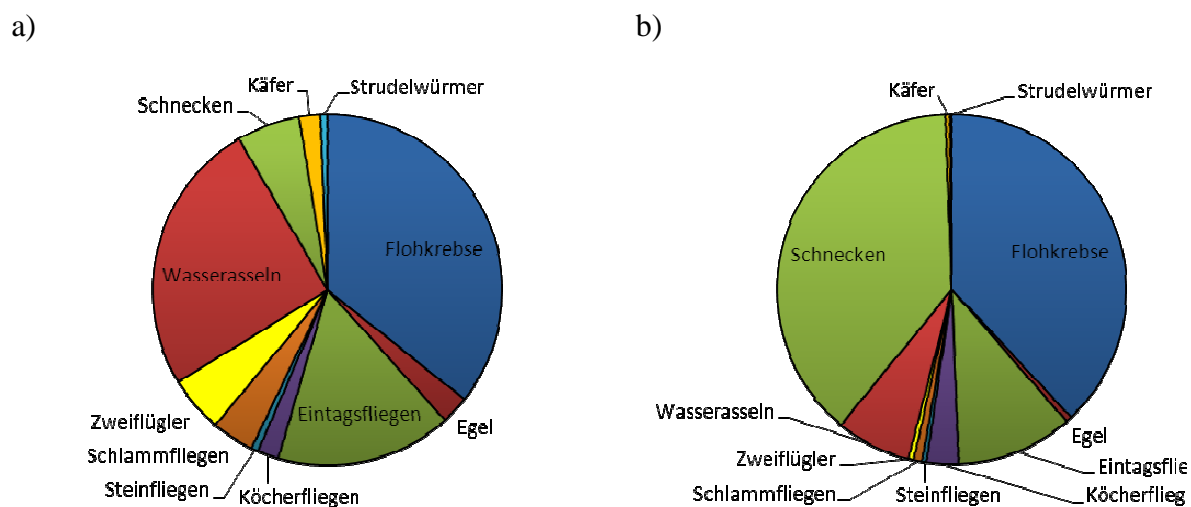


Abbildung 15: SB1: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamtrockengewicht.

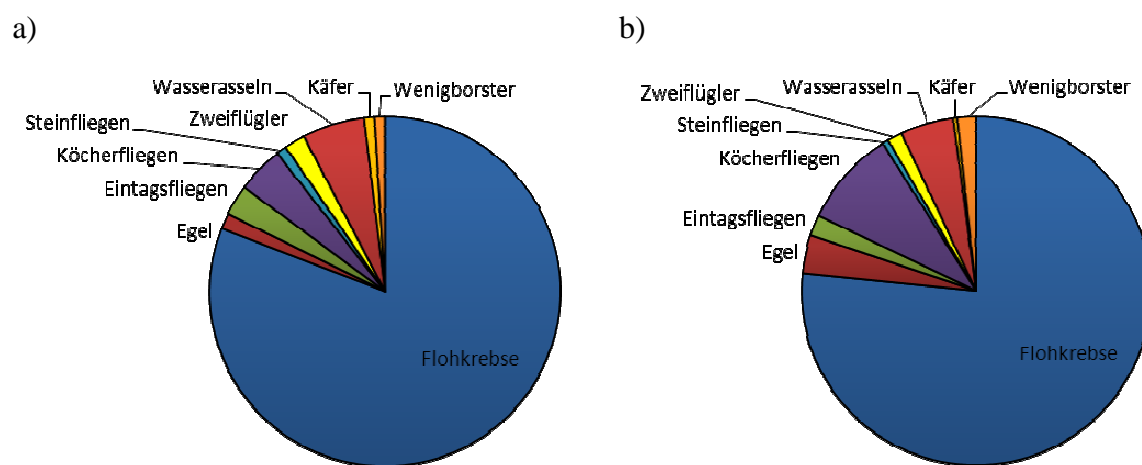


Abbildung 16: FB2: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamtrockengewicht.

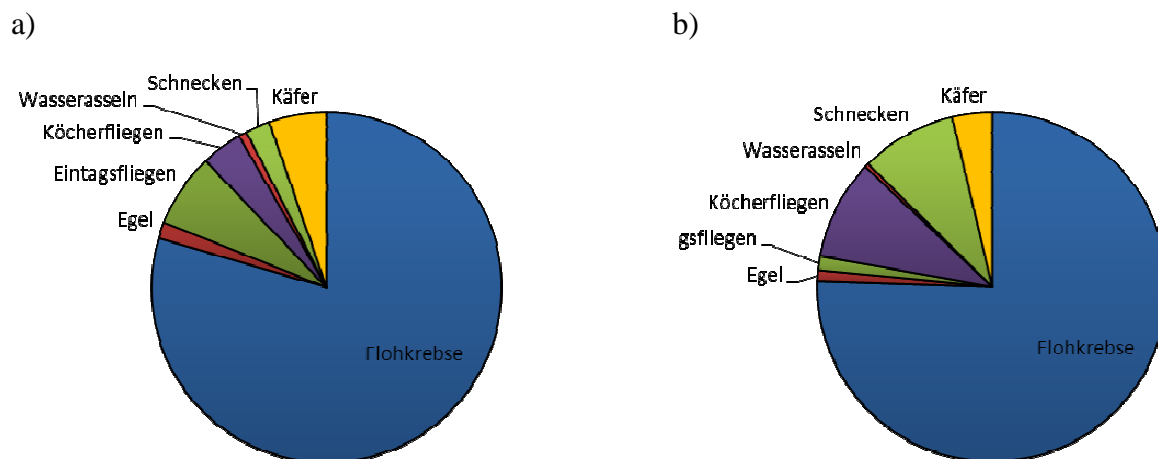


Abbildung 17: ÜB2: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamttrockengewicht.

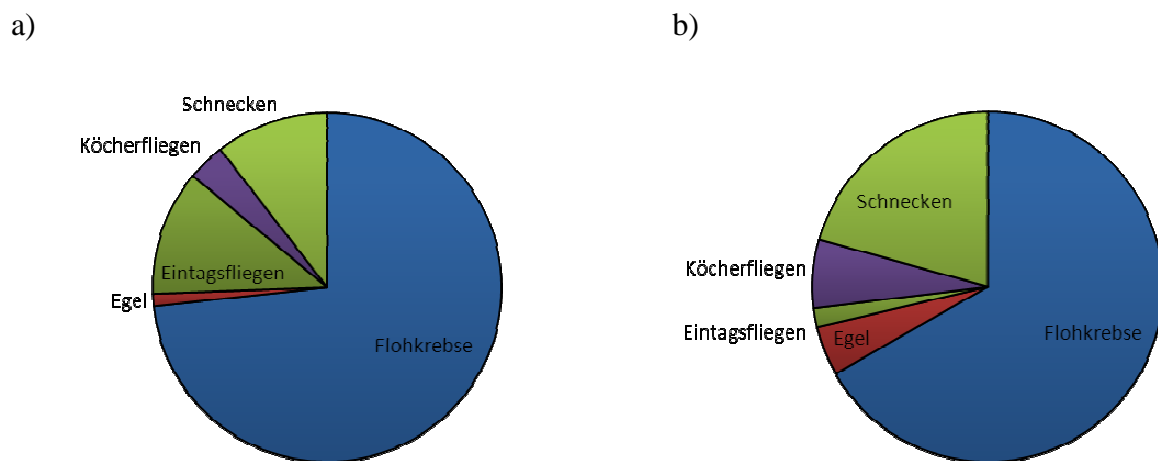


Abbildung 18: SB2: a) Prozentualer Anteil der Tiere der jeweiligen Ordnungen an der Gesamtzahl der bestimmten Tiere. b) Prozentuale Trockengewichtsanteile der Tiere der jeweiligen Ordnungen am Gesamttrockengewicht.

Generell kommen Flohkrebse, Eintagsfliegenlarven und Köcherfliegenlarven in allen sechs Neckarabschnitten vor. Den größten Anteil und weitgehend das größte Trockengewicht stellen die Flohkrebse. Diese Tiere ernähren sich von pflanzlichem Material und dienen als Nahrung für zahlreiche Fische (D. Horváth, 2003). Eintagsfliegen sind mit einer großen Anzahl in den Proben anzutreffen, ihr anteiliges Trockengewicht ist aber eher gering. Die Köcherfliegen stellen zahlreiche Arten, der Großteil präferiert Fließgewässer, unter ihnen befinden sich gehäusetragende und gehäuselose Arten (U. Schmedtje, 1992), in den gesammelten Proben kamen beide Gruppen vor. Alle anderen Ordnungen wie Muscheln, Schnecken, Egel, Wenigborster, Zweiflügler, Stein- und Schlammfliegen, Wasserasseln und Käfer sind nur in gewissen Abschnitten präsent, ihre Biomasse und Anzahl ist ziemlich variabel.

1.4 Diskussion

Nach der Kartierung der Neckarabschnitte erwiesen sich die zwei Fließbereiche als die am besten geeigneten Lebensräume für Jung- und Laichfische. Beide verfügen über eine relativ vielfältige Bodenbeschaffenheit, es befinden sich Buhnen, Unterstände, Störsteine, schnell- und langsam fließende Bereiche in diesen Abschnitten. Wasserpflanzen kommen nahezu entlang der ganzen Strecke vor. Es befinden sich ebenfalls naturnahe Stellen in den Abschnitten. Die beiden Bereiche sind der oberen Barbenregion zuzuordnen. Das Nahrungsangebot von Wirbellosen ist divers und ausreichend, Flohkrebse kommen in großer Anzahl vor.

Der Übergangsbereich vor dem Lustnauer Wehr verfügt auch über positive Eigenschaften, die Wasserfläche ist ziemlich groß, er ist sowohl für Jungfische, als auch für Laichfische geeignet, zudem kommen zahlenmäßig sehr viele Wirbellose vor. Man muss jedoch berücksichtigen, dass die Artenvielfalt relativ gering ist, hier korrelieren geringe Diversität bei relativ hoher Abundanz mit einer nur mäßig variablen Uferstruktur und Substratvarianz.

Der Übergangsbereich und Staubereich oberhalb des Wehrs Brückenstraße weisen eine kleinere Gesamtfläche auf. Der Boden besteht hier eher aus feinkörnigem Material und Blöcken, es kommt teilweise nicht bewachsener Gewässergrund vor. Die langsam fließenden Stellen dienen als gute Jungfischhabitate, für Kieslaicher sind diese Abschnitte jedoch nicht geeignet. Die Beschattung der Fläche ist geringer als oberhalb des Übergangsbereiches, da hier der Neckar auch breiter ist als im Fließbereich unterhalb des Hirschauer Wehrs.

Fischnährtiere treten im Staubereich in hoher Diversität, aber vergleichsweise geringem Trockengewicht auf, im Übergangsbereich kommen weniger Wirbellosenordnungen vor, haben jedoch ein insgesamt höheres Trockengewicht.

Generell hängt das Gesamttrockengewicht zu nicht unerheblichem Maß von der Anzahl der in dieses eingehenden Flohkrebse (Amphipoden) ab. Zudem schwankt das durchschnittliche Gewicht der beprobten Amphipoden in den Gewässerabschnitten, es liegt z.B. am Übergangsbereich oberhalb des Wehrs Brückenstraße (ÜB1) bei 13,2 g/Individuum, während es in ÜB2 bei 22,5 g/Individuum liegt (vgl. auch Anhang 3). Hierbei bleibt jedoch unberücksichtigt, dass die Tiere an den Probestellen der gleichen Ordnung, jedoch nicht gezwungenermaßen auch der gleiche Art angehören. Nach eigenen Beobachtungen sind im betrachteten Neckarabschnitt *Gammarus roeselii*, *G. pulex* sowie *G. fossarum* anzutreffen, welche unterschiedlich groß werden können.

Der schlechteste Lebensraum im untersuchten Neckarabschnitt ist der Staubereich vor dem Lustnauer Wehr. Er hat eine kleine Gesamtfläche, die Bodensubstrat- und Tiefenvarianz ist sehr gering. Unterwasserpflanzen sind kaum vorhanden und das Wehr erschwert das Passieren von Fischen. Fischnährtiere kommen in mittlere Masse vor, die Anzahl der Wirbellosenordnungen ist vergleichsweise gering. Aus diesen Gründen ist dieser Gewässerabschnitt als stark beeinträchtigt zu bezeichnen und ist für Fischbesätze weniger geeignet.

Folgende Tabelle stellt schematisch die strukturell bedingte Lebensraumqualität der jeweiligen Abschnitte dar, Grundlage für die Bewertung ist die erfolgte Kartierung.

Tabelle 1: Bewertung der Gewässerabschnitte, ***= gut, **=mittel, *=gering.

Gewässerabschnitt:	Strukturparameter				Fischnährtiere		
	Variab.	Fläche	Jung/Laichfisch		Div.	Anzahl	Trockengew.
Fließbereich unterhalb Hirschauer Wehr	***	***	***	***	**	***	***
Übergangsbereich nach dem Hirschauer Wehr	*	**	**	*	**	**	***
Staubereich vor dem Wehr Brückenstraße	*	*	**	*	***	*	*
Fließbereich unterhalb vom Wehr Brückenstraße	***	***	***	**	***	**	**
Übergangsbereich vor dem Lustnauer Wehr	*	***	***	**	**	*	***
Staubereich vor dem Lustnauer Wehr	*	*	*	*	*	*	**

1.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt sich, dass vor allem die Fließbereiche gute Lebensräume mit abwechslungsreicher Struktur und größerer Wirbelosendiversität darstellen, jedoch aufgrund der zwar geringeren Diversität, aber vergleichsweise hohen Trockengewichten der aufgefundenen Wirbellosen auch in den Übergangsbereichen sowie den Staubereichen, keine gänzlich schlechten Lebensbedingungen vorliegen. Die Aussagen zur Diversität und den Trockengewichten könnten mittels einer genauen Artbestimmung, die in der vorliegenden Untersuchung nicht gefordert und auch nicht zu leisten waren, geschärft werden.

1.6 Literatur

- Böttger, T. (2003): Die Hege von Fischen in Schleswig-Holstein Leitfaden für die Hegepflichtigen zum Landesfischereigesetz Schleswig- Holstein, ISBN 3-924691-11-8
- Hejda, M., Pyšek, P. (2006): What is the impact of "*Impatiens glandulifera*" on species diversity of invaded riparian vegetation? *Biological Conservation*, 132(2): 143-152
- Horváth, D. (2003): Süßwassertiere, Pannonia Verlag
- Schmedtje, U. (1992): Bestimmungsschlüssel für die Saprobier-DIN-Arten (Makroorganismen), Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Informationsberichte Heft 2/88
- Wasserrahmenrichtlinie (2005): Vorläufiger Bericht zur Bestandsaufnahme Teil B, Bearbeitungsgebiet Neckar. Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg, Regierungspräsidium Stuttgart, (2000/60/EG)

1.7 Anhänge

Anhang 1: Für die Strukturkartierung verwendete Formulare.

Gewässer: Fließbereich Übergangsbereich Staubereich Blatt 1

Abschnitt / Bereich	Flurst.Nr.	Fluß-km	Regierungspräsidium Tübingen
von			Landkreis _____
bis			Gemeinde _____
Länge ca. km	-	-	Gemarkg. _____

Gewässerabschnittsbeschreibung **Gewässerdirektion Ulm**
Topographische Karte

Gewässertyp: _____ TK _____ Maßstab 1 : 25 000

Gütezustand nach der Gewässergütekarte von _____ : _____

Krümmungstyp / Linienführung des Gewässerabschnitts:

mäandrierend = sehr ausgeprägte Laufkrümmung
 gewunden = der Lauf ist schwach bis stark gekrümmt
 gestreckt = der Lauf verläuft gerade bis schwach gekrümmt

Laufstyp des Gewässers:

verzweigt = der Mittelwasserabfluß verteilt sich natürlicherweise auf mehrere Gewässerläufe
 unverzweigt = der Abfluß konzentriert sich auf einen Gewässerlauf

Links- / Rechtsseitig einmündendes Gewässer _____ **bei Flurst.Nr.** _____

Links- / Rechtsseitig einmündendes Gewässer _____ **bei Flurst.Nr.** _____

Fischwanderhindernisse und Fischtrepfen

Art des Querverbaus	bei Flst.Nr./Fluß-km	für den Fischwechsel passierbar
<input type="checkbox"/> Sohlabsturz	_____	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> Flußkraftwerk	_____	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> Ausleitungswehr	_____	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> _____	_____	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

Einleitungen

Art der Einleitung	bei Flst.Nr./Fluß-km	bei Flst.Nr./Fluß-km
<input type="checkbox"/> ungeklärtes Abwasser	_____ links- / rechtsseitig	<input type="checkbox"/> Sickerwasser _____ links- / rechtsseitig
<input type="checkbox"/> geklärtes Abwasser	_____ links- / rechtsseitig	<input type="checkbox"/> Drainagen _____ links- / rechtsseitig
<input type="checkbox"/> Regenüberlauf	_____ links- / rechtsseitig	<input type="checkbox"/> Rohrleitung _____ links- / rechtsseitig
<input type="checkbox"/> Regenüberlauf	_____ links- / rechtsseitig	<input type="checkbox"/> Rohrleitung _____ links- / rechtsseitig
<input type="checkbox"/> Kühlwasser	_____ links- / rechtsseitig	<input type="checkbox"/> _____ links- / rechtsseitig

Flst.Nr. Fluß-km	mittlere Breite	mittlere Tiefe	Fließge- schwindigkeit	Wasserstand Peegel
	m	m	m/s	cm
	m	m	m/s	cm
	m	m	m/s	cm
	m	m	m/s	cm
	m	m	m/s	cm
Ø - Werte	m	m	m/s	cm

Größe des Gewässerabschnitts

Fläche [ha] = $\frac{\text{Länge [m]} * \text{Ø Breite [m]}}{10\,000}$

= $\frac{\quad \text{m} * \quad \text{m}}{10\,000}$

Fläche [ha] = _____ ha

Wasser- temp.	gemessen am	Wasser- temp.	gemessen am	Wasser- temp.	gemessen am
°C		°C		°C	
°C		°C		°C	

Kartierer: _____

Stand der Kartierung (Dat.): _____

Gewässer: _____

Fließbereich Übergangsbereich Staubereich Blatt 2

Strukturbeschreibung von _____ bis _____

(Auswertung des Arbeitsblattes 3 "Erfassung der Gewässer- und Uferstruktur")

Gewässerstrukturbeschreibung

Fließgeschwindigkeit bei MQ in m/s

- _____ % schnell, größer als 1 m/s
- _____ % schnell, geringer als 1 m/s
- _____ % mittel, 0,5 m/s
- _____ % langsam, w eniger als 0,3 m/s
- _____ % stehend

Gewässergrund / Substrat

- _____ % Fels
- _____ % Blöcke (20 - 40 cm Größe)
- _____ % Grobkies (5 - 20 cm Größe)
- _____ % Kies (2 - 5 cm Korngröße)
- _____ % Feinkies (2 mm - 2 cm Korngröße)
- _____ % Sand (bis 2 mm Korngröße)
- _____ % Ton, Schluff, Lehm
- _____ % org. Material, Detritus (z.B. Laub)

Gewässergrund / Sohlstruktur / Tiefenvarianz

- _____ % natürlich / große Tiefen- u. Substratvarianz
- _____ % naturnah / mittlere Tiefen- u. Substratvarianz
- _____ % stark beeinträchtigt
 - _____ % Lehm
 - _____ % Sand
 - _____ % Fels
- _____ % ausgebaut
 - _____ % Steinwurf
 - _____ % Pflasterung
 - _____ % Beton
- _____ % _____

Wasserpflanzen (Kartierung nur in der Vegetationszeit)

- _____ % Unterwasserpflanzen
 - _____ % schmaler Uferstreifen
 - _____ % Hälfte des Gewässers
 - _____ % ganze Gewässerbreite
- _____ % Schwimmblattpflanzen
- _____ % Gelege (Röhricht)
- _____ % nicht bewachsener Gewässergrund
- _____ % _____

Uferstrukturbeschreibung

Ufer / Böschung

- _____ % Betonschalen / Mauer
- _____ % Drahtschotter
- _____ % Steinsatz
- _____ % Steinschüttung
- _____ % Lebendverbau
- _____ % Äste / Astwerk / Wurzeln / Unterstände
- _____ % keine Befestigung
- _____ % Auskolkungen
- _____ % _____

Uferstrandstreifen

- _____ % vorhanden
- _____ % nicht vorhanden

Uferpflanzen

- _____ % Baumbestand
- _____ % Gehölz / Sträucher
- _____ % standortfremd / Neophyten
- _____ % überhängend / ins Wasser ragend
- _____ % fehlend
- _____ % _____

Beschattung des Gewässers

- _____ % keine Beschattung
- _____ % ¼ Breite
- _____ % ½ Breite
- _____ % volle Breite

Umgebung

- _____ % Nadel- / Laub- / Hochwald
- _____ % Brachland / Büsche
- _____ % Grünland
- _____ % Ackerland
- _____ % Gärten
- _____ % Siedlung
- _____ % Verkehrswege
- _____ % _____

Ausuferung

- _____ % möglich
- _____ % nicht möglich

Sonstige gewässerbezogene Belastung Fischrelevante Aspekte

- bildet sich am Gewässergrund Schwefelwasserstoff
- Laichfischhabitat
- Kanu / Rudersport / Stocherkähne
- Jungfischhabitat
- _____

Charakterisierung der Qualität des Lebensraumes - Unterkoeffizient k_2

(Habitatverhältnisse, Unterstände, Durchwanderbarkeit,)

- $k_2 = 0,5$ mäßige Raumverhältnisse
- $k_2 = 1,0$ ausreichende Raumverhältnisse
- $k_2 = 1,5$ gute Raumverhältnisse (dies bedeutet: keine Begradigung, große Breiten-, Tiefen- und Strömungsvariabilität, zahlreiche Unterstände, vielfältiges Ufergehölz, ungehinderte Wanderung der Fische)

$k_2 =$

Gewässer:

Erfassung der Gewässer- und Uferstruktur

Blatt 3

Bereich Abschnitt	Flst.Nr.	Fluß-km	Hinweise	Gewässerbreite	mittlere Tiefe	Wasserstand Pegel	Kartiert am :
von / bei				m	m		Kartierer :
bis				m	m	cm	

Gewässerstrukturbeschreibung

Fließgeschwindigkeit bei MQ in m/s

- schnell, größer als 1 m/s
- schnell, geringer als 1 m/s
- mittel, 0,5 m/s
- langsam, w eniger als 0,3 m/s
- stehend

Gewässergrund / Substrat

- Fels
- Blöcke (20 - 40 cm Größe)
- Grobkies (5 - 20 cm Größe)
- Kies (2 - 5 cm Korngröße)
- Feinkies (2 mm - 2 cm Korngröße)
- Sand (bis 2 mm Korngröße)
- Ton, Schluff, Lehm
- org. Material, Detritus (z.B. Laub)

Gewässergrund / Sohlstruktur / Tiefenvarianz

- natürlich / große Tiefen- u. Substratvarianz
- naturnah / mittlere Tiefen- u. Substratvarianz
- stark beeinträchtigt
 - Lehm
 - Sand
 - Fels
- ausgebaut
 - Steinwurf
 - Pflasterung
 - Beton

Wasserpflanzen (Kartierung nur in der Vegetationszeit)

- Unterwasserpflanzen (flut. Hahnenfuß, Quellmoos, Wasserpest, usw.)
 - Deckungsgrad
 - schmaler Uferstreifen
 - Hälfte des Gewässers
 - ganze Gewässerbreite
- Schwimmblattpflanzen (Seerosen, Wasserlinsen, usw.)
- Gelege (Röhricht)
- nicht bewachsener Gewässergrund

Sonstige gewässerbezogene Belastungen

- bildet sich am Gewässergrund Schwefelwasserstoff
- Kanu / Rudersport / Stocherkähne

Uferstrukturbeschreibung

links (in Fließrichtung gesehen) rechts

Ufer / Böschung

- | | | |
|--------------------------|--|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Betonschalen / Mauer | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Drahtschotter | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Steinsatz | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Steinschüttung | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Lebendverbau | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Aste / Astwerk / Wurzeln / Unterstände | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | keine Befestigung | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Auskolkungen | <input type="checkbox"/> |

Uferstrandstreifen

- | | | |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | vorhanden | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | nicht vorhanden | <input type="checkbox"/> |

Uferpflanzen

- | | | |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Baumbestand | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Gehölz / Sträucher | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | standortfremd / Neophyten | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | überhängend / ins Wasser ragend | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | fehlend | <input type="checkbox"/> |

Beschattung des Gewässers

- | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | keine Beschattung | <input type="checkbox"/> | $\frac{1}{4}$ Breite | <input type="checkbox"/> | $\frac{1}{2}$ Breite |
| <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> | $\frac{3}{4}$ Breite | <input type="checkbox"/> | volle Breite |

Umgebung

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Nadel- / Laub- / Hochwald | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Brachland / Büsche | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Grünland | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Ackerland | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Gärten | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Siedlung | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | Verkehrswege | <input type="checkbox"/> |

Ausuferung

- | | | |
|--------------------------|---------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | möglich | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | nicht möglich | <input type="checkbox"/> |

Fischrelevante Aspekte

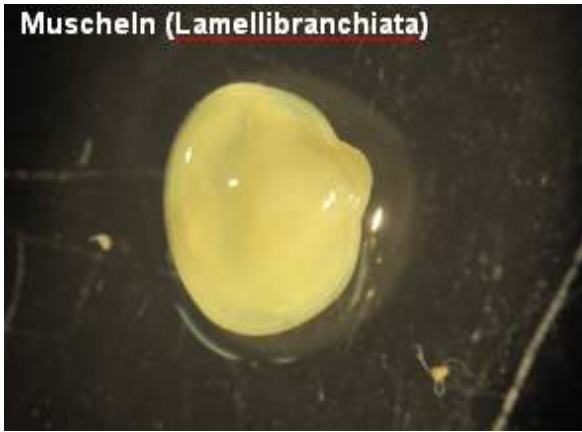
- Laichfischhabitat
- Jungfischhabitat

Anhang 2: Beispiel-Photos von in den Gewässerabschnitten vorkommenden Wirbellosenordnungen.





Muscheln (Lamellibranchiata)



Käfer (Coleoptera)



Kapitel 2: Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos

Krisztina Vincze¹, Katharina Graf¹, Volker Scheil¹, Heinz-R. Köhler¹, Rita Triebkorn^{1,2}

¹*Animal Physiological Ecology, Institute for Evolution and Ecology, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Strasse 20, D-72072 Tübingen, Germany*

²*Steinbeis-Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany*

Publiziert als Originalarbeit in *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13, 2014

2.1 Abstract

2.1.1 Background

The Neckar River (Southern Germany) represents an aquatic system strongly affected by numerous anthropogenic activities. Thus, it is an excellent model for ecotoxicological investigations. The present study aims to assess time and spatial variations of embryo- and proteotoxic effects in surface water and sediment. For this end, embryos of zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to Neckar River samples collected in the Tübingen region in different seasons over two years. Additionally, quantification of the heat shock (stress) protein Hsp70 was carried out in newly hatched larvae, furthermore physico-chemical water parameters were measured in order to gain baseline information about limnologic conditions.

2.1.2 Results

Nearly all of the investigated Neckar River sites caused elevated mortality, developmental retardation and failures, modified heart rate and reduced hatching success in zebrafish embryos and larvae. Additionally, exposure to Neckar River water and sediment led to changes in larval Hsp70 level. During the two years of investigation, seasonal differences of embryo- and proteotoxic effects occurred. Along these lines, physico-chemical measurements delivered basic information for the interpretation of *in vivo* test data.

2.1.3 Conclusions

Our study suggests a changing toxic burden in the whole investigated study area. Consequently, for ecotoxicological field studies time and spatial variations on small scale must be dealt with. The lethal and sublethal endpoints of the fish embryo test combined with Hsp70-level measurements proved to be effective tools for toxicity assessment of environmental samples.

Keywords: fish embryo test, Hsp70, biomarker, time- and spatial variations

2.2 Background

Anthropogenic chemicals entering freshwater via sewage effluents and other sources may pose a potential threat to aquatic ecosystems; therefore, environmental monitoring is a key issue in order to draw unbiased conclusions about toxic effects on living organisms. Since it is hard to predict how organisms of different systematic levels may react to the presence of multiple pollutants, there is an obvious need for investigating their physiological responses to certain exposure situations. In this context, biological effect studies including biomarkers provide a way to carry out an overall health assessment at various organisation levels (Moore et al. 2004; de la Torre et al. 2007). Biomarkers are defined as biological responses of organisms that give a measure of exposure and/or of toxic effect (Peakall 1994). Biomarker responses, such as gene expression alterations, increased biotransformation enzyme levels, immune responses, histological impairments etc. can provide an early warning on environmental and ecological effects of chemicals (Walker 1995).

Heat shock proteins (Hsps), also named as stress proteins, are one of the molecular biomarkers of effect which can be used as indicators for cellular and proteotoxic hazard (Gupta et al. 2010). Among the various stress response pathways, the heat shock response is one of the major ones (Westerheide and Morimoto 2005). The Hsp70 family of stress proteins is an essential class of highly conserved molecular chaperones which are present in different cell types and cellular compartments (Bonomo et al. 2010). Hsp70s serve multiple roles in the prevention of protein aggregation, they are also involved in nascent protein folding, correct refolding of damaged polypeptides and assisting cellular protein translocation (Frydman 2001). A large number of studies (Köhler et al. 1999; Scheil et al. 2010; Hofmann 1999) have demonstrated that Hsp70 expression is closely linked to a variety of biotic and abiotic stress

factors showing a high sensitivity even to minor impacts. For example, Hallare and colleagues (2005) recorded an up-regulation of Hsp70 levels in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to contaminated sediments and organic extracts collected along the Laguna Lake, Philippines. Their study also confirmed, that developing zebrafish embryos are able to detect chemical stressors in their immediate environment (Kosmehl et al. 2012; Osterauer and Köhler 2008; Yang et al. 2009; Weigt et al. 2011).

Zebrafish are frequently used organisms in biological as well as in ecotoxicological research. The short and well characterized embryonic ontogenesis (for details see e.g. (Kimmel et al. 1995)(Kimmel et al. 1995) and the transparency of eggs offer a unique opportunity for developmental observations. The fish embryo test (FET) with the zebrafish is a reliable alternative to existing *in vivo* ecotoxicity test methods (Embry et al. 2010) for investigating the adverse effects of aquatic pollutants (Braunbeck et al. 2005; Hallare et al. 2004; Lammer et al. 2009; Nagel 2002). Compared to other toxicity screening assays, the FET is in most cases more sensitive than the acute toxicity test with adult zebrafish or than certain cell line tests (Lange et al. 1995).

The current work is part of an extended monitoring project focussing on the Neckar River system in the Tübingen area (Southern Germany). The Neckar River is an excellent model for ecotoxicological investigations, since it is still recovering from a former heavy pollution caused by rapid industrial development in the last five decades. Today, the water quality is considered as „moderate” according to the European Water Framework Directive (Haberbosch et al. 2012), however, there are still several wastewater loaded sections. Consequently, Braunbeck and colleagues (Braunbeck et al. 2009) reported genotoxic effects and strong histological impairments in roach (*Rutilus rutilus*) and gudgeon (*Gobio gobio*) from the lower Neckar region. Also sediment extracts from a Neckar River basin creek receiving treated hospital wastewater were found to exhibit strong aromatic hydrocarbon receptor-mediated effects in a rainbow trout liver cell line (RTL-W1) as well as high mutagenicity in the Salmonella microsome assay (Brack et al. 2005).

The present study investigates embryo- and proteotoxic effects of native Neckar River water and sediment from the Tübingen area collected in different seasons over two years. For this end, zebrafish embryo tests combined with an analysis of the stress protein Hsp70 in newly hatched larvae were conducted. Additionally, measurements of physico-chemical parameters were carried out in order to provide basic information about the limnological conditions at the

river sections. Our goals are on the one hand, the evaluation of early developmental responses of zebrafish to native environmental samples at the whole organism level as well as on the cellular level, and on the other hand, the assessment of the ecotoxicological consequences of small-scale time and spatial variation in a model aquatic system.

2.3 Methods

2.3.1 Ethics statement

Zebrafish were maintained according to the European Union Animals Ethics Directive (European Union 2010). Fish embryo tests were carried out on the non-protected embryonal and larval stages. Experiments with extended exposure times (168 h) were approved by the animal ethics committee of the Regional Council Tübingen (permission number: ZP 2/11). Zebrafish embryos and larvae were sacrificed through an anaesthetic overdose of 40 mg/ml benzocaine solution.

2.3.2 Sampling sites

For the current project four sites were selected along the Neckar River in the Tübingen region (Fig. 1). The first sampling site (S1) was located 150 m downstream of the local sewage treatment plant (STP) discharger (N9° 6' 41.08'' E48° 32' 16.44''). The Tübingen STP is a conventional municipal treatment plant with no additional upgrades and a daily load between 40.000 and 50.000 m³ (EBT – Disposal Operating Tübingen (Entsorgungsbetriebe Tübingen) 2005). At S1, the Neckar River is about 20 m wide, 2 m deep with a flow velocity between 0.3-0.5 m/s (depending on raining events). The second site (S2) was situated 1 km upstream of the local STP and 100 m downstream of the influent of the Ammer River (N9° 5' 19.97'' E48° 31' 34.32''). It reveals a flow velocity of 0.2 m/s, a width of 36 m and a depth of 2 m. In the past few years there were organic contaminants detected in the Ammer River: polycyclic aromatic hydrocarbons were found in sediment with a concentration ranging from 112 to 22.900 ng/g dry weight (Liu et al. 2013), an accumulation of polychlorinated biphenyls in tissues of brown trouts was observed as well (Beisswenger 2010). On this account, a third site (S3) was assigned located 800 m upstream of the Ammer lead in (N9° 5' 1.28'' E48° 31' 23.05'') with a flow velocity of 0.3-0.5 m/s, a width of 40m and an overall depth of

approximately 1 m. The Steinlach River leads into the Neckar River about 300 m upstream of S3, its water quality is considered good and showed recently a strong improvement (Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg 2012) contrary to the Ammer. The fourth sampling site (S4) was located about 4.2 km upstream, outside the city area (N9° 1' 8.76'' E48° 29' 59.24'') where no STP effluents are registered in the close proximity. The flow velocity of the Neckar River at this site ranges between 0.1-0.3 m/s, its overall width is 30 m, the depth 1.2 m.

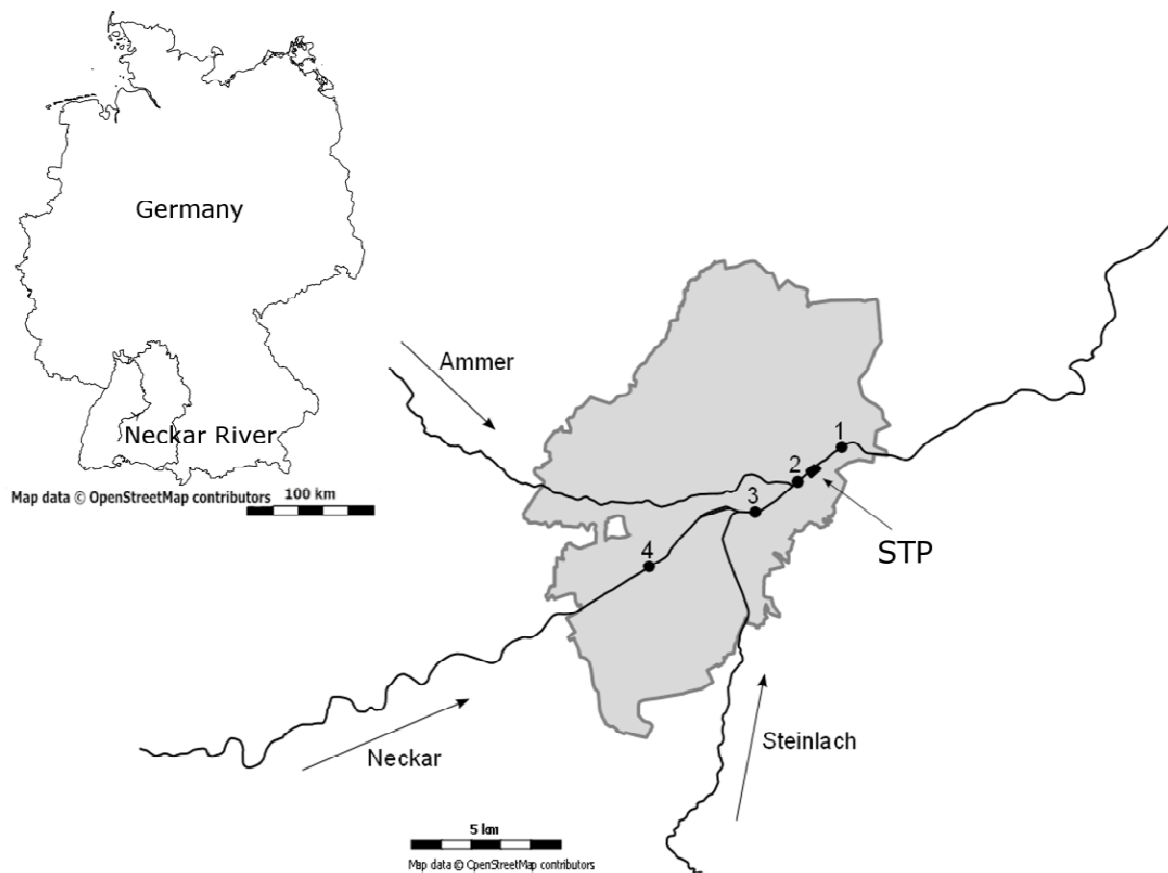


Figure 1: Neckar River overview and sampling sites in the Tübingen area. S1: downstream of the local STP; S2: upstream of the STP and downstream of Ammer lead-in; S3: upstream of the Ammer lead-in; S4: Tübingen-Hirschau. Arrows indicate the stream direction. Map source: Open Street Maps.

2.3.3 Sampling events

Monitoring was conducted over two years: during 2011 and 2012. Sampling was performed two times per year: in May and September. At this point, the authors want to highlight that S2 was subsequently added to the study in 2012, thus in 2011 only S1, S3 and S4 were investigated.

For the fish embryo test and Hsp70 analysis, 2 L water and 200 g fine-grained sediment from the upper aerobic layers were taken near the riverbank in sterile glass flasks (Schott Duran, Mainz, Germany) at each sampling site. Samples were transported in a cooling box at approximately 4 °C to the laboratory facility of the Animal Physiological Ecology Group of the University of Tübingen. Water samples were divided into 0.5 L glass flasks (Schott Duran) while sediment was distributed into 50 g packages wrapped in aluminium foil (Roth, Karlsruhe, Germany). Neckar River water and sediment were frozen immediately and stored at -20 °C until further use.

2.3.4 Physico-chemical water parameter

On the day of sampling, air and water temperature were measured close to the riverbank with a Multi-Thermometer (Voltcraft, Hirschau, Germany) at all field sites. Oxygen, pH, and conductivity levels were captured through sensors (Oxi 340-A/SET, pH 330/SET TRW, LF 330/SET, WTW, Weilheim, Germany) on the same spots where water and sediment were obtained for the biotests. Additionally, 1 L water was collected in a sterile glass flask (Schott Duran) at all Neckar River sites and transported to the laboratory facility of the Animal Physiological Ecology Group of the Tübingen University in a cooling box (4 °C). Chloride, nitrate, nitrite, ammonium, phosphate (test kits from Macherey-Nagel, Düren, Germany), carbonate and overall hardness (test kits from Merck, Darmstadt, Germany) levels of the water samples were determined immediately. Classification of the water quality was carried out according to the directives of the German Working Group for Water Issues (LAWA) including seven assessment groups: class I- unpolluted to very slightly polluted, class I-II- slightly polluted, class II- moderately polluted, class II-III- critically polluted, class III- heavily polluted, class III-IV- very heavily polluted and class IV- excessively polluted (Federal Environmental Agency 2013).

2.3.5 Maintenance and breeding of zebrafish

The Animal Physiological Ecology Group of the Tübingen University reared several stocks of zebrafish based on the West Aquarium strain. Fish were kept at 26 ± 1 °C in 100-200 L tanks in filtered (AE-2L water filter equipped with an ABL-0240-29 activated carbon filter (0,3 µm), Reiser, Seligenstadt, Germany) tap water under semi static conditions, with 30 % of water volume being exchanged every 14 days. The room was light-isolated, and an artificial dark-light cycle of 12:12 hours was maintained. Animals were fed three times daily with dry flake food (TetraMin™, Tetra, Melle, Germany) and additionally with freshly hatched Artemia larvae (Sanders, Mt. Green, USA) on the day before spawning. For egg production, a stainless steel grid box with a mesh size of 1.5 mm in a plastic basin was positioned in the bottom of the aquaria on the evening before spawning. The grid allowed the passage of eggs into the separate spawning tray, thus preventing predation by adult zebrafish, while green plastic wire material adjusted to the boxes served as spawning stimulus. Spawning took place in the early morning period after the onset of light. Eggs were collected 30 – 60 min after spawning.

2.3.6 The fish embryo test

For each sampling event, two independent replicates (two tests at different time points) of the fish embryo test were conducted according to the work of Hallare and colleagues (Hallare et al. 2005). On the evening before test onset, five glass Petri dishes (30 mm diameter with cover, Schott Duran) per each field site were saturated with approximately 2.5 g of the corresponding Neckar River sediment and filled with the appropriate water sample to the top. For negative control, additional five Petri dishes were saturated with reconstituted soft water according to ISO 7346/3 (ISO 1996). Test dishes were incubated in a heating cabinet (Aqualytic, Dortmund, Germany) at 26 ± 1 °C overnight.

On the morning of the test onset, saturation medium was replaced with 2.5 g of the corresponding sediment sample and Petri dishes were filled with the appropriate Neckar water to the top. There were identical water and sediment batches used for the saturation step and for the actual test. Reconstituted soft water of the negative control was changed as well. Freshly laid eggs (max 60 min post fertilisation) were collected from the aquaria and were immediately distributed into sterile 90 mm diameter glass Petri dishes (Schott Duran) filled

with Neckar water samples and ISO water respectively (one dish per treatment). Thus, exposure circumstances were ensured from the very beginning of the development. After 2 h incubation at 26°C, 5 fertilized embryos were transferred subsequently into each test Petri glass from the corresponding pre-exposure dish. Embryos were incubated in a heating cabinet at 26±1 °C for 96 h at a 12:12 h dark-light cycle. Coagulated embryos were removed daily. If necessary, the amount of evaporated water was substituted from the corresponding sample batch. The development of embryos was observed through a binocular (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany) at several time points (6, 12, 24, 48, 60, 72, 84 and 96 hours post-fertilization (hpf). Mortality was recorded at all observation events. Heartbeat was assessed at the age of 48 hpf: for each embryo heartbeats were counted for 20 s, test dishes were evaluated in a random order to avoid temperature effects. Developmental retardation and failures were recorded at relevant time points (Tab. 1). Retardation and failure rates for each time point were estimated as percentage of the observed retardations or failures divided by the total possible ones. The time of hatching was recorded between 60 and 96 hpf. Mean hatching times (50% of the individuals hatched) were estimated as well.

Table 1: Endpoints of the fish embryo test with the zebrafish. Based on Nagel (Nagel 2002).

Observed endpoints	Hours post fertilisation							
	8h	12h	24h	48h	60h	72h	84h	96h
Mortality	•	•	•	•	•	•	•	•
Hatching					•	•	•	•
Slowed ontogenesis/retardation								
Epiboly	•							
Gastrulation		•						
Exogastrulation		•						
Formation of somites			•					
Tail detachment			•					
Spontaneous movements			•					
Development of eyes			•					
Number of heart beat (beat/min)				•				
Blood circulation				•				
Sacculi/otolith formation					•			
Presence of melanocytes					•			
Developmental failures								
Oedema					•	•	•	•
Malformation of head					•	•	•	•
Tail deformation						•	•	•
Pigmentation failure						•	•	•
Helical body						•	•	•
Scoliosis						•	•	•

2.3.7 Hsp70 quantification

For each sampling site, three 90 mm diameter glass Petri dishes (Schott Duran) were saturated with 12.5 g Neckar River sediment and were filled with the corresponding water sample to the top the day before test onset. Reconstituted soft water according to ISO 7346/3 served as negative control. On the next morning, saturation media was replaced with the same amount of water and sediment from the identical sample batch. In the following step, 50 freshly laid (30-60 min post fertilization) zebrafish eggs were placed into each dish. Embryos were incubated in a heating cabinet for 168 h by the same conditions as described in the FET. Coagulated embryos were removed daily. The amount of evaporated water was replaced from the corresponding sample batch if necessary. At the end of the exposure, newly hatched larvae were collected by pouring the water carefully from the Petri dish through a cellulose paper filter (595 ½, 185 mm diameter, Schleicher&Schüll, Dassel, Germany). Eight larvae were pooled into an Eppendorf tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) and frozen immediately in liquid nitrogen. Samples were stored at -20°C until further processing.

Hsp70 quantification was carried out based on the work of Hallare and colleagues (Hallare et al. 2004). Pooled zebrafish larvae were ultrasonically homogenized in 20 µl extraction buffer (80 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 20 mM Hepes pH 7.5 (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) for 5 s and centrifuged for 12 min by 20 000g. The total protein concentration for each supernatant was determined according to the method of Bradford (Bradford 1976). Supernatants for the actual Hsp70 analysis were diluted 2:1 with 3% sodium dodecyl sulfate (SDS) in TRIS buffer (pH 7) (Sigma Aldrich) and heated by 96 °C for 5 min. For each sample 10 µg total protein per lane were loaded on a minigel SDS page. Two lanes per gel were filled with 4 µL of a reference homogenate (standard) made of adult zebrafish in order to ensure comparability. Electrophoresis took place at 80 V for 15 min followed by 120 V for approximately 90 min at 360 mA. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Macherey-Nagel) by semi-dry blotting by 10 V and 90 mA/filter for 2 h. After blotting, filters were incubated for 2 h in a blocking solution (1:1 horse serum (Sigma Aldrich) - Tris-buffered saline (TBS) pH 5.7 (Roth) at room temperature. Hsp70 bands were marked with a mouse anti-human Hsp70 monoclonal antibody (Dianova, Hamburg, Germany) (diluted 1:5000 in 1:9 horse serum/TBS) and incubated overnight at room temperature. After rinsing the filter in TBS, a goat anti-mouse IgG (H+L) antibody coupled to peroxidase (Dianova) (diluted 1:1000 in 1:9 horse serum/TBS) was applied. Following 2 h incubation,

antibody complex was detected by chloronaphthol (Sigma Aldrich) and 0.015% hydrogen peroxide (Sigma Aldrich) resolved in Tris buffer (pH 8.5) containing 6% methanol. After digitalization of the filters, grey value intensity of Hsp70 bands was measured by densitometric image analysis (Herolab E.A.S.Y., Wiesloch, Germany). Sample Hsp70 levels were normalised by the mean of the two internal standards (reference homogenate) of the corresponding filter.

2.3.8 Statistical analysis

Mortality during the whole FET time span was evaluated through Cox Proportional Hazards analysis, a survival model considering multiple observation events (Smith and Smith 2003) used in clinical, epidemiologic and also in ecotoxicological (Newman and McCloskey 1996) research. Fisher's Exact tests (2-tailed) were carried out with the absolute numbers of developmental retardations at 60 hpf, developmental failures at 96 hpf and hatched individuals at 96 hpf. In the Fisher's Exact test Neckar River exposure groups and negative control were always compared pair wise. According to this, significance levels were adjusted using the Holm-Bonferroni method. For the evaluation of embryonic heartbeat and larval Hsp70 level, data was first tested for normal distribution using the Shapiro-Wilks test, in the following step variance homogeneity was assessed with the Levene test. Where parameter assumptions were met, differences between exposure groups were determined using an all pairs Tukey-Kramer test. Data with non-normal distributions or inhomogeneous variances were analysed through the nonparametric Steel-Dwass method. Statistical analysis was carried out using SAS JMP Version 9.0 (SAS Institute GmbH, Böblingen, Germany).

2.4 Results

2.4.1 Physico-chemical water properties

The Neckar River revealed good dissolved oxygen conditions and a normal pH and hardness range at all sampling sites over both seasons and years (Tab. 2 and 3). According to the LAWA water classification, nitrite-N values varied between the classes I and I- II, nitrate-N concentrations were between class III and subclass III-IV, ammonium-N concentrates lay overall below 0.04 mg/L (class I) during the four sampling events. Chloride ions were

detected between subclass I-II and class II, the highest values occurred generally at S1 (downstream of the STP lead-in). Extremely high phosphate values (subclass III-IV and class IV) were found in May 2011 at S3 (upstream of the Ammer lead-in) and S4 (Tübingen-Hirschau), while in 2012 the average range was in class II and subclass II-III.

Table 2: Basic physical and chemical conditions at three sampling sites along the Neckar River in 2011. Water classification was based on the directives of the German Working Group for Water Issues (LAWA): class I (dark blue)- unpolluted to very slightly polluted, class I-II (light blue)- slightly polluted, class II (dark green)- moderately class II-III (light green)- critically polluted, class III (yellow)- heavily polluted, class III-IV (orange)- very heavily polluted and class IV (red)- excessively polluted (Federal Environmental Agency 2013). In May 2011 conductivity measurements could not be carried out because of equipment failure. Ammonium-N values are given in a range due to detecting limitations.

Physicochemical features	Site 1		Site 3		Site 4	
	May	September	May	September	May	September
Air temperature (°C)	8.9	15.3	11.7	18.7	11.6	19.9
Water temperature (°C)	13.5	17.2	13.3	17.9	14.4	18.2
O ₂ (mg/L)	9.5	7.8	11.7	9.2	11.6	9.4
O ₂ (%)	96	83	106	99	123	99
Conductivity (µS)	-	901	-	930	-	904
pH	8.12	8.05	8.21	8.34	8.39	8.39
Nitrite-N (mg/L)	0.03	0.01	0.04	0.02	0.04	0.02
Nitrate-N (mg/L)	5.6	4.2	2.1	3.3	5.3	3.0
Ammonium-N (mg/L)	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
Chloride (mg/L)	88.7	58	54.81	60	58.02	50
Ortho-Phosphate-P (mg/L)	0.23	0.06	0.74	0.08	1.11	0.05
Overall hardness (°dH)	29	26	30	27	30	28
Carbonate hardness (°dH)	17	13	16	14	16	16

Table 3: Basic physical and chemical conditions at four sampling sites along the Neckar River in 2012. Water classification was based on the directives of the German Working Group for Water Issues (LAWA): class I (dark blue)- unpolluted to very slightly polluted, class I-II (light blue)- slightly polluted, class II (dark green)- moderately polluted, class II-III (light green)- critically polluted, class III (yellow)- heavily polluted, class III-IV (orange)- very heavily polluted and class IV (red)- excessively polluted (Federal Environmental Agency 2013). Ammonium-N values are given in a range because of detecting limitations.

Physicochemical features	Site 1		Site 2		Site 3		Site 4	
	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.
Air temperature (°C)	13.3	17.4	15.3	21.0	24.1	27.6	25.1	22.7
Water temperature (°C)	14.5	15.9	15.1	15.9	16.2	15.7	16.0	16.1
O ₂ (mg/L)	9.7	9.56	9.55	9.21	11.82	10.6	11.8	13.24
O ₂ (%)	99.1	101.2	97.3	95.1	112	107.2	108	134
Conductivity (µS)	924	1035	901	953	889	938	849	937
pH	7.74	8.25	8.12	8.05	8.28	8.08	8.48	8.22
Nitrite-N (mg/L)	0.03	0.01	0.03	0.02	0.04	0.02	0.04	0.01
Nitrate-N (mg/L)	5.0	5.2	3.4	3.6	3.8	3.4	3.4	3.8
Ammonium-N (mg/L)	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
Chloride (mg/L)	58	70	51	55	50	55	46	55
Ortho-Phosphate-P (mg/L)	0.20	0.16	0.16	0.10	0.16	0.10	0.16	0.10
Overall hardness (°dH)	26	29	26	28	28	28	27	27
Carbonate hardness (°dH)	15	14	16	16	17	15	16	15

2.4.2 Fish embryo test

Exposure to Neckar River water and sediment induced numerous effects during zebrafish ontogenesis. In 2011 a significantly higher mortality was detected in embryos exposed to S4 water and sediment compared to the negative control (Fig. 2a and 2b). Only a minor mortality could be observed in the following spring (Fig. 2c), while in autumn 2012 all Neckar River samples induced an elevated mortality (Fig. 2d).

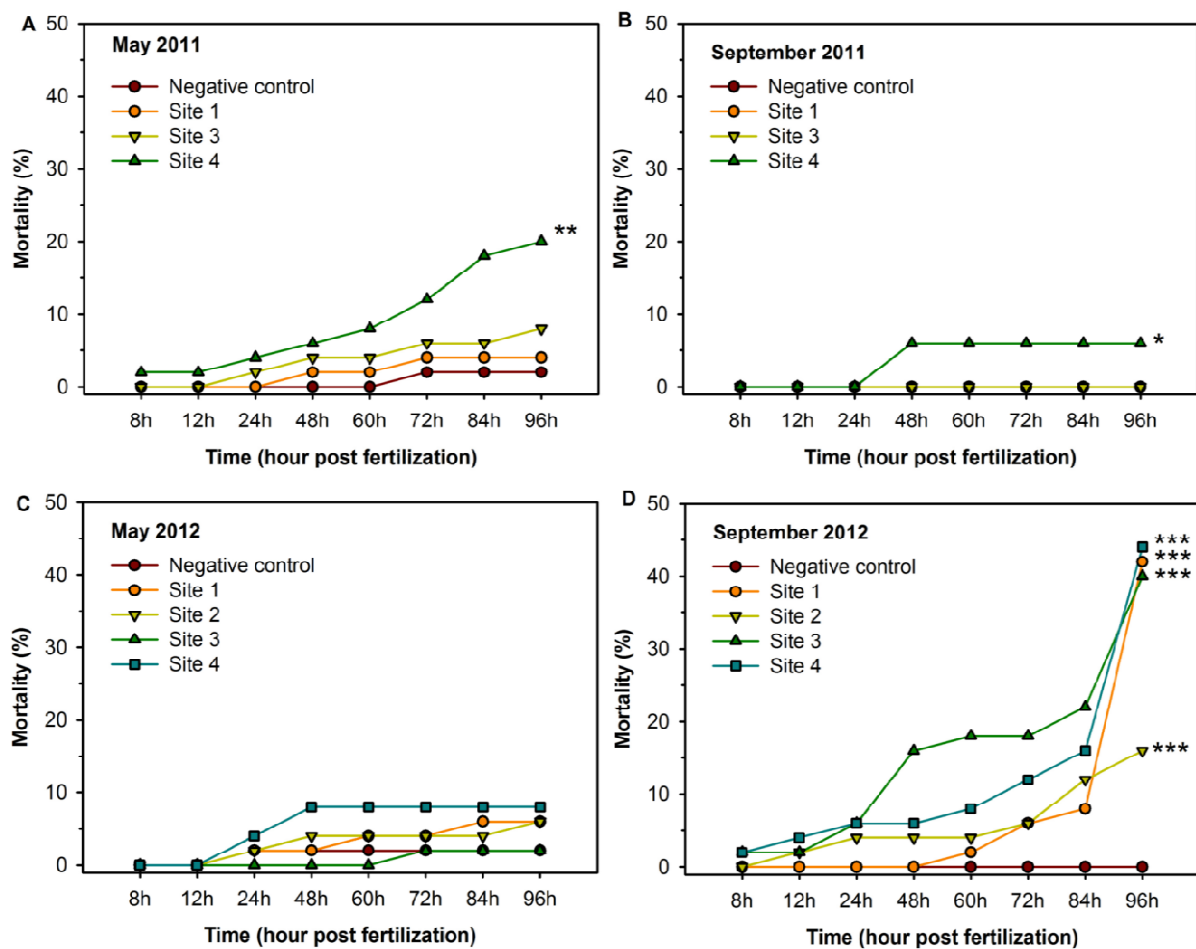


Figure 2: Mortality during the fish embryo test. Zebrafish embryos were exposed to Neckar River samples collected in May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Asterisks show significant differences ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $\alpha=0.05$) between sampling site exposure and negative control. Combined data of two replicates was assessed by the Cox Proportional Hazards survival model.

In the first 60 h of ontogenesis strong developmental retardations (delay of spontaneous contractions, low pigmentation, underdeveloped circulation system) were noted at S1 (May 2011, May and September 2012), S2 (May and September 2012), S3 (May 2011) and S4 (May and September in both years), (Fig. 3).

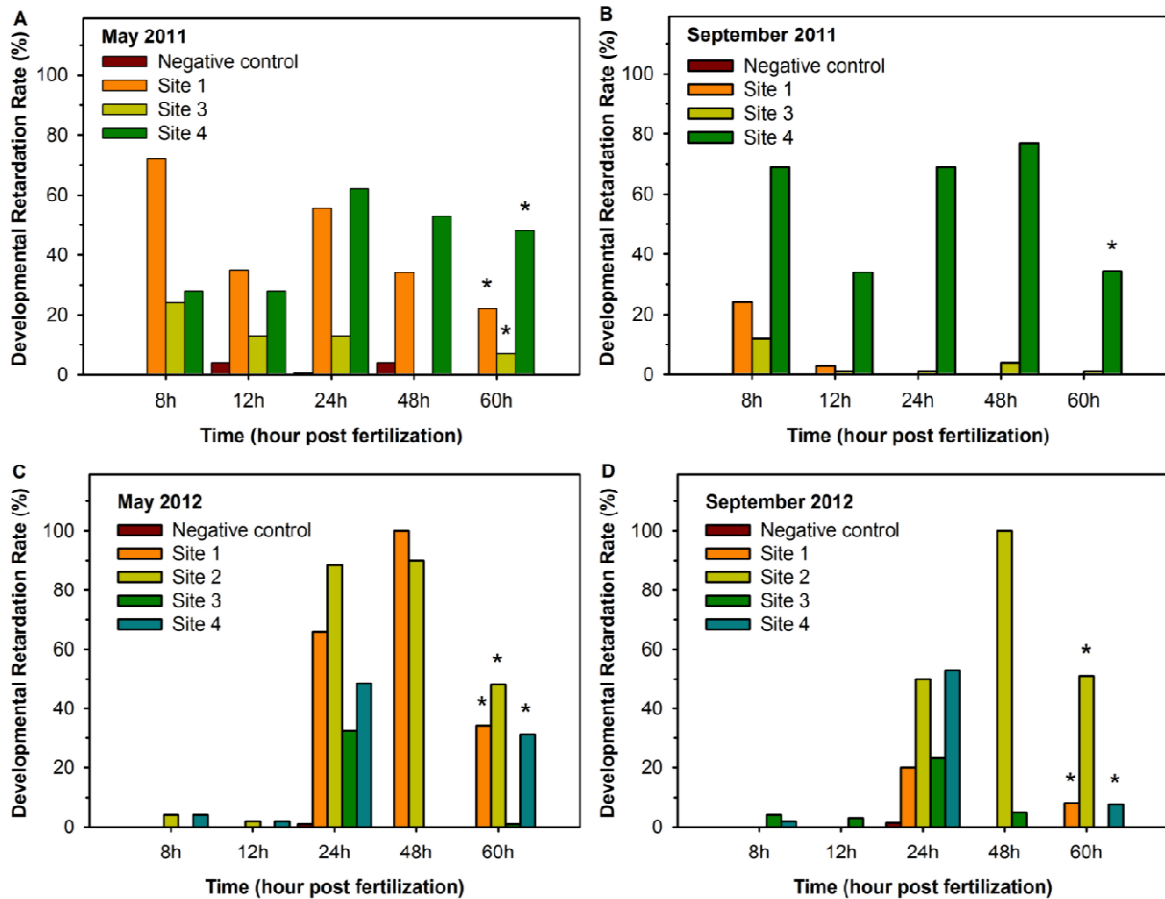


Figure 3: Developmental retardation rate of zebrafish embryos in the first 60 hpf. Fish embryo test with water and sediment from the Neckar River collected in May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Developmental retardation rate is given as percentage of the observed retardations divided by the total possible ones at appropriate time points. Vertical bars show the mean of two replicates. Asterisks show significant differences ($*p < \alpha$ when adjusted according to Holm Bonferroni's method) between sampling site exposure and negative control at 60 hpf assessed by Fisher's Exact test.

According to this, the above mentioned Neckar River samples also led to modified, or even to lack of heart beat of 48 hpf embryos (Fig. 4). During further ontogenesis, developmental failures (yolk and pericardial oedema, pigment failure and tail deformation) occurred in embryos exposed to water and sediment collected at S1 (May 2011, May and September 2012), S2 (May and September 2012), S3 (May and September in both years) and S4 (May and September in both years) (Fig. 5).

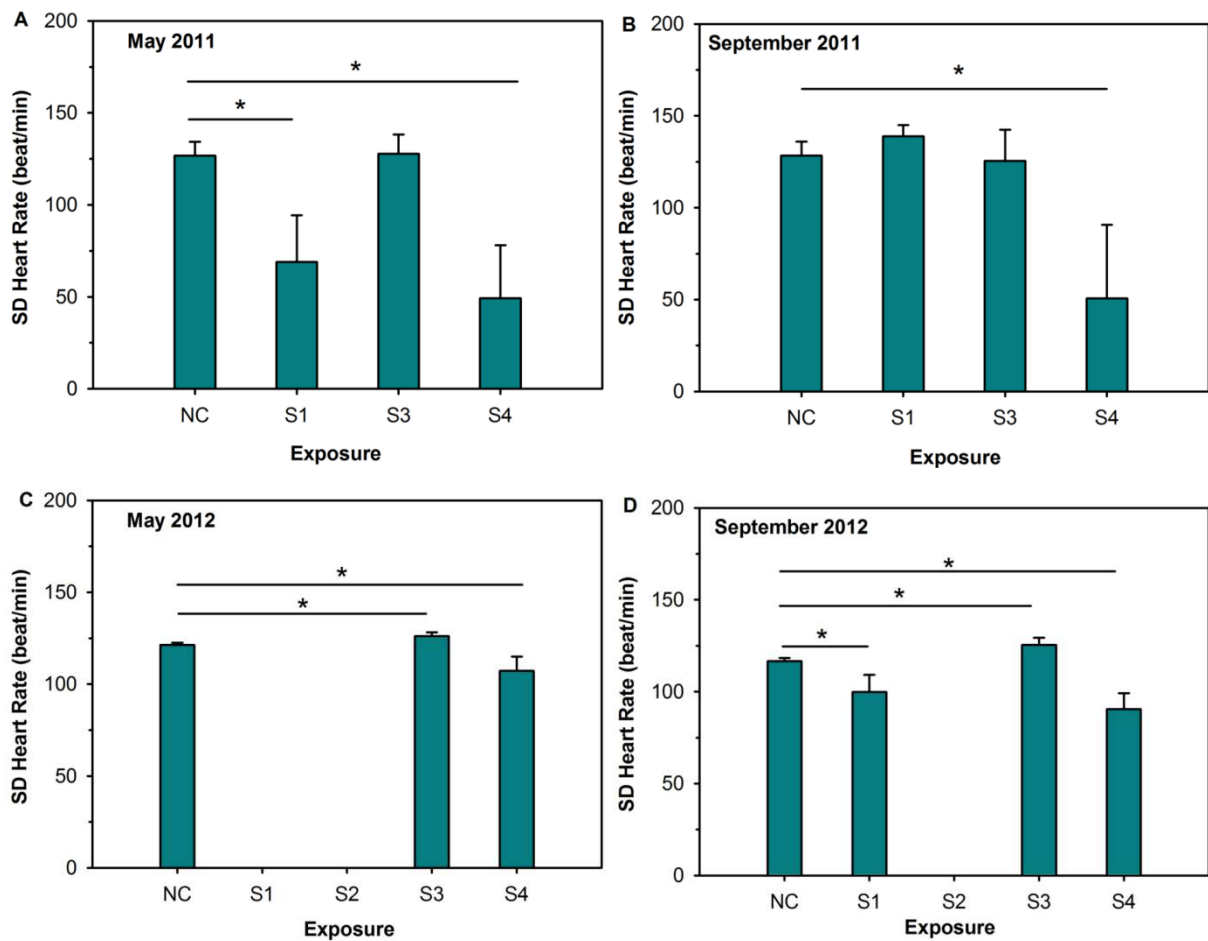


Figure 4: Heart rate of zebrafish embryos at 48 hpf during the fish embryo test. Embryos were exposed to Neckar River samples from May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Vertical bars show standard deviations. Asterisks indicate significant differences ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $\alpha=0.05$) between river sample treatment and negative control assessed by Tukey- Kramer test. Results of two independent replicates are shown.

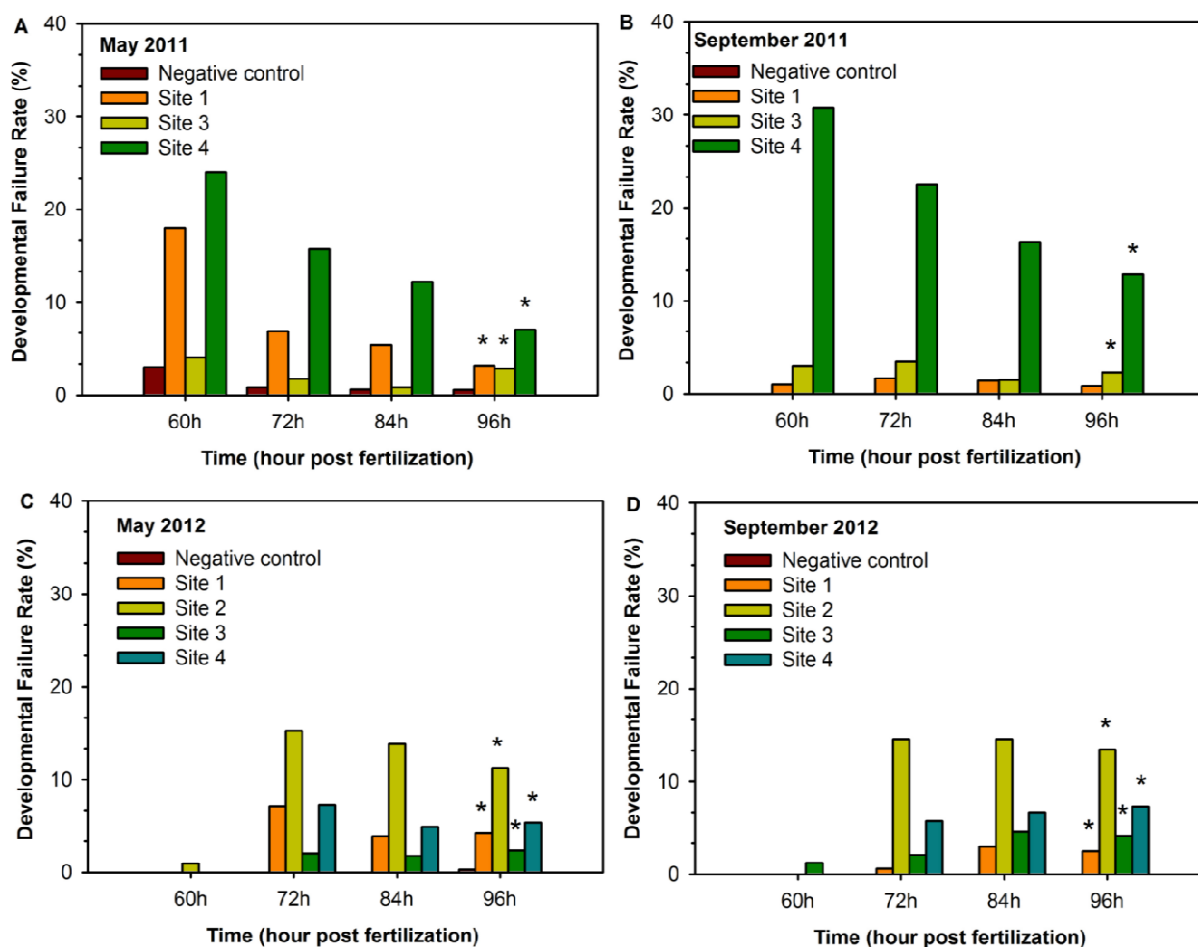


Figure 5: Developmental failure rate between 60 and 96 hpf during the fish embryo test. Zebrafish embryos were exposed to water and sediment collected at the Neckar River in May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Developmental failure rate is given as percentage of the observed failures divided by the total possible ones at appropriate time points. Vertical bars show the mean of two replicates. Asterisks indicate significant differences ($*p < \alpha$ when adjusted according to Holm Bonferroni's method) between sampling site exposure and negative control at 96 hpf assessed by Fisher's Exact test.

Hatching occurred predominantly between 60 and 96 hpf. The main hatching times (50% of the surviving individuals reached hatching) are shown in Table 4. Generally, negative control embryos showed a mean hatching time between 66 and 72 hpf, furthermore, 100% of the surviving individuals reached the larval stage at the age of 96 hpf. In contrast, hatching success was significantly lower at S1 (May 2011), S2 (May and September 2012), S3 (September 2011, May 2012) and S4 (both years and seasons) (Fig. 6).

The strongest effects on hatching were induced by S2 samples with a mean hatching time of 93 hpf in May 2012, while in September 2012 only 26% of the individuals reached the larval stage at the end of the FET.

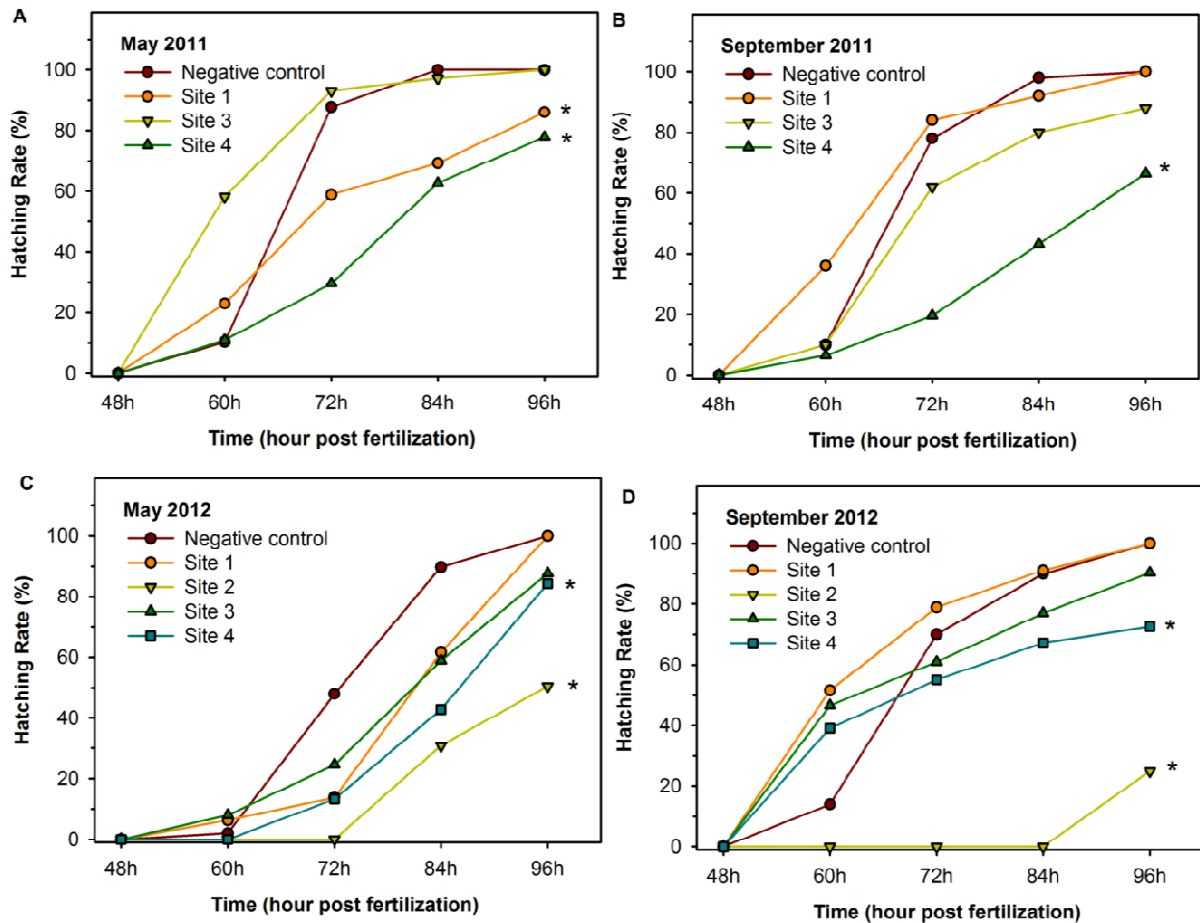


Figure 6: Hatching rate of zebrafish embryos during the fish embryo test. Embryos were exposed to water and sediment samples of the Neckar River from May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Hatching rate shows the percentage of hatched larvae in relation to the surviving individuals. The combined data of two replicates is shown. Asterisks indicate significant differences ($*p < \alpha$ when adjusted according to Holm Bonferroni's method) between sampling site exposure and negative control at 96 hpf assessed by Fisher's Exact test.

Table 4: Mean hatching times during the zebrafish embryo test. Mean hatching time is defined as the time point when 50% of the surviving fish embryos hatched. Mean hatching times were calculated in SigmaPlot 10.0 by graphic analysis of the combined hatching curves of two independent replicates.

Mean hatching time	Negative control	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
May 2011	66 hpf	69 hpf	n.a.	58 hpf	79 hpf
September 2011	67 hpf	63 hpf	n.a.	69 hpf	87 hpf
May 2012	72 hpf	81 hpf	93 hpf	81 hpf	85 hpf
September 2012	68 hpf	59 hpf	26% at 96hpf	63 hpf	68 hpf

2.4.3 Hsp70 Analysis

Neckar River water and sediment from S1 collected in May 2011 led to changes in Hsp70 level of newly hatched zebrafish larvae when compared to the negative control (Fig.7a). Autumn samples from the same year however, did not reveal any proteotoxic effects (Fig. 7b). In the following spring, S1 embryos showed a significantly lower Hsp70 level, while S3 samples led to a stress protein induction compared to the negative control (Fig. 7c). S2 embryos of the above mentioned sampling event did not manage to reach the larval stage, thus heat shock protein measurements could not be carried out. In contrast, S2 samples from autumn 2012 led to a significantly reduced Hsp70 level in comparison to the negative control (Fig. 7d).

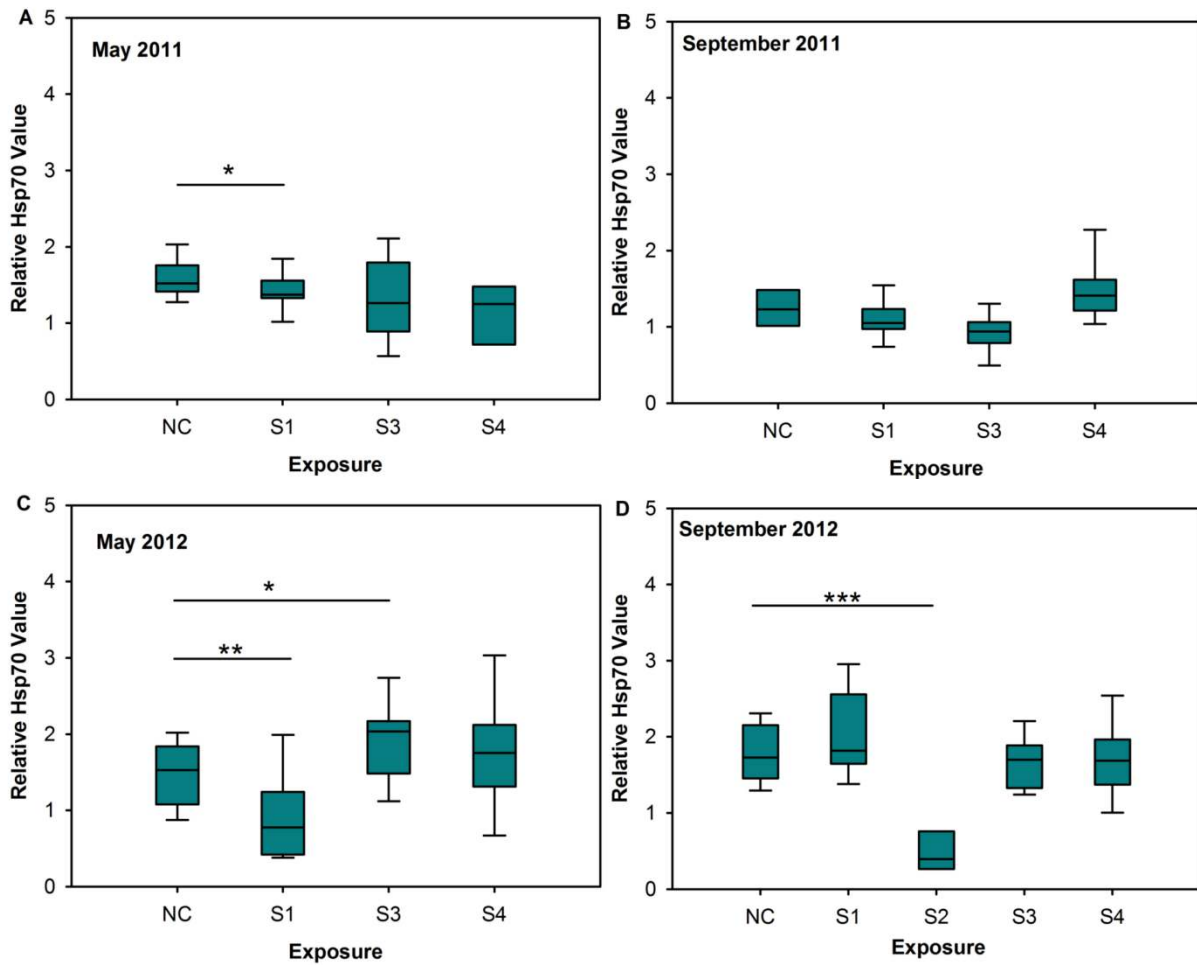


Figure 7: Relative Hsp70 value of 168 hpf zebrafish larvae. Larvae were exposed to Neckar River water and sediment collected in May 2011 (a), September 2011 (b), May 2012 (c) and September 2012 (d). Relative Hsp70 value is given in relation to the mean of two internal standards. Box plots represent medians and 5th/95th percentiles. Where $n < 10$ no plot whiskers are shown. Asterisks indicate significant ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $\alpha = 0.05$) differences between river sample treatment and negative control assessed by Steel-Dwass (nonparametric) or Tukey-Kramer (parametric) test.

2.5 Discussion

The present work reports spatial and temporal variations of embryo- and proteotoxic effects during the early development of zebrafish exposed to native Neckar River samples. A large number of studies revealed, that hydrological events such as high/low water discharges and sediment re-mobilization through heavy rainfall could lead to short-term toxicity changes and to a seasonal burden (Camacho-Muñoz et al. 2014; Gan et al. 2013; Hsieh et al. 2013; Hsu et al. 2007; Moliner-Martínez et al. 2013). There were strong water level alterations at the Neckar River and tributaries during the two years of investigation. An average gauge was recorded in the late spring 2011, while autumn rains led to an elevated water level. The Neckar River revealed in the following May a normal water level, while in September 2012 heavy raining events occurred again (stronger than in 2011).

S1 exposure led to developmental deficits during the zebrafish ontogenesis. Since the site mentioned was situated downstream of the Tübingen STP, a contaminant input through the municipal wastewater discharge has to be considered. As a further consequence of the STP presence (Giri and Singh 2013), increased chloride and nitrate values could be detected at S1. In 2011, a slower development and higher number of malformations were observed in spring compared to autumn. There are several studies reporting a lower contaminant level in the rainy period (Katip et al. 2012; Moliner-Martínez et al. 2013; Palma et al. 2010; Zhu et al. 2013), thus increased dilution of discharged contaminants may be a possible interpretation for lower embryotoxicity by autumn samples. Unexpectedly, in September 2012 an extraordinary high mortality was observed at all sites, especially after 84 hpf. Since heavy rainfalls occurred just shortly before this sampling event, there is a possibility of toxic input through untreated effluents of the STP storm water overflow and through urban runoff as well (VanLandeghem et al. 2012). The noticeable mortality increase after hatching can be elucidated through the barrier function of the embryonic chorion, which has a structure pierced by pore canals. Polymers and higher molecular weight surfactants for instance, are suspected to be blocked by the chorion (Henn and Braunbeck 2011).

Native samples from S2 induced numerous negative effects during zebrafish ontogenesis. The close proximity of the Ammer River lead in may explain the extremely slow development and malformations of the embryos, thus as mentioned before, a series of organic contaminants were reported in this Neckar River tributary. Liu and colleagues highlighted, that high flow events by the Ammer River may result in the redistribution of sediments (Liu et al. 2013),

which may clarify why autumn S2 samples induced stronger teratogenic impairments compared to the spring ones. A similar process was reported at the lower Neckar area as well: there were persistent organic compounds (polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons) detected in settling particulate matter (SPM) during a flood event in the Heidelberg region (Wolz et al. 2008). Hollert and co-workers (Hollert et al. 2000) investigated the cyto- and genotoxic potentials of the above mentioned river samples: SPM taken during the period of flood rise showed the highest cytotoxic activities in the neutral red retention assay, while the Ames test delivered no evidence for any genotoxic activity. Therefore, as consequence of flood events, runoff and remobilized sediments may cause an increase of ecotoxicologically relevant effects from contaminant reservoirs (Wolz et al. 2008).

S3 was located 800 m upstream of the Ammer River, with the Steinlach creek as the only lead-in. Our study confirmed the fact of Steinlach having a good water quality, since during the most sampling events only minor developmental abnormalities could be observed by the FET. Interestingly, in 2012 S3 embryos showed an increased heart rate compared to the negative control. This phenomena may be a sign for an elevated metabolism due to toxicant elimination, since heart beat frequency in fish can be strongly affected by the metabolic rate (Brown et al. 2005). In autumn 2012 an elevated mortality was detected at the whole investigated Neckar section, including S3. Here the potential pollution source is unclear as of jet, however, substance drifting from S4 due to the increased water level may be a reasonable possibility. As an evidence, in spring 2011 extraordinarily high phosphate concentrations were detected at S3, while S4 showed an even higher value.

S4 was considered as the most nature-close sampling site, since it was located outside the city area with no discharges in the close proximity, however, an agricultural activity was still present. Surprisingly, this site caused the highest mortality and heartbeat reduction during all four sampling events. Numerous developmental retardations and failures and lower hatching rates were recorded as well. One possible contaminant source could be the agricultural runoff, which may explain the strong embryotoxic effects and the elevated nitrate and phosphate levels in spring. Abandoned discharges and past substance burden would deliver further explanations; unfortunately, there is no information is available about these.

Parallel to the present study, Hollert and colleagues (Hollert et al. 2003) observed a broad range of embryotoxic effects of native water and sediments from the Heidelberg Neckar

region through the zebrafish sediment contact assay. Nevertheless, they also proved the suitability of the zebrafish embryo test for the analysis of complex environmental samples including whole sediments. According to their FET results, sediment extracts from the above mentioned area exhibited dioxin-like potentials when tested with the 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay on a permanent cell line (Hollert et al. 2002).

The present study is the first work reporting proteotoxic effects in the Neckar River. The results of the Hsp70 quantification in newly hatched zebrafish larvae provided additional information about the sublethal effects of environmental samples on the molecular level. There was a decreased heat shock protein level detected at S1 (May 2011 and 2012) and S2 (September 2012), while S3 (May 2012) exposure led to a stress protein induction when compared to the negative control. Elevated stress protein values indicate proteotoxic conditions, since heat shock proteins play an essential role in protein integrity maintenance and prevent aggregation (Porter and Janz 2003). Decreasing cellular heat shock protein amounts however, can be interpreted as signs of a very intense stress response (Eckwert et al. 1997) in which case the organism is heading towards physiological breakdown and destruction. For this reason, the molecular biomarker Hsp70 should be combined with additional methods such as histopathology (Rajeshkumar et al. 2013), biotransformation enzyme activity measurements (Mayon et al. 2006; Weber et al. 2002) etc. in order to provide reliable information on toxic effects in different organisms. For example, in the frame of an extended monitoring project at lake Constance tributaries Tribskorn and colleagues integrated Hsp70 measurements in a battery of chemical and biological methods also including the fish embryo test (Rita Tribskorn et al. 2013). The combination of the various techniques offered a way to establish plausible connections between the presence of micropollutants and the respective effects on fish health.

2.6 Conclusions

The current work is a field survey not only of local, but also of general relevance. The Neckar River proved to be an excellent model for ecotoxicological investigations due to the impact of variable anthropogenic pollutant sources. Toxicity alterations along the investigated river section could be connected to the potential pollution sources, sampling seasons and raining events. Our study highlighted, that a seasonal burden has to be taken into account during environmental monitoring. The *in vivo* assays applied in the present work focused on diverse

toxic aspects on different organisation levels of zebrafish, thus the fish embryo test revealed developmental toxicity on the organismal level while the analysis of the stress protein Hsp70 assessed proteotoxicity on the subcellular level. The basic physico-chemical measurements contributed only in a limited way to the interpretation of the FET results. Therefore, little is known about the actual toxic loads of the Neckar River in the Tübingen area. The authors also want to highlight, that the present work focussed only on the effects of a short term exposure in a laboratory model organism to environmental samples; the physiological responses of indigenous animals, long-term consequences and cause-effect relationships (biological data combined with chemical analysis results) will be discussed in the frame of further publications.

2.7 Acknowledgements

The authors acknowledge to the Carl Zeiss Foundation, to the Foundation of the Landesnaturschutzverband (LNV) Baden-Württemberg and to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Open Access Publishing Fund of the Tübingen University for their financial support. Many thanks go also to the co-workers of the Animal Physiological Ecology Group of the Tübingen University, especially to Andreas Dieterich, Anja Henneberg, Stefanie Kraus, Diana Maier, Katharina Peschke, Alexandra Scheil, Simon Schwarz and Paul Thellmann for their technical assistance and help on the field. The authors want to thank the three anonymous reviewers for their constructive critics and useful suggestions.

2.8 References

- Beisswenger M (2010) Wieder Fische mit zu hohem PCB-Wert in der Ammer. http://www.tagblatt.de/Home/nachrichten/kreis-tuebingen/ammerbuch_artikel,-Wieder-Fische-mit-zu-hohem-PCB-Wert-in-der-Ammer-arid,98441.html. Accessed 13.06.2013.
- Bonomo J, Welsh JP, Manthiram K, Swartz JR (2010) Comparing the functional properties of the hsp70 chaperones, dnak and bip. *Biophysical Chemistry* 149 (1–2):58-66.
- Brack W, Schirmer K, Erdinger L, Hollert H (2005) Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-o-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (10):2445-2458.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2):248-254.
- Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz N (2005) Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. *Altex* 22:87-102.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P (2009) Fish populations under stress - the example of the lower Neckar river (Fischpopulationen unter Stress – das Beispiel des unteren Neckars). *Environmental Sciences Europe (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung)* 21 (2):197-211.
- Brown C, Gardner C, Braithwaite VA (2005) Differential stress responses in fish from areas of high- and low-predation pressure. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 175 (5):305-312.
- Camacho-Muñoz D, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2014) Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (southern Spain). *Science of The Total Environment* 468–469 (0):977-984.
- de la Torre FR, Salibián A, Ferrari L (2007) Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68 (8):1582-1590.
- EBT – Disposal Operating Tübingen (Entsorgungsbetriebe Tübingen) (2005) Service report 2004 (Anerkennung Dienstleistung 2004). <http://www.um.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/11336/>. Accessed 8.07.2013
- Eckwert H, Alberti G, Kohler H-R (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* 6 (5):249-262.
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillcrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97 (2):79-87.
- European Union (2010) Directive 2010/63/eu of the European parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* 276 (1):33-77.

- Federal Environmental Agency (2013) Chemical water quality classification, working group of the federal states on water issues (law). <http://www.umweltbundesamt.de/wasser-e/themen/fluesse-und-seen/fluesse/bewertung/chemische-gewaesserklassifikation.htm>. Accessed 10.05.2013.
- Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: The role of molecular chaperones. Annual Review of Biochemistry 70 (1):603.
- Gan W, Guo W, Mo J, He Y, Liu Y, Liu W, Liang Y, Yang X (2013) The occurrence of disinfection by-products in municipal drinking water in China's Pearl river delta and a multipathway cancer risk assessment. Science of The Total Environment 447 (0):108-115.
- Giri S, Singh AK (2014) Risk assessment, statistical source identification and seasonal fluctuation of dissolved metals in the Subarnarekha river, India. Journal of Hazardous Materials 265 (0):305-314.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? Life Sciences 86 (11–12):377-384.
- Haberbosch R, Hoffmann R, Wnuck H (2012) Fish fauna and fishing of the middle Neckar river (Vom Wildfluss zur Wasserstraße - Fischfauna und Fischerei im mittleren Neckar). 1 edn. VFG Service und Verlags GmbH, Stuttgart.
- Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler HR, Tribskorn R (2005) Assessing contamination levels of Laguna lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Science of The Total Environment 347 (1–3):254-271.
- Hallare AV, Köhler HR, Tribskorn R (2004) Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. Chemosphere 56 (7):659-666.
- Henn K, Braunbeck T (2011) Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 153 (1):91-98.
- Hofmann GE (1999) Ecologically relevant variation in induction and function of heat shock proteins in marine organisms. American Zoologist 39:889-900.
- Hollert H, Dürr M, Erdinger L, Braunbeck T (2000) Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. Environmental Toxicology and Chemistry 19 (3):528-534.
- Hollert H, Dürr M, Olsman H, Halldin K, van Bavel B, Brack W, Tysklind M, Engwall M, Braunbeck T (2002) Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the river Neckar. Ecotoxicology 11 (5):323-336.
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Journal of Soils and Sediments 3 (3):197-207.
- Hsieh C-Y, Yang L, Kuo W-C, Zen Y-P (2013) Efficiencies of freshwater and estuarine constructed wetlands for phenolic endocrine disruptor removal in Taiwan. Science of The Total Environment 463–464 (0):182-191.

- Hsu P, Matthäi A, Heise S, Ahlf W (2007) Seasonal variation of sediment toxicity in the rivers Dommel and Elbe. *Environmental Pollution* 148 (3):817-823.
- ISO (1996) Water quality- determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* hamilton-buchanan (teleostei, cyprinidae)] iso 7346/3.
- Katip A, Karaer F, Ileri S, Sarmasik S, Aydogan N, Zenginay S (2012) Analysis and assessment of trace elements pollution in sediments of lake Uluabat, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 33 (5):961-968.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:253-310.
- Kosmehl T, Otte JC, Yang L, Legradi J, Bluhm K, Zinsmeister C, Keiter SH, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Strähle U, Hollert H (2012) A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. *Reproductive Toxicology* 33 (2):245-253.
- Köhler H-R, Eckwert H, Triebkorn R, Bengtsson G (1999) Interaction between tolerance and 70kda stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Applied Soil Ecology* 11 (1):43-52.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 149 (2):196-209.
- Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (2012) Umweltdaten 2012 Baden-Württemberg, vol 1. ABT Print und Medien GmbH Weinheim, Stuttgart.
- Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11):2087-2102.
- Liu Y, Beckingham B, Ruegner H, Li Z, Ma L, Schwientek M, Xie H, Zhao J, Grathwohl P (2013) Comparison of sedimentary PAHs in the rivers of Ammer (Germany) and Liangtan (China): Differences between early- and newly-industrialized countries. *Environmental Science and Technology* 47 (2):701-709.
- Mayon N, Bertrand A, Leroy D, Malbrouck C, Mandiki SNM, Silvestre F, Goffart A, Thomé J-P, Kestemont P (2006) Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. *Science of The Total Environment* 367 (2-3):715-731.
- Moliner-Martínez Y, Herraiz-Hernandez R, Verdú-Andres J, Campíns-Falcó P, Garrido-Palanca C, Molins-Legua C, Seco A (2013) Study of the influence of temperature and precipitations on the levels of btex in natural waters. *Journal of Hazardous Materials* 263, Part 1 (0):131-138.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552 (1-2):247-268.
- Nagel R (2002) Dart: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.

- Newman MC, McCloskey JT (1996) Time-to-event analyses of ecotoxicity data. *Ecotoxicology* 5(5):187-196.
- Osterauer R, Köhler H-R (2008) Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86(4):485-494.
- Palma P, Alvarenga P, Palma V, Matos C, Fernandes R, Soares A, Barbosa I (2010) Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: A case study of the Alqueva reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* 17(3):703-716.
- Peakall D, B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 3:157-160.
- Porter CM, Janz DM (2003) Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(2):199-206.
- Rajeshkumar S, Mini J, Munuswamy N (2013) Effects of heavy metals on antioxidants and expression of hsp70 in different tissues of milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli island, Chennai, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98(0):8-18.
- Rita Triebkorn, Ludek Blaha, Brigitte Engesser, Hans Güde, Harald Hetzenauer, Anja Henneberg, Heinz-R. Köhler, Stefanie Kraiss, Diana Maier, Katharina Peschke, Paul Thellmann, Hans-J. Vogel, Bertram Kuch, Jörg Oehlmann, Magali Rault, Séverine Suchail, Peter Rey, Doreen Richter, Frank Sacher, Michael Weyhmüller, Wurm K (2013) SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 8:427-437.
- Scheil V, Zürn A, Köhler H-R, Triebkorn R (2010) Embryo development, stress protein (hsp70) responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environmental Toxicology* 25(1):83-93.
- Smith T, Smith B Survival analysis using cox proportional hazards modeling for single and multiple event time data. In: SAS Conference Proceedings: SAS Users Group International 28, 2003. pp 245-228.
- VanLandeghem MM, Meyer MD, Cox SB, Sharma B, Patiño R (2012) Spatial and temporal patterns of surface water quality and ichthyotoxicity in urban and rural river basins in Texas. *Water Research* 46(20):6638-6651.
- Walker CH (1995) Biochemical biomarkers in ecotoxicology — some recent developments. *Science of The Total Environment* 171(1–3):189-195.
- Weber LP, Diamond SL, Bandiera SM, Janz DM (2002) Expression of hsp70 and cyp1a protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to β -naphthoflavone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131(3):387-394.
- Weigt S, Huebler N, Strecker R, Braunbeck T, Broschard TH (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281(1–3):25-36.
- Westerheide SD, Morimoto RI (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *Journal of Biological Chemistry* 280(39):33097-33100.

- Wolz J, Engwall M, Maletz S, Olsman 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. *Environ Science and Pollution Research* 15 (7):536-553.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U (2009) Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology* 28 (2):245-253.
- Zhu S, Chen H, Li J (2013) Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan lake basin, Eastern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96 (0):154-159.

2.9 Abbreviations

FET: fish embryo test

Hpf: hours post fertilization

Hsp: heat shock protein

LAWA: German Working Group for Water Issues (Länderarbeitsgemeinschaft Wasser)

NC: negative control

STP: sewage treatment plant

S1: site one (downstream of the Tübingen sewage treatment plant)

S2: site two (upstream of the Tübingen sewage treatment plant)

S3: site three (upstream of the Ammer lead-in)

S4: site four (outside the Tübingen city area)

Kapitel 3: Charakterisierung des Gesundheitszustandes von residenten Fischen und Flohkrebse im Neckar bei Tübingen mit Hilfe von Biomarkern (Passives Umweltmonitoring)

Krisztina Vincze¹, Volker Scheil¹, Rita Triebkorn^{1,2}

¹ *Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere, Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Deutschland*

² *Steinbeis-Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Deutschland*

Unpubliziertes Manuskript

3.1 Einleitung

Der 367 km lange Neckar kann in vielerlei Hinsicht als Modell für die Belastung von Fließgewässern in Mitteleuropa gelten, da er einer Vielzahl anthropogener Nutzungen unterworfen ist (Braunbeck et al. 2009). In den 20er Jahren des 19. Jahrhunderts nutzte man die technischen Möglichkeiten, den Neckar an die Schifffahrt anzupassen. Durch Ausbau und Aufstau wurde die Gewässerstruktur massiv beeinträchtigt, so dass die Funktion als Fließgewässerlebensraum weitgehend verloren ging. Zu Beginn der 70er Jahre verschlechterte sich die Wasserqualität des Neckars durch Industrialisierung und zunehmende Gewässerbelastung immer mehr, infolgedessen konnten nur wenige anspruchslose Fischarten überleben (Haberbosch et al. 2012). Im Neckar-Einzugsgebiet leben heute etwa 5 Millionen Menschen. Die vielfältige Nutzung als Brauchwasserressource und Wasserstraße sowie die Wasserkraftgewinnung und die zahlreichen Kläranlagen bedeuten noch immer erhebliche Eingriffe in die ökologische Balance (Ikone- Integrierende Konzeption Neckar-Einzugsgebiet 2003).

Durch Fortschritte in der Reinigung kommunaler und industrieller Abwässer hat sich aber die Gewässergüte im Neckar in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert (Regierungspräsidium Stuttgart. 2005). Zudem strebt die EU seit 2000 durch das Inkrafttreten der

Wasserrahmenrichtlinie die Erhaltung und Verbesserung aquatischer Lebensräume und einen „guten ökologischen Zustand“ (spätestens bis 2027) der Gewässer an (Europäische Union 2000).

Laut der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg ist der obere Neckar (bis zur Filsmündung) bis auf kurze Abschnitte überwiegend „mäßig belastet“ (Güteklasse II). Nach dem Übergang zum schiffbaren Neckarbereich (ab Stuttgart) ändert sich die Güteklasse zu „kritisch belastet“ (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 2005).

Obwohl laut Ergebnissen aus etablierten Gewässergüteuntersuchungen am Neckar in den letzten Jahren Selbstreinigungsvorgänge und Regenerationsprozesse stattfinden, hat sich eine entsprechende Erholung der Fischpopulationen noch nicht eingestellt (Braunbeck et al. 2009). Dieser Fakt wird durch mehrere Studien gestützt: In den 90er Jahren wurde in den Geweben von Neckarfischen eine Reihe polychlorierter Biphenyle (Haiber and Schöler 1994), polychlorierter dibenzo-p-Dioxine und Dibenzofurane (Frommberger 1991) sowie methyl-, ethyl- und phenyl- Quecksilber (Falter and Schöler 1994) detektiert. Im Zusammenhang mit diesen analytischen Befunden konnten vor einigen Jahre noch immer deutliche Störungen in der Leberultrastruktur bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und Gründlingen (*Gobio gobio*) des unteren Neckars nachgewiesen werden, was auf eine starke Stressreaktion der Fische hinweist (Braunbeck et al. 2009).

Nicht nur Fische, sondern auch wirbellose Tiere werden häufig als gewässerökologische Indikatoren genutzt. Neben der klassischen Gewässergütebestimmung, welche u. A. auf der Abundanz ausgewählter wirbelloser Arten (Errechnung des Saprobienindex, DIN 38 410) basiert (Landesamt für Natur Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen 2007), besteht auch die Möglichkeit anhand der Parasitierungsrate, Fekundität, Alters- und Geschlechter-Zusammensetzung von Wirbellosenpopulationen, oder auch durch die Erfassung des Gesundheitszustandes einzelner Individuen mittels Biomarkern, aquatische Lebensräume in ökotoxikologischer Hinsicht zu charakterisieren. Biomarker sind definiert als biologische Veränderungen von Organismen (zum Beispiel Induktion von Stressproteinen und Biotransformationsenzymen, ultrastrukturelle Veränderungen von Zellen, histologische und immunologische Effekte usw.) die durch Exposition gegenüber Umweltchemikalien verursacht wurden (Peakall 1994).

Peschke et al. (2014) untersuchten zum Beispiel im Bodensee-Einzugsgebiet die Auswirkungen einer Schadstoffbelastung durch Kläranlagen und Regenüberlaufbecken auf

die Makrozoobenthos-Gemeinschaft und auf den Gesundheitszustand von Flohkrebse (Gammariden) mit Hilfe populationsökologischer, biochemischer und histopathologischer Methoden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Wirbellosen-Gemeinschaften als auch der physiologische Zustand der Flohkrebse durch die toxischen Einträge beeinflusst wurden. Im Fall der Gammariden wurde durch mehrere Studien bereits nachgewiesen, dass diese Organismen neben Fischen ebenfalls empfindlich auf Schadstoffe reagieren können (Charles et al. 2014; Schirling et al. 2006), es gibt jedoch zurzeit nur wenig Freilandstudien, welche den Gesundheitszustand dieser Tiere als Werkzeug zur Erfassung der Wasserqualität nutzen. Im Fall des Neckars liegen zum Beispiel soweit keinerlei Informationen bezüglich des Gesundheitszustands von Flohkrebse vor.

In der vorliegenden Studie wurde der ökologische Zustand des Neckars bei Tübingen mittels Biomarkeruntersuchungen an vor Ort entnommenen Fischen und Flohkrebse charakterisiert (passives Umweltmonitoring). Zu diesem Zweck wurden im Jahr 2011 Tiere an mehreren Probestellen entlang des Neckars innerhalb einer 10 km langen Strecke zwischen Tübingen-Hirschau und Tübingen-Lustnau beprobt. In Zusammenarbeit mit dem Tübinger Kreisfischereiverein wurden Blut- und Gewebeprobe von Döbeln (*Leuciscus cephalus*) entnommen. Zusätzlich wurden an allen Standorten Flussflohkrebe (*Gammarus roeseli*) gesammelt, um die vielfältigen Reaktionen von Wirbellosen und Wirbeltieren auf Belastung vergleichen zu können. Nach den Probenahmen wurden folgende Biomarkeruntersuchungen durchgeführt:

Döbel:

- Mikrokern-Test mit Erythrozyten (Gentoxizität).
- Histopathologische Untersuchung der Kieme, Leber, Niere und Gonade (Strukturelle Veränderungen, endokrine Wirkungen).
- Quantitative Messung der Induktion des Stressproteins Hsp70 in Kieme, Leber, Niere und Gonade (Proteotoxizität).

Flohkrebse:

- Histopathologische Untersuchung der Mitteldarmdrüse und der weiblicher Gonade (Strukturelle Veränderungen, endokrine Wirkungen).
- Quantitative Messung der Induktion des Stressproteins Hsp70 im gesamten Organismus (Proteotoxizität).

Ziel des dritten Kapitels dieser Arbeit war es, (1) den Gesundheitszustand von Freilandorganismen (Fische und Flohkrebse) in den verschiedene Neckarabschnitten mit Hilfe Effekt-basierter Tests zu bewerten und (2) die angewandten Biomarkermethoden hinsichtlich ihrer Sensitivität und Eignung für ein umfassendes Gewässermonitoring zu evaluieren.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Testorganismen

Flussflohkrebse (*Gammarus roeseli*) (Abb. 1) gehören innerhalb der Ordnung der Flohkrebse (Amphipoda) zur Gattung der Gemeinen Flohkrebse (*Gammarus*). Die Art *Gammarus roeseli* besiedelt vor allem langsam fließende Flussunterläufe und gilt als relativ anspruchsvoll in Bezug auf ihr Habitat. Gammariden ernähren sich generell hauptsächlich von Falllaub und totem pflanzlichem Material. Flussflohkrebse sind getrenntgeschlechtlich, sie erreichen ihre Geschlechtsreife nach ca. 9-10 Häutungen.



Abbildung 1: Flussflohkrebse (*Gammarus roeseli*). Foto: Katharina Peschke.

Abhängig von den Umweltbedingungen werden diese Tiere 6-9 mm lang. Ihre Fortpflanzungsphase dauert in der Regel von April bis Spätherbst, die Weibchen können bis zu sechs Bruten pro Saison austragen. Die kurze Generationszeit und hohe Reproduktionsrate

spiegeln sich auch in hohen Individuendichten wieder, daher sind Flohkrebse als Fischnährtiere von großer ökologischer Bedeutung (Pöckl 1993).

Der Döbel (*Leuciscus cephalus*) ist eine robuste und anpassungsfähige Fischart aus der Familie der Karpfenfische (Cyprinidae) und zählt zu den am weitesten verbreiteten Fischarten in Baden-Württemberg. Zu den von Döbeln besiedelten Habitaten zählen Fließgewässer, Grabensysteme und stehende Gewässer aller Art. Besonders starke Bestände finden sich mitunter auch in den derzeit noch stark beeinträchtigten Fließgewässerabschnitten, die kaum Lebensraum für andere Fischarten bieten. Döbel ernähren sich überwiegend von Wirbellosen und Anflugnahrung, aber auch von Pflanzenteilen und Plankton. Sie werden mit ca. 3 Jahren geschlechtsreif, die Laichzeit dauert in der Regel von April bis Juni. Während jüngere Individuen oft in Gruppen zusammenleben, werden ältere Döbel zu Einzelgängern. Die Länge adulter Tiere kann sogar 50 cm überschreiten (Dußling and Berg 2001).

3.2.2 Probestellen und Probenahmen

Es wurden vier Probestellen entlang des Neckars zwischen Tübingen-Hirschau und Tübingen-Lustnau jeweils ober- und unterhalb der Tübinger Kläranlage sowie ober- und unterhalb des Einlaufs der Ammer festgelegt (Abb. 2). Die örtliche Kläranlage ist mit einem konventionellen Abwasserreinigungssystem ausgestattet und verfügt über keine zusätzliche Reinigungsstufe, wie beispielsweise Ozonierung oder Aktivkohlefilterung. Neben der Kläranlage stellt die Ammer, ein Zufluss des Neckars, eine weitere mögliche Belastungsquelle dar. Vor einigen Jahren wiesen Studien (Beisswenger 2010) auf eine starke Belastung der Ammer mit polychlorierten Biphenylen (PCBs) hin. Die Steinlach, ein weiterer Zufluss des Neckars, der zwischen den Probestellen 3 und 4 einmündet, kann als eher unbelastetes Fließgewässer betrachtet werden (Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg 2012). Generell kann jedoch ein Eintrag von Spurenstoffen, der bislang eher weniger untersucht wurde, nicht ausgeschlossen werden.

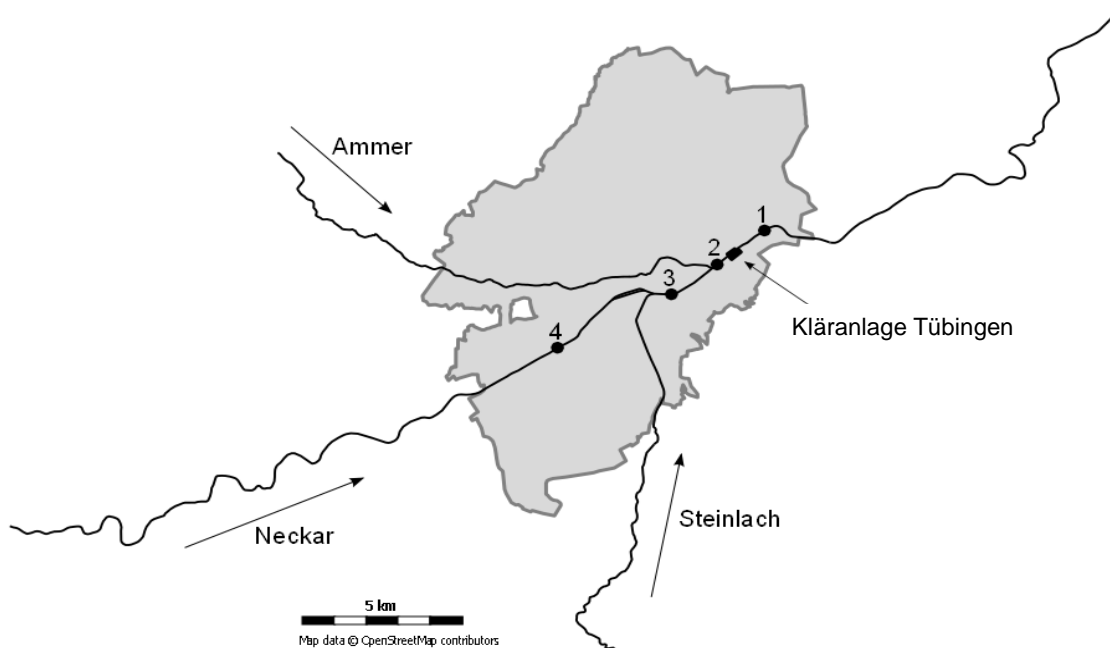


Abbildung 2: Probestellen für das passive Monitoring am Neckar. PS1- unterhalb der Kläranlage Tübingen; PS2- oberhalb der Kläranlage Tübingen, unterhalb des Ammer-Einlaufs; PS3- oberhalb des Ammer-Einlaufs; PS4- Referenzstelle außerhalb Tübingens, Richtung Hirschau.

In Kooperation mit dem Tübinger Kreisfischereiverein wurden mittels Elektrofischung an den Probestellen im Frühling (Mai) und Sommer (Juli) 2011 Döbel entnommen. Laut Projektplan sollten an jeder Probestelle mindestens 10 Döbel entnommen werden. Es ergaben sich aber deutlich geringere Fangzahlen als vorgesehen (Mai 2011: 1 Döbel an PS2, 7 Döbel an PS4; Juli 2011: 1 Döbel an PS1, 3 Döbel an PS3 und 12 Döbel an PS4). Die Fische wurden direkt vor Ort mit 1% Tricain-Methansulfonat (Sigma Aldrich) betäubt und mittels Genickschnitt getötet. Für die spätere Durchführung des Mikrokern-Tests mit Erythrozyten wurde mit einer Pipette unmittelbar nach dem Genickschnitt Blut entnommen und mit Hilfe eines Deckglases (24x40 mm, Langenbrick) auf Objektträger (76x26 mm, Langenbrick) aufgetragen. Anschließend wurden die Proben für 1 min in reinem Methanol fixiert. Zudem wurden Gewebeproben für histopathologische Untersuchungen und für Stressproteinanalysen aus Kieme, Leber, Niere und Gonade ebenfalls sofort vor Ort entnommen. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Gewebe in 2 % Glutardialdehyd (Merck), gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer (PBS; pH 7,6; Roth), fixiert, für die Stressproteinanalysen wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Objektträger mit den Blutausrichen für die

Untersuchungen der Mikrokerns sowie die Gewebeproben für histopathologische Untersuchungen wurden gekühlt ins Labor transportiert und dort bei 4 °C gelagert. Die Proben zur Analyse des Stressproteins Hsp70 wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Im Frühling (Mai) und Herbst (November) 2011 wurden zusätzlich an allen Probestellen 20 Flussflohkrebsen (*Gammarus roeseli*) für histopathologische Untersuchungen gesammelt, dekapitiert und vor Ort in 2 % Glutardialdehyd, gelöst in 0,005 M PBS, fixiert. Die fixierten Proben wurden gekühlt ins Labor transportiert und dort bei 4 °C gelagert. Zur Analyse des Stressproteins Hsp70 wurden an allen Probestellen weitere 20 Individuen gesammelt. Diese wurden der Länge nach gemessen und in flüssigem Stickstoff konserviert. Im Labor wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3 Der Mikrokern-Test mit Fisch-Erythrozyten

Der Mikrokern-Test ist eine schnelle, zuverlässige und nicht-invasive Methode, um Zellteilungsfehler und Chromosomenbrüche zu identifizieren. Mikrokerns sind DNA-Fragmente, die während der Zellteilung nicht in die Tochterzellen gelangten, sondern im Zytoplasma in der Nähe des normalen Zellkerns verblieben sind. Durch die Anwendung des Mikrokern-Tests können Rückschlüsse auf genotoxische Wirkungen gezogen werden (Böttcher and Hollert 2005). Die zellkernhaltigen Erythrozyten von Fischen können aufgrund ihrer großen Anzahl sowie ihrer guten Anfärbbarkeit auch in kleinen Blutvolumina für diese ökotoxikologische Untersuchung verwendet werden (Schnurstein and Braunbeck 2001).

Die Blutaufstriche wurden für 1 min in reiner Giemsa Lösung (Roth) gefärbt. Dadurch wurde der Kern der Erythrozyten wesentlich stärker hervorgehoben als das umgebende Zytoplasma. Im folgenden Schritt wurden die Proben 2x für ca. 2-3 min in Aqua dest. gespült, bis eine optimale Färbung des Zellkerns erreicht war, und überflüssige Farbreste beseitigt wurden. Nach einer kurzen Farbkontrolle unter dem Mikroskop wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt (Roth) und Deckgläsern (40x24 mm, Langenbrick) eingedeckt. Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 2) mit Hilfe eines 100x Objektivs ausgewertet. Gezählt wurden 1000 Blutzellen pro Probe, die Anzahl von Erythrozyten, die mindestens einen Mikrokern enthielten, wurde notiert.

3.2.4 Histopathologische Untersuchungen bei Döbeln und Flohkrebse

Nach vollzogener Fixierung wurden die Gewebeprobe von Döbeln für 3x10 min in 0,1 M PBS (pH 7,6), die Gammariden für 2x60 min in 0,005 M PBS (pH 7,4) gewaschen. Gewebeprobe der Kiemen und Nieren der Fische sowie die einzubettenden Gammariden mussten zusätzlich entkalkt werden. Fischgewebe wurden 1x30 min und 1x über Nacht mit einer 1:1 Mischung aus Ameisensäure (Roth) und 70 % Ethanol entkalkt, bei Flohkrebse wurde eine 9:1 Mischung aus 5 % Trichloressigsäure (Roth) und Formol (Merck) 3x innerhalb von 24 h angewandt. Im nächsten Schritt wurden sämtliche Fischgewebeprobe ebenso wie die Gammariden für 2x15 min in 70 % Ethanol gewaschen. Die Entwässerung von Fischprobe und Flohkrebse als auch die Einbettung von Fischprobe in Paraffin erfolgte in einem Einbettautomat (LeicaTP1020, siehe Anhang 1 und 2). Die Gewebeprobe von Döbeln wurden in Paraffin (Leica), die Flohkrebse in Kunststoff (Technovit 7100, Heraeus-Kulzer, siehe Anhang 1) eingebettet. Es wurden zunächst mit dem Schlitten- (Paraffin-Proben, LeicaSM2000R) bzw. Rotationsmikrotom (Technovit-Proben, Reichert-Jung 2050 Supercut) Schnitte von 3-5 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger (76x26 mm, Langenbrick) aufgezogen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin bzw. Richardson-Blau oder Alcianblau-PAS (Periodic Acid Schiff) gefärbt (siehe Anhang 3-6). Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt (Roth) und Deckgläsern (60x24 mm, Langenbrick) eingedeckt. Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 2, ausgestattet mit einem MRc AxioCam). Beurteilt wurden in allen Organen unter anderem zelluläre und entzündliche Veränderungen, Nekrosen, Hyperplasien und Hypertrophien einzelner Zelltypen, Makrophageninfiltrationen, der Zustand der Kapillaren und Vakuolisierungen, sowie speziell in den Kiemen Ablösungen von Epithelien. Die semi-quantitative Bewertung der Organe der Freilandfische erfolgte bei Kiemen, Lebern und Nieren anhand einer fünfstufigen Skala, wobei Kategorie 1 dem Kontrollzustand und Kategorie 5 dem Destruktionszustand entsprach. Zur Bewertung der Fischgonaden wurde eine dreistufige Skala angewandt, in der Kategorie 1 unreifen und Kategorie 3 reifen Geschlechtsorganen entsprach.

Bei der histopathologischen Untersuchung der Flohkrebse wurde großer Wert auf die Mitteldarmdrüse als wichtiges Entgiftungsorgan und auf die Gonade gelegt, welche Rückschlüsse über endokrine Wirkungen geben kann (Schirling et al. 2006). Die Bewertung der Mitteldarmdrüse erfolgte anhand einer fünfstufigen (1- Kontrollzustand, 5-

Destruktionszustand) Skala. Die Gonade weiblicher Flohkrebse wurde anhand einer sechsstufigen (Reifezustand der Eier: Praevitellogenes-, Frühvitellogenes-, Spätvitellogenes-, Reifes-, Ruhe- und Intermediäres Stadium) Skala bewertet.

3.2.5 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Döbeln und Flohkrebsen

Die Proben wurden auf Eis in einem Extraktionsgemisch aus 80 mM Kaliumacetat (Roth), 4 mM Magnesiumacetat (Roth), 20 mM Hepes (Sigma Aldrich) und 2 % Protease Inhibitor (Sigma Aldrich) mechanisch homogenisiert. Bei den Flohkrebsen sowie bei den Kiemen, Nieren und Gonaden der Fische wurde die dreifache Gewichtsmenge, im Fall der Fischlebern die sechsfache Gewichtsmenge an Extraktionsgemisch hinzugegeben. Die Homogenate wurden anschließend für 10 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 2:1 mit einer Mischung aus 3 % Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst in Tris Puffer (pH 7) verdünnt und für 5 min bei 96 °C erhitzt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Mittels der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Für die Gelelektrophorese wurden aus Sammel- und Trenngel bestehende Minigel (12 % Acrylamid, 12 % Bisacrylamid, Roth) gegossen. Pro Geltasche wurden 20 µg (Döbel) bzw. 40 µg (Flohkrebse) Protein aufgetragen. Zusätzlich wurden bei jedem Gel zwei Taschen mit 4 µl Referenz-Homogenat (Standard) gefüllt, der aus Zebrafärblingen (*Danio rerio*) isoliert wurde. Die Gelelektrophorese fand in einer mit Puffer (190 mM Glycin, Roth; 25 mM Tris_{base}, Roth) gefüllten Elektrophoresekammer für 30 min bei 80V statt, bis die Proteine die Grenze von Sammel- und Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese für weitere 60 min fortgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Macherey-Nagel) per Western Blot übertragen. Dazu wurden die Gele in einer Blottingkammer auf drei Schichten von mit Transferpuffer (pH 9) durchdrungenen Whatman-Filtern gelegt, im folgenden Schritt wurde eine Nitrozellulosemembran und drei weitere Whatman Filter auf jedes Gel geschichtet. Anschließend wurde für 2 h bei 10 V und 90 mA/Filter geblottet. Darauf folgend wurde die Nitrozellulosemembran in einer Absättigungslösung (50 % Horse Serum (Sigma Aldrich) in TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 5,7 (Roth)) für 2 h auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen in TBS (5 min) wurden die Membranen in einer

Antikörperlösung (1:5000 mouse anti-human Hsp70-Antikörper (Dianova) in 10 % Horse Serum/TBS) über Nacht inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt in TBS (5 min) wurde eine zweite Antikörperlösung (1:1000 goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat (Dianova) in 10 % Horse Serum/TBS) verwendet. Durch weitere Inkubation in einer Substratlösung (4-Chloro-1-naphthol, 6 % Methanol, 30 mM Tris (pH 8,5) und 0,015 % Wasserstoffperoxid) wurden aufgrund der Peroxidase-Reaktion des Antikörperkomplexes die Hsp70-Banden gefärbt. Nach kurzem Spülen in Aqua bidest und zweistündigem Trocknen zwischen Whatman Filtern wurden die Membranen eingescannt und das optische Volumen der einzelnen Banden densitometrisch (= Grauwert der durchschnittlichen Farbintensität der Bande x Fläche) mit Hilfe des Programms EasyWin (Herolab E.A.S.Y) bestimmt. Für jede Probe wurde der Grauwert durch den Mittelwert der zwei Standards der entsprechenden Membran geteilt. Somit wurden die Daten als relative Hsp70-Werte dargestellt.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Mikrokern- und Hsp70- Daten wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung getestet und anschließend mittels Levene Test auf Varianzhomogenität hin analysiert. Im Fall von varianzhomogenen und normal verteilten Daten wurde der Tukey- Kramer HSD Test verwendet, bei nicht normal verteilten Daten wurde der nichtparametrische Steel- Dwass Test durchgeführt. Im Fall der Histologie wurde die Häufigkeit der vergebenen Bewertungen durch einen Likelihood-Ratio Test jeweils paarweise verglichen, das Signifikanzlevel wurde nach der Bonferroni-Holm Methode angepasst. Die Daten wurden in JMP 9 (SAS) statistisch analysiert und in SigmaPlot 10 graphisch dargestellt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Histopathologische Untersuchungen bei Flussflohkrebsen

An allen Probestellen wurden mit Kratzern (*Pomphorhynchus laevis*, Acanthocephala) parasitierte Tiere gefunden. Diese sogar makroskopisch erkennbaren Organismen nutzen Gammariden als Zwischenwirt und entwickeln sich in deren Leibeshöhle (Abb. 3) (Lucius

and Loos-Frank 2008). Der Parasitenbefall stellt eine erhebliche Belastung für den Wirt dar, daher war der Gesundheitszustand parasitierter Flohkrebse generell schlecht.



Abbildung 3: Flussflohkrebs (*Gammarus roeseli*), parasitiert mit Kratzer (*Pomphorhynchus laevis*) (Pfeil). Gefärbt mit Richardson-Blau.

Die Mitteldarmdrüse der Gammariden verfügt über zwei Blindsäcke und wird von vier verschiedenen Zelltypen (Blasen- (B), Resorptions- (R), Fibrillöse- (F) und Embryonale (E) - Zellen) aufgebaut (Correia et al. 2002). In den Mitteldarmdrüsen waren an allen Probestellen sowohl im Frühling als auch im Herbst starke Effekte zu erkennen. Es zeigten sich verstärkte Vakuolisierungen und Ablösungen des Mikrovillisaumes der B- R- und F-Zellen, deformierte Zellkerne sowie teilweise Karyolyse und Nekrose bei allen Zelltypen. Weiterhin waren Ablösungen der Zellen von der Basallamina zu beobachten (Abb. 4). Im Frühling (Abb. 5A) und im Herbst (Abb. 5B) ergaben sich hinsichtlich des Zustands der Mitteldarmdrüsen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gewässerabschnitten, der Großteil der untersuchten Organe befand sich im Reaktionszustand. Die Mitteldarmdrüsen der Flohkrebse wiesen aber im Frühling generell einen schlechteren Zustand auf als im Herbst ($p < 0,0001$).

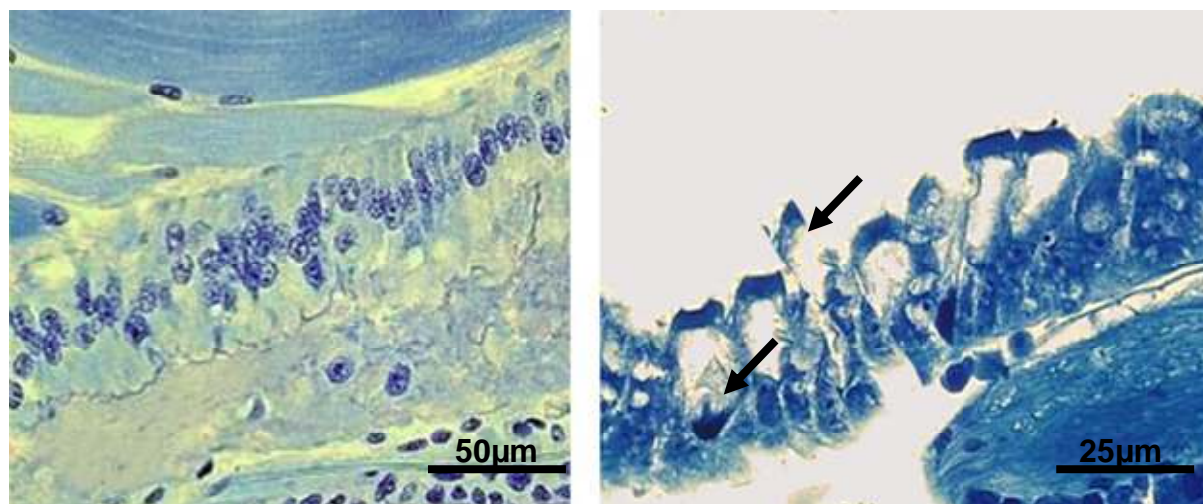


Abbildung 4: Unbeschädigte (links) (Foto: Jonas Geburzi) und beschädigte (rechts) Mitteldarmdrüsen von Flussflohkrebsen (*Gammarus roeseli*). Auf dem rechten Bild sind Hypertrophien von B-Zellen, Nekrosen und Ablösungen des Mikrovillisaumes zu erkennen (Pfeile).

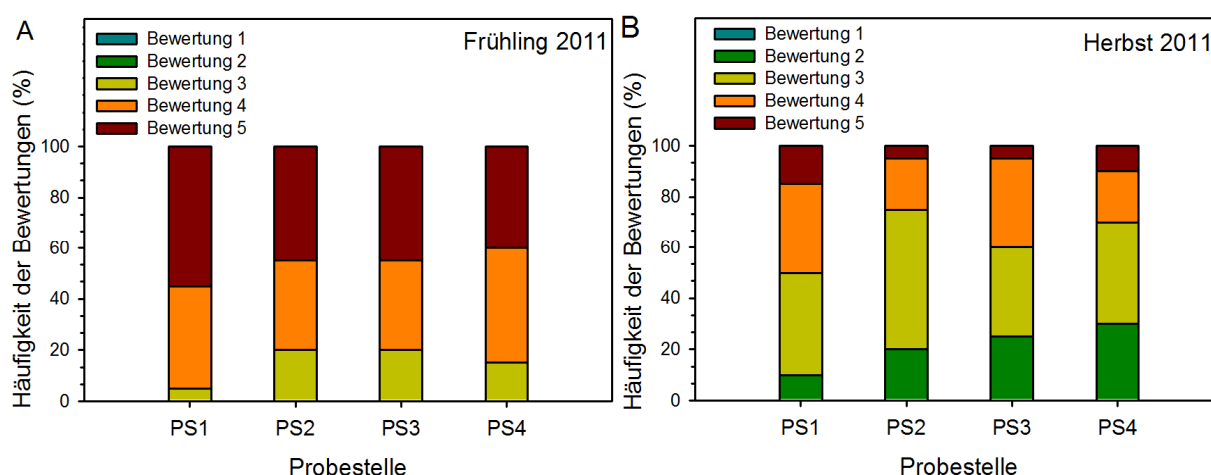


Abbildung 5: Bewertung der Mitteldarmdrüsen von Flussflohkrebsen (*Gammarus roeseli*) aus dem Neckar im Frühling (A) und Herbst (B) 2011.

In der Gonade weiblicher Flohkrebse traten im Frühling überwiegend Spätvitellogene und Reife Oocyten auf (Abb. 6A), dies lässt sich durch den natürlichen Fortpflanzungszyklus der Flohkrebse gut erklären. Nach statistischer Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen. Im Herbst, zum Ende der Paarungszeit, traten dagegen zum Großteil früh- und spätvitellogene sowie atretische Oocyten auf (Abb. 6B). Die saisonalen Unterschiede konnten auch statistisch bestätigt werden ($p < 0,001$). Im Herbst 2011 wurden ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Probestellen 1 (unterhalb der KA) und 4 (Tübingen-Hirschau) ($p = 0,0106$, $\alpha = 0,0125$), 2 (direkt oberhalb der KA, unterhalb des Ammer Einlaufs) und 4 ($p = 0,0301$, $\alpha = 0,05$) sowie zwischen den

Probestellen 2 und 3 (oberhalb des Ammer Einlaufs) ($p=0,0195$, $\alpha=0,025$) ermittelt. Intersex-Tiere (sowohl weibliche als auch männliche Geschlechtsorgane im selben Individuum), deren Vorkommen auf endokrine Wirkungen hindeuten kann, traten im Untersuchungszeitraum nicht auf.

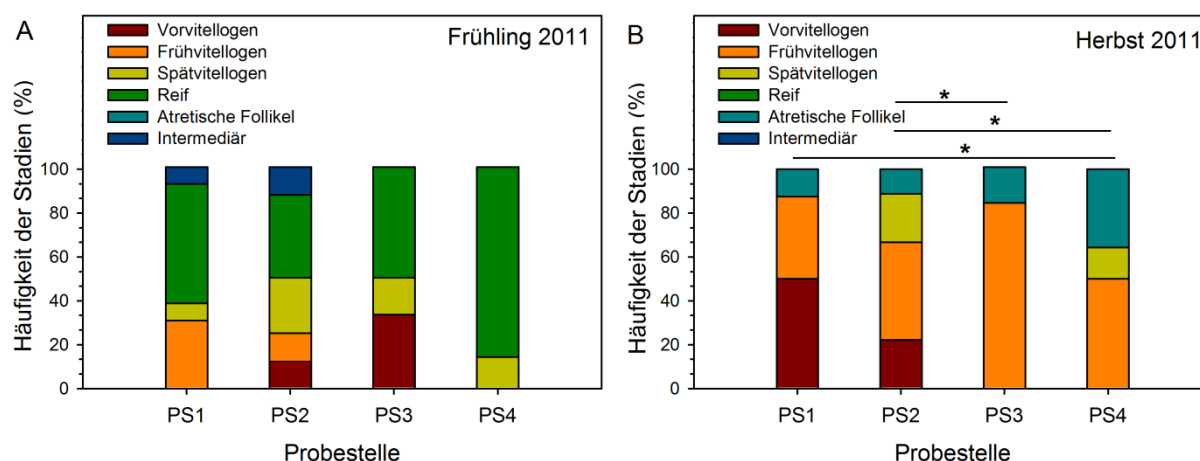


Abbildung 6: Bewertung der Gonade weiblicher Flussflohkrebsse (*Gammarus roeseli*) aus dem Neckar im Frühling (A) und Herbst (B) 2011. Statistisch signifikante ($p < \alpha$) Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen sind mit Sternen markiert.

3.3.2 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Flussflohkrebsen

Die Stressproteinanalysen, die mit Flussflohkrebsen durchgeführt wurden, machten deutlich, dass Hsp70 bei Gammariden relativ empfindlich und instabil ist, wodurch der Nachweis erschwert war. Aus diesem Grund sind die Stichprobenzahlen geringer als geplant ($n=10-15$ statt $n=20$). Nach der Datenanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Stressproteinlevel in Gammariden zwischen den verschiedenen Probestellen (Abb. 7A und 7B), saisonale Unterschiede zwischen Frühling und Herbst konnten auch nicht detektiert werden.

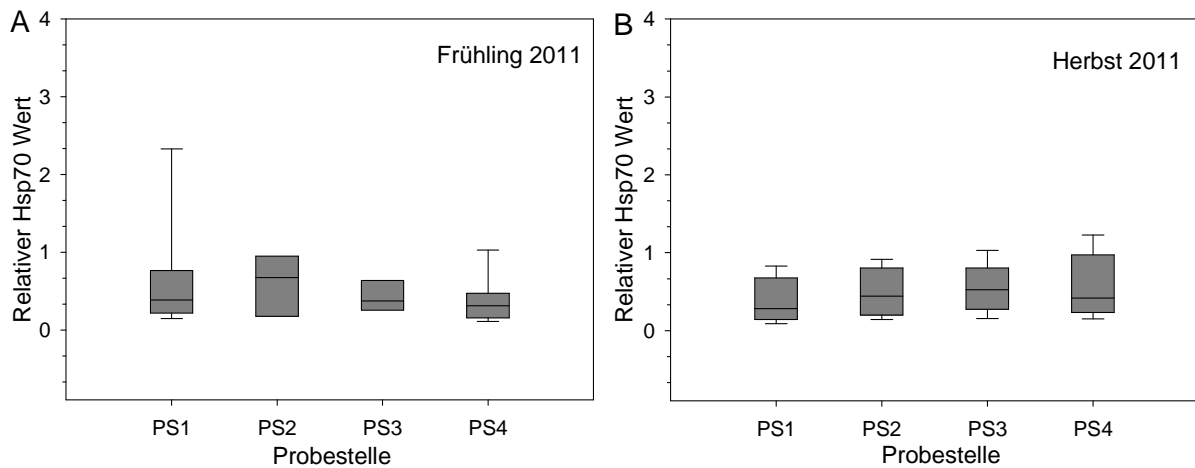


Abbildung 7: Relativer Hsp70-Wert von Flussflohkrebsen (*Gammarus roeseli*) aus dem Neckar, gesammelt im Frühjahr (A) und Herbst (B) 2011.

3.3.3 Mikrokern-Test mit Erythrozyten des Döbels

Die Ergebnisse zeigen sowohl im Frühjahr (Abb. 8A) als auch im Sommer (Abb. 8B) im Vergleich zu spontaner Mikrokernbildung (0,2- 0,6 %) (Pavlica et al. 2011) eine leicht erhöhte Mikrokernanzahl in den Blutproben. In den Blutproben der Döbel von verschiedenen Probestellen wurden im Durchschnitt Mikrokern-Werte zwischen 0,7 und 1,5 % ermittelt. Aufgrund der sehr geringen Fangzahlen war der Vergleich der einzelnen Probestellen bezüglich Mikrokern-haltigen Erythrozyten nicht möglich. Im Fall der PS4 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Frühjahr und Sommer festgestellt werden.

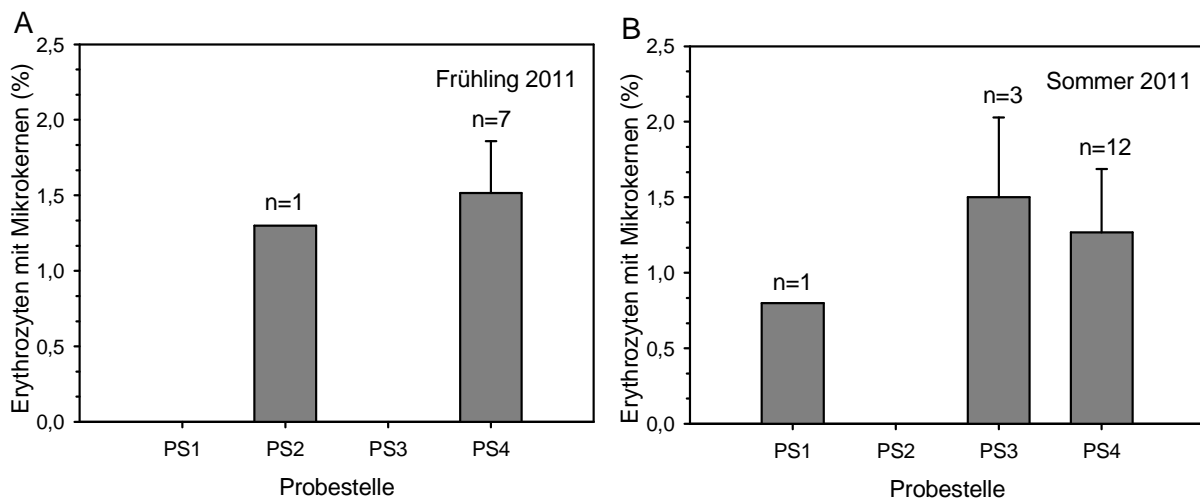


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der Erythrozyten mit Mikrokernen (von insgesamt 1000 untersuchten Zellen) in Blutproben von Döbeln aus dem Neckar, gefangen im Frühjahr (A) und Sommer (B) 2011.

3.3.4 Histopathologische Untersuchungen bei Döbeln

Sowohl im Frühling als auch im Sommer 2011 wurde während der Präparation eine hohe Parasitierungsrate der Döbel festgestellt. Alle entnommenen Fische waren mit Kratzern (*Pomphorhynchus laevis*, Acanthocephala) infiziert (Abb. 9). Diese Parasiten werden von den Fischen durch die Nahrung (Gammariden = Zwischenwirt) aufgenommen. Im Körper des Endwirtes leben sie hauptsächlich im Verdauungssystem (Lucius and Loos-Frank 2008).

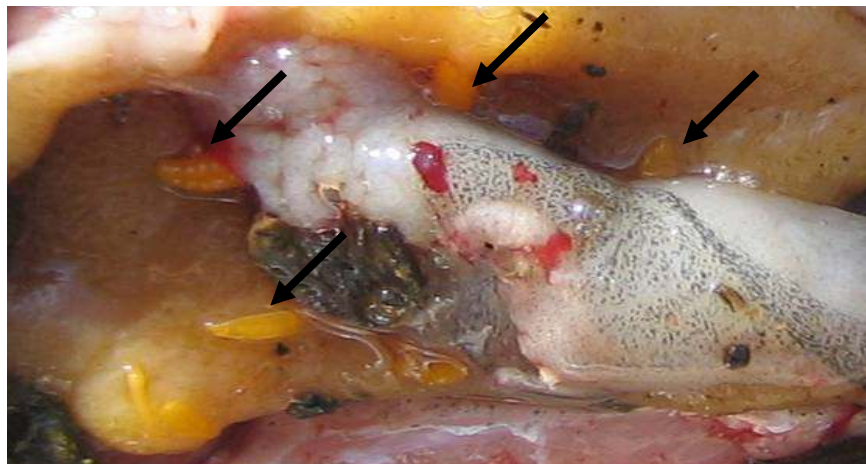


Abbildung 9: Kratzer (Pfeile) im Verdauungssystem eines Döbels aus dem Neckar.

Die Fischkieme ist ein besonders empfindliches Monitororgan. Sie wird von Primär- und Sekundärlamellen aufgebaut, letztere besteht aus Pflaster-, Pfeiler-, Chlorid- und Schleimzellen (Amin et al. 1992). Sowohl die im Frühling als auch die im Sommer gefangenen Döbel wiesen starke Effekte in ihren Kiemen auf. Bei allen Probestellen waren Fusionen von Sekundärlamellen, Hyperplasie von Pflasterzellen, Hypertrophie und Hyperplasie von Schleimzellen sowie teilweise die Nekrose von Chloridzellen zu sehen (Abb. 10). Diese Organe befanden sich bei allen Tieren in einem Reaktions- bzw. Destruktionsstadium (Abb. 11).

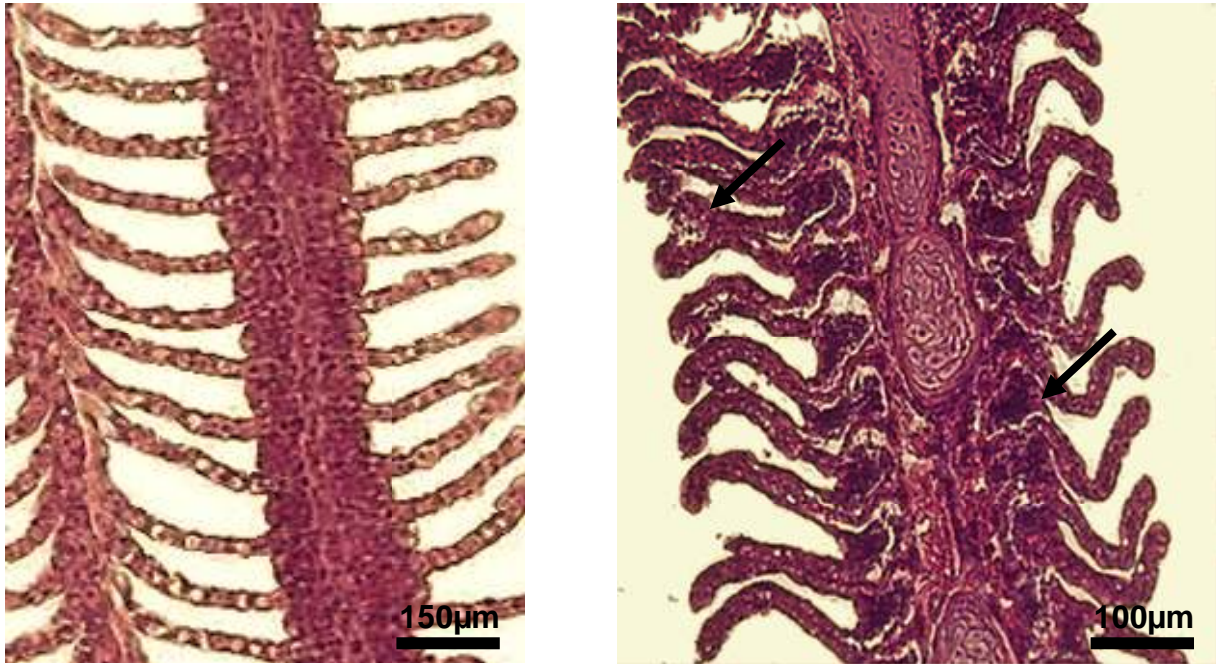


Abbildung 10: Kontrollkieme eines Döbels (links). Quelle: Kieme eines Döbels aus der Argen (Photo: Diana Maier). Kieme eines Döbels aus dem Neckar (rechts) mit Hypertrophie und Epithel-Ablösung (Pfeile). Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin.

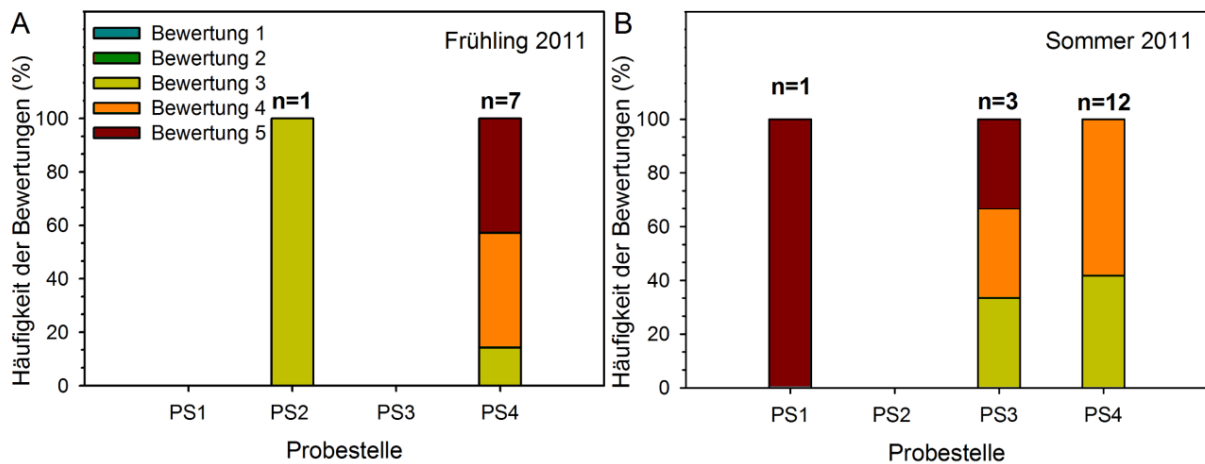


Abbildung 11: Histologische Bewertung der Kiemen von Döbeln, gefangen im Neckar im Fröhling (A) und Sommer (B) 2011.

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan der Wirbeltiere. Sie ist aus Hepatozyten, die von Sinusoide (Blutkapillaren) umgeben sind, aufgebaut. Die Hepatozyten sind für Detoxifikationsprozesse, den Protein-, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, für die Speicherung von Energiereserven (Fett und Glykogen) sowie für die Bildung von Galle zuständig (Takashima and Hibiya 1995).

In Fischen aus dem Neckar konnten deutliche Veränderungen in der Leber nachgewiesen werden. In allen Proben traten Entzündungsherde, Zellkern- Irregularitäten, Nekrosen und dilatierte Kapillaren auf (Abb. 12). Durch die Alcianblau-PAS-Färbung konnte der Glykogengehalt gut sichtbar gemacht werden. Die Lebern weiblicher Fische enthielten in der Regel mehr Fett, während die Lebern männlicher Tiere mehr Glykogen speicherten.

Die Mehrzahl der untersuchten Neckarfische befand sich hinsichtlich des Zustands der Leber in der Reaktionsphase (Abb. 13).

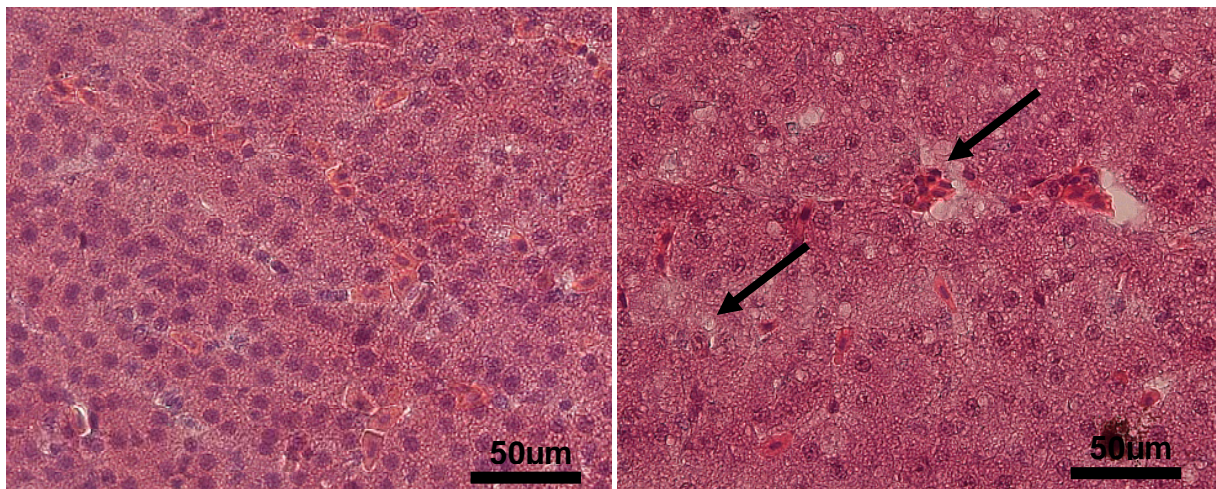


Abbildung 12: Relativ unbeschädigte Leber eines Döbels (links). Quelle: Leber eines Döbels aus der Argen (Photo: Diana Maier). Leber eines Döbels aus dem Neckar (rechts). Auf dem Bild sind dilatierte Kapillaren und Vakuolisierung zu erkennen (Pfeile). Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin.

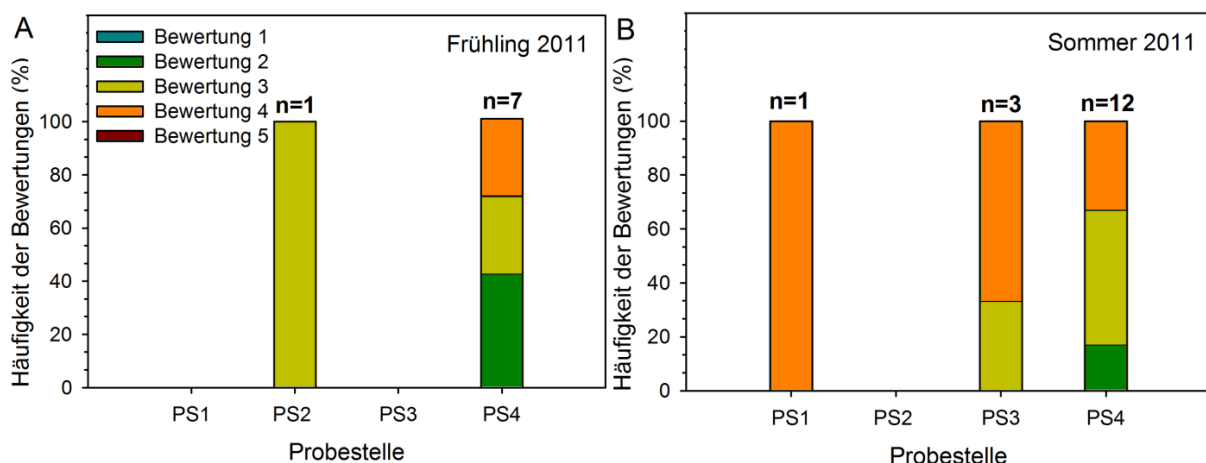


Abbildung 13: Histopathologische Bewertung der Lebern von Döbeln, gefangen im Neckar im Frühling (A) und Sommer (B) 2011.

Die Niere der Fische besteht aus mehreren Gewebetypen: Das sogenannte hämatopoetische Gewebe ist für die Bildung von Blutzellen verantwortlich, während das aus den Nephronen aufgebaute Gewebe für die Exkretion und Sekretion auszuscheidender und die Rückresorption wichtiger Blutbestandteile sorgt. Die Nephronen sind aus zwei Hauptteilen aufgebaut: In der Bowmannschen-Kapsel wird das Blutplasma filtriert, im Tubulus (proximal und distal) werden Proteine, Ionen und Flüssigkeit rückresorbiert (Takashima and Hibiya 1995). Die Nieren der Döbel aus dem Neckar zeigten ein großes Schädigungsspektrum. Es wurden Entzündungen, starke Vakuolisierungen und teilweise Nekrosen in den Tubuli sowie Erweiterungen der Bowmannschen Kapsel festgestellt (Abb. 13).

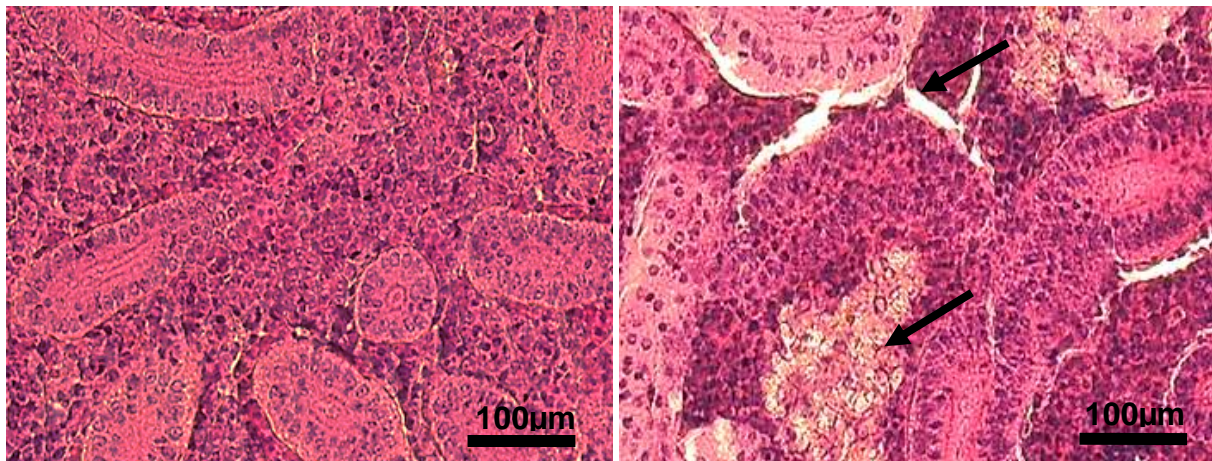


Abbildung 13: Relativ unbeschädigte Niere eines Döbels (links). Quelle: Niere eines Döbels aus der Argen (Photo: Diana Maier). Niere eines Döbels aus dem Neckar (rechts). Auf dem Bild ist die Destruktion einer Bowmannschen Kapsel und Ablösungen der Tubuli von der Basallamina zu beobachten (Pfeile). Gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin.

Hinsichtlich des Zustands der Nieren befanden sich die Fische generell in der Reaktionsphase, im Frühling wurden jedoch auch einige Tiere mit sehr stark geschädigten Nieren gefangen (Abb. 14).

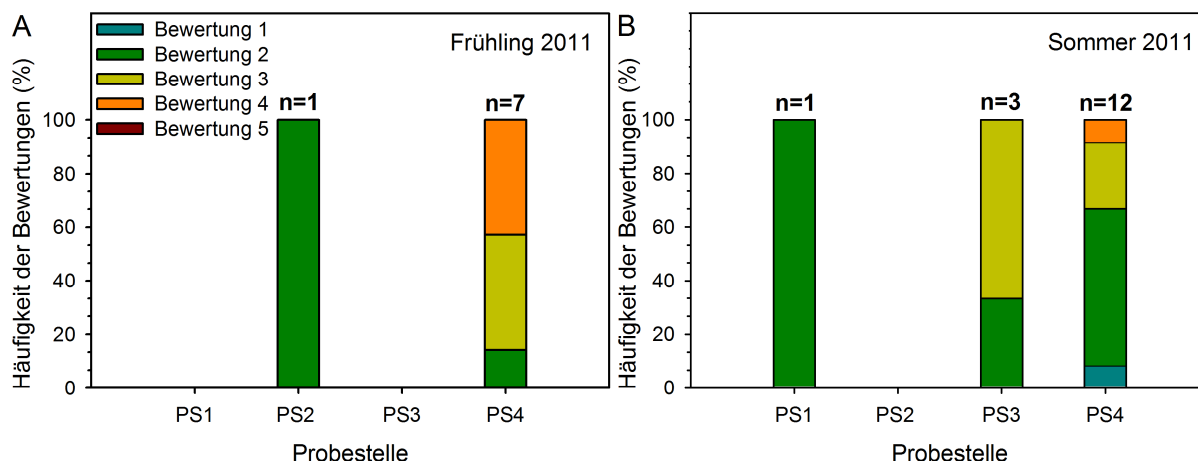


Abbildung 14: Histologische Bewertung der Nieren von Döbeln aus dem Neckar, gefangen im Frühling (A) und Sommer (B) 2011.

Die Hoden sind bei Fischen tubulär aufgebaut. Sie bestehen aus Bindegewebe, und aus Spermatogonien und Spermatozyten, die nach der Meiose Spermatozoen und schließlich Spermien bilden. Durch östrogenähnliche Substanzen in der Umwelt kann es zu einer Verweiblichung der männlichen Gonade kommen (Leino et al. 2005), in diesem Fall würden Oozyten im spermatogenen Gewebe auftreten.

Das Ovar weiblicher Fische besteht aus Bindegewebe, Oogonien und Oocyten. Die Oogonien liegen peripher und bilden durch Meiose Oocyten (Eizellen). Durch die Reifung wird in die primären Oocyten Vitellogenin, Fett und Dotter eingelagert, während sich die Zellkernmembran auflöst. Auf diese Weise entstehen sekundäre Oocyten. Die nicht abgelegten reifen Eizellen werden atretisch und anschließend abgebaut (Takashima and Hibiya 1995). Bei Belastung kann die Anzahl atretischer Oocyten zunehmen, während durch endokrine Wirkung androgenähnlicher Substanzen auch Mischgonaden auftreten können.

Die Gonaden der untersuchten Freilandfische waren kompakt, es traten keine Schädigungen oder endokrine Effekte auf (Abb. 15). Zwischen den Reifestadien war ein saisonaler Unterschied zu erkennen: Im Mai verfügten die Fische über reifere Geschlechtsorgane als im Juli (Abb. 16). Dies lässt sich durch die Reproduktionszeit der Döbel, die bereits im Juli endet, erklären.

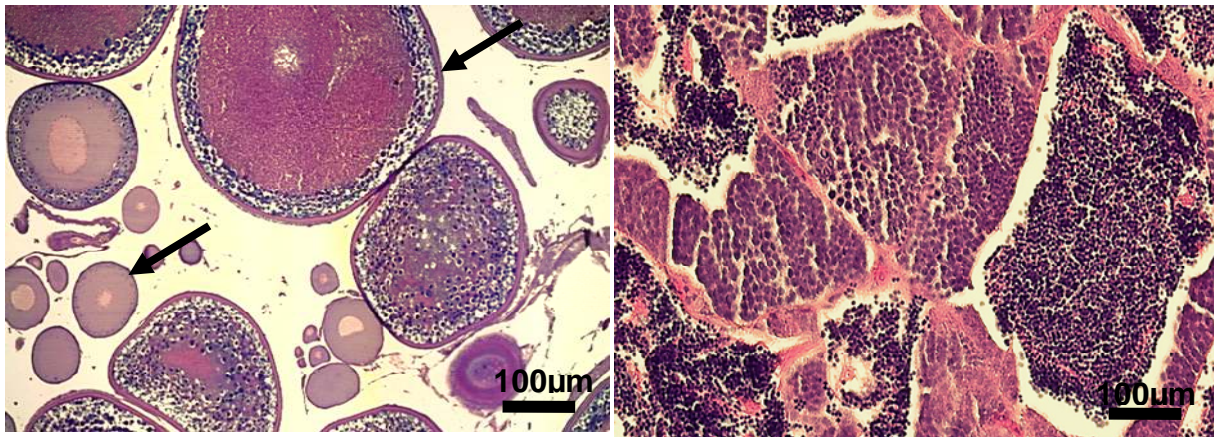


Abbildung 15: Primäre und sekundäre Oocyten (Pfeile) im Ovar eines Döbels (links), gefärbt mit Alcianblau-PAS. Spermatogenes Gewebe des Döbels (rechts), gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin.

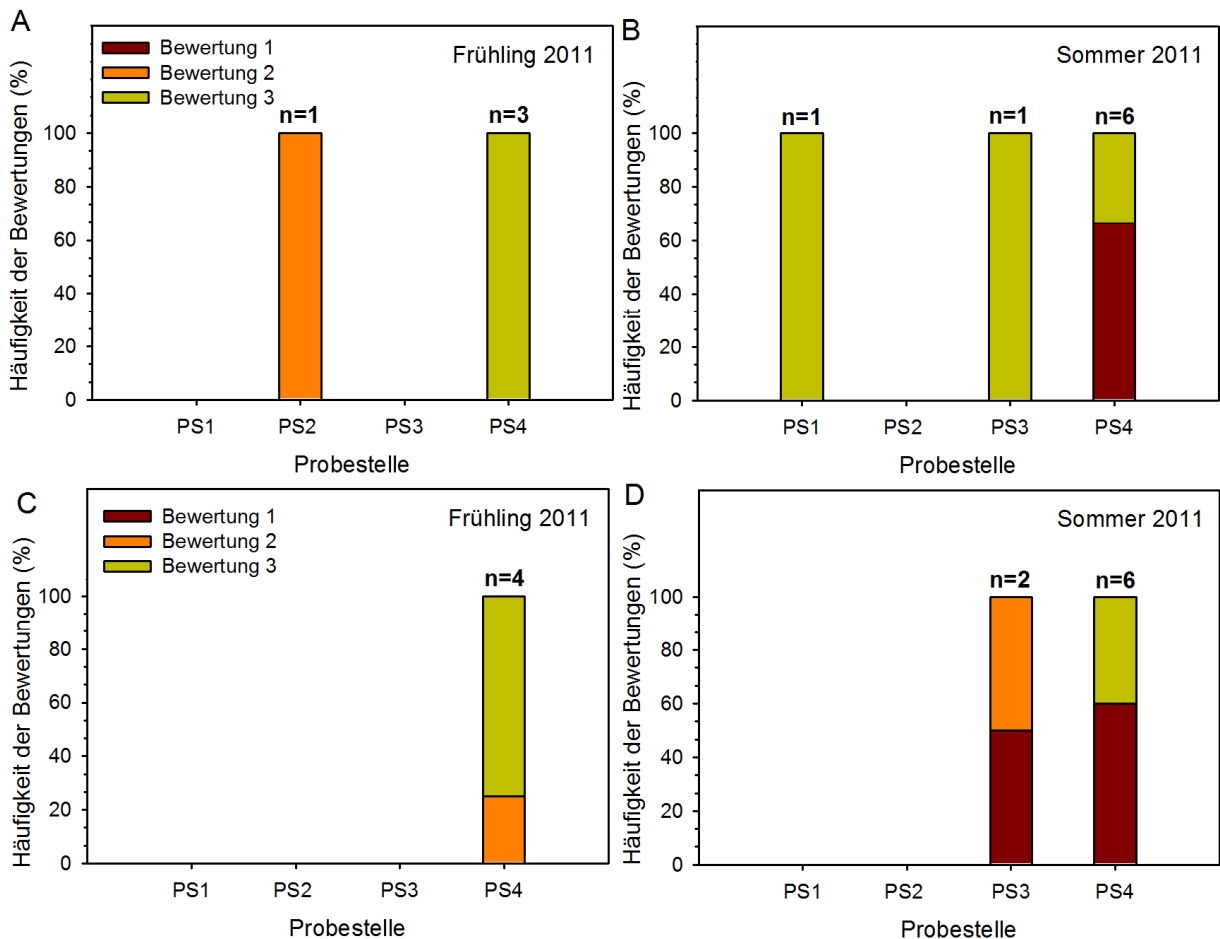


Abbildung 16: Histologische Bewertung weiblicher (A und B) und männlicher (C und D) Gonaden von Döbeln, gefangen im Neckar im Frühling und Sommer 2011.

Wie bereits erwähnt, war bei den Freilandfischen der Vergleich der einzelnen Probestellen durch statistische Methoden aufgrund der geringen Fangzahlen nicht möglich. Saisonale und organspezifische Unterschiede konnten nur im Fall der PS4 ermittelt werden. Bei weiblichen Döbeln dieser Probestelle wiesen die Ovarien im Frühling reifere Eistadien auf als im Sommer ($p=0,0033$). In allen untersuchten Döbeln waren zudem die Kiemen stärker geschädigt als die Lebern ($p=0,001$, $\alpha=0,005$) und Nieren ($p=0,0003$, $\alpha=0,025$).

3.3.5 Analyse des Stressproteins Hsp70 bei Döbeln

Eine statistische Analyse wurde aufgrund geringer Fangzahlen nur für PS4 durchgeführt. Das Stressprotein Hsp70 war in den Gewebeproben von Fischen deutlich stabiler als in Gammariden, in Einzelfällen kam es aber auch bei den Fischproben zum Ausfall von Hsp-Banden. Die Nieren der Freilandfische wiesen im Frühling ein höheres Stressproteinlevel auf als im Sommer ($p=0,0002$) (Abb. 17). Im Vergleich der Hsp70-Level der einzelnen Organe miteinander konnte nur zwischen Nieren und Gonaden im Frühling 2011 ein signifikanter Unterschied ($p=0,0331$) nachgewiesen werden.

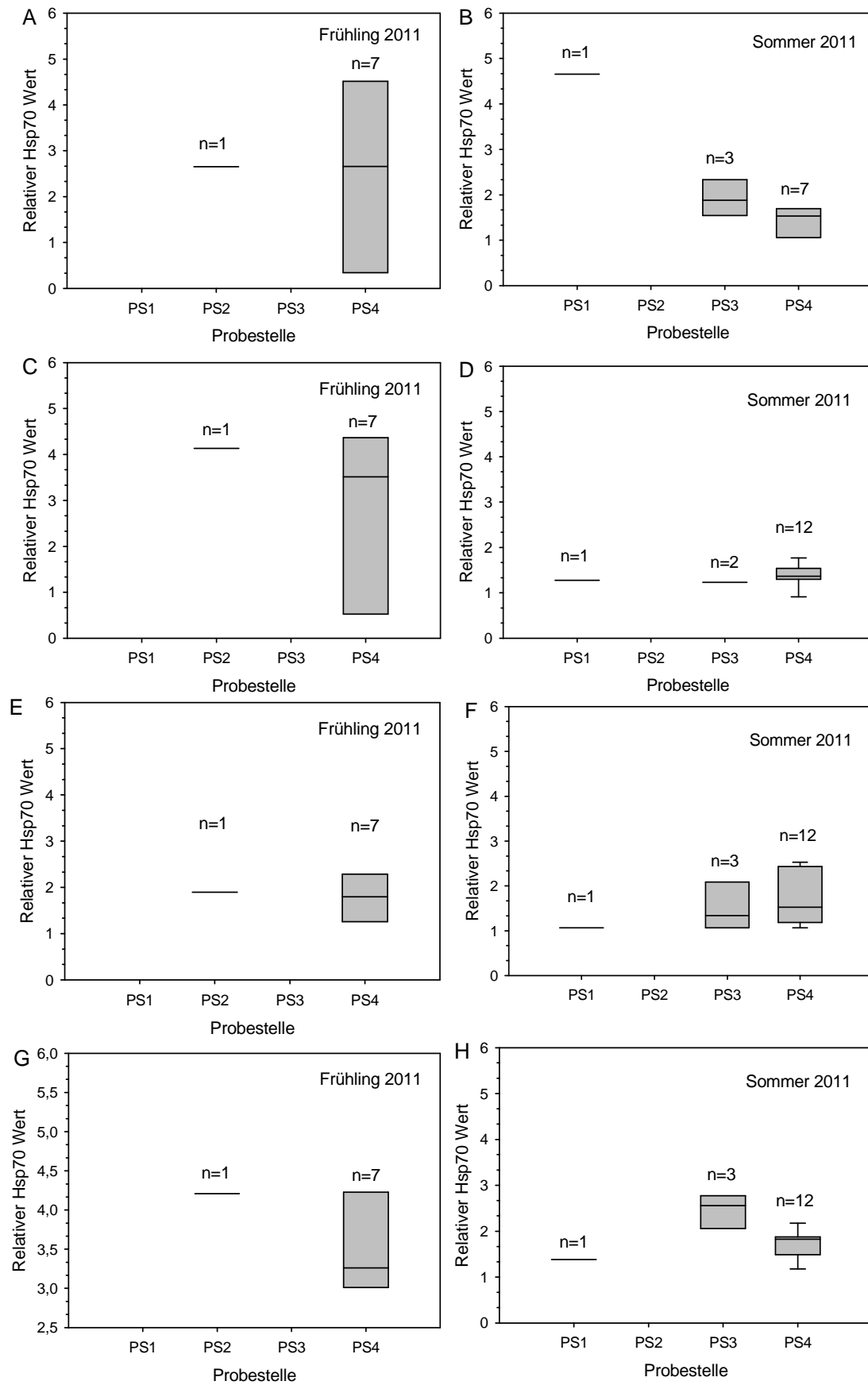


Abbildung 17: Relativer Hsp70 Wert der Kiemen (A und B), Lebern (C und D), Nieren (E und F) und Gonaden (G und H) von Döbeln, gefangen im Neckar im Frühling und Sommer 2011.

3.4 Diskussion

Ziel der Untersuchungen war die Beurteilung der Wasserqualität des Neckars bei Tübingen und die Identifikation von Belastungsquellen, wie Kläranlagen, Regenüberlaufbecken und sonstige Punktquellen.

Die auf Biomarkerantworten hin untersuchten Freilandfische und Flohkrebse wiesen im gesamten Untersuchungsgebiet einen schlechten Gesundheitszustand und eine hohe Parasitierungsrate durch Kratzer auf. Es ist bekannt, dass durch eine toxische Belastung die Anfälligkeit von Wirtsorganismen gegenüber Parasiten erhöht werden kann. Die Kombination aus Parasitenbefall und weiteren biotischen und abiotischen Stressoren kann zu einem geschwächten Immunsystem und zu einer verstärkten Reaktion auf Umweltchemikalien führen (Blanar et al. 2009; Lafferty and Kuris 1999). Parasit- Wirt-Beziehungen sind aber aus ökotoxikologischer Sicht oft sehr komplex. Einige Studien deuten bereits darauf hin, dass parasitierte Wirtsorganismen eine erhöhte Resistenz gegenüber Schadstoffen entwickeln können als nicht-parasitierte Vertreter. Nach einer Quecksilber-Exposition konnte z.B. in verschiedenen Geweben von mit Kratzer infizierten Döbel eine niedrigere Quecksilberkonzentration gemessen werden als in ihren nicht-parasitierten Artgenossen. Bei Kratzern konnte es nachgewiesen werden, dass sie Schwermetalle in deutlich höheren Konzentrationen akkumulieren können als ihr Endwirt (Sures and Siddall 2003).

Der Mikrokern-Test, der mit Erythrozyten des Döbels durchgeführt wurde, lieferte einen Hinweis auf die Präsenz genotoxischer Effekte in Fischen aus dem Neckar, obwohl für eine eindeutige Aussage noch mehr Stichproben notwendig gewesen wären. In den Blutproben der Döbel lag der prozentuale Anteil an Mikrokernen an allen Probestellen im Durchschnitt zwischen 0,7 und 1,5 %. Nach Untersuchungen von Pavlica et al. (2011) liegt die Mikrokernhäufigkeit in Erythrozyten in Blutproben aus Döbeln bei spontaner Mikrokernbildung zwischen 0,2 - 0,6 %, wohingegen zum Beispiel in Blutproben aus Döbeln stark belasteter Gewässerabschnitte der Sava (unterhalb von Zagreb, Kroatien) ein Mikrokern-Anteil von 0,6 - 2,3 % ermittelt wurde.

Die histopathologischen Untersuchungen, die an Geweben von Flohkrebse durchgeführt wurden, zeigten, dass der Zustand der Mitteldarmdrüsen im Frühling generell schlechter war als im Herbst. Parallel dazu wurden in den weiblichen Gonaden dieser Tiere sowohl saisonale als auch probestellenspezifische Unterschiede nachgewiesen. Im Frühling wiesen die

Gonaden weiblicher Gammariden mehr reife Eizellen auf als im Herbst. Dieses Phänomen lässt sich jedoch durch den Reproduktionszyklus der Flohkrebse gut erklären (Pöckl 1993). Hinsichtlich des Zustands der weiblichen Gonaden bei Flohkrebse war die Referenzstelle in Tübingen- Hirschau (PS4) auffällig. Hier traten in den Gonaden weiblicher Gammariden im Herbst deutlich mehr atretische Oozyten auf als an den übrigen Probestellen flussabwärts. Eine beschleunigte Reifung des Ovars kann als Zeichen der Präsenz von Substanzen mit östrogenähnlicher (Schirling et al. 2006) oder toxischer Wirkung interpretiert werden. Schirling et al. (2005) untersuchten zum Beispiel die Oozytentwicklung und zwei weitere biochemische Parameter- das Hitzeschockprotein Hsp70 als genereller Stressmarker und das mit der Reproduktion verbundene Hsp90 in Bachflohkrebsen (*Gammarus fossarum*) zweier Fließgewässer (Körsch und Lockwitzbach), ober- und unterhalb der Einleitungen lokaler Kläranlagen. Unterhalb des Kläranlageneinleiters der stark belasteten Körsch wiesen die Gonaden weiblicher Flohkrebse einen höheren Reife-Index, größere vitellogene Oozyten und eine vermehrte Atresie auf als die Gonaden weiblicher Tiere oberhalb der Kläranlage. Diese Individuen zeigten zudem einen niedrigeren Hsp90-Level, während die Analyse des Stressproteins Hsp70 in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede lieferte. In ihrer Studie wiesen Schirling et al. (2006) darauf hin, dass der Reproduktionserfolg der Gammariden auch durch biotische Faktoren, wie z. B. Populationsdichte beeinflusst werden kann.

Basierend auf den Untersuchungen der Freilandfische war zwar der Vergleich der einzelnen Probestellen aufgrund der geringen Fangzahlen nicht für die meisten Fälle möglich, jedoch ergab die statistische Analyse des Stressproteinlevels der Döbel an PS4 im Mai einen signifikant höheren Hsp70-Gehalt in den Nieren als im Juli. Saisonale Schwankungen des Stressproteinlevels können durch physiologische Veränderungen während der Fortpflanzungszeit sowie durch den Temperaturanstieg im Frühling erklärt werden. Fader et al. (1995) konnten bei vier Fischarten nachweisen, dass die Tiere im Frühling deutlich mehr Hsp70 induzieren als im Sommer, Herbst und Winter. Zudem wurden bei den untersuchten Neckarfischen als Zeichen einer toxischen Belastung auch im Frühling starke histopathologische Beeinträchtigungen in den Lebern, Kiemen und Nieren nachgewiesen. Die Ergebnisse des Embryotests mit den Eiern des Zebraärlings spiegeln die Ergebnisse des passiven Monitorings wieder: Im Frühling 2011 wiesen die Neckarproben generell höhere toxische Potentiale auf als im Herbst, wobei die Wasser- und Sedimentproben von PS4 in

diesem Jahr die stärksten Entwicklungsdefizite und höchsten Mortalitätsraten verursachten (Vincze et al. 2014).

Die durchgeführten Biomarkeruntersuchungen weisen darauf hin, dass in allen untersuchten Abschnitten des Tübinger Neckars eine Belastung mit toxischen Substanzen vorliegt, die im Frühling 2011 stärker war als im Herbst 2011. Dies ist vermutlich auf ein Zusammenspiel biotischer und abiotischer Faktoren, wie beispielsweise die Fortpflanzungszeit der Organismen sowie auf den Anstieg der Wassertemperatur, zurück zu führen, welches zu deutlicheren Stressreaktionen in den Fischen und Flohkrebsen führte. Die saisonalen Schwankungen können auf hydrologische Ereignisse zurückgeführt werden: Im Frühling wies der Pegelstand des Neckars eine durchschnittliche Höhe auf, während im Herbst starke Regenereignisse auftraten. Eine Reihe von Studien berichten über eine Verringerung toxischer Potentiale in Oberflächengewässern durch Verdünnung der Schadstoffe bei erhöhtem Wasserstand (Katip et al. 2012; Moliner-Martínez et al. 2013; Palma et al. 2010; Zhu et al. 2013).

In den untersuchten Abschnitten des Neckars stellt mit großer Wahrscheinlichkeit die Tübinger Kläranlage (bei PS1) eine deutliche Belastungsquelle dar (siehe Kapitel 4). An der PS2, unterhalb der Mündung der Ammer ist mit Einträgen von weiteren Regenüberlaufbecken und Kläranlagen zu rechnen: Die Ammer fließt sowohl durch intensiv genutzte landwirtschaftliche Flächen als auch durch urbanisierte Gebiete, bevor sie in den Neckar mündet. Angeschlossen an dieses Gewässer sind zwei konventionelle kommunale Kläranlagen (Lange et al. 2015). Die Steinlach, ein weiterer Zufluss des Neckars, der oberhalb der PS3 einmündet, kann als eher unbelastetes Fließgewässer betrachtet werden (Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg 2012). Generell kann jedoch ein Eintrag von Umweltchemikalien durch die Steinlach nicht ausgeschlossen werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass durch diverse Prozesse Spurenstoffe in der oberen Gewässerabschnitte (z.B. PS4) gelangen, die die Wasserqualität von PS3 negativ beeinflussen können (z. B. Phosphat-Drifting im Mai 2011, siehe Kapitel 2). Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf einen toxischen Eintrag bei PS4 in Tübingen- Hirschau hin, obwohl diese Probestelle aufgrund fehlender Einleiter von Abwasserbehandlungssystemen ursprünglich als naturnahe Referenzstelle ausgewählt wurde. Eine Erklärung dafür wäre zum einen die Präsenz landwirtschaftlicher Aktivität in diesem Abschnitt. Es ist aber auch möglich, dass die Einleitungen der oberhalb von PS4 liegenden Kläranlagen und

Regenüberlaufbecken (zum Beispiel Kläranlage Rottenburg) eine negative Auswirkung auf die Wasserqualität dieser Stelle haben.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Evaluierung und der Vergleich der angewandten Biomarkermethoden und Modellorganismen hinsichtlich deren Sensitivität und Eignung für ein umfassendes Gewässermonitoring. Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Techniken erwiesen sich als zuverlässige Werkzeuge, um relevante Aussagen zum Belastungszustand des Neckars zu treffen. Mit Hilfe der ausgewählten Biomarkerpalette (Histologie, Stressproteinanalyse, Mikrokern-Test) konnten auf verschiedenen biologischen Ebenen die Reaktionen von residenten Wirbellosen und Wirbeltieren auf Belastung gezeigt werden.

Durch zahlreiche Studien wurde gezeigt, dass bei verschiedenen Fischgeweben mit Hilfe cytogenetischer Untersuchungen Erbmaterialschädigungen, welche durch Chemikalien und Wasserbelastungen verursacht werden, veranschaulicht werden können (Torres de Lemos et al. 2007). Der Mikrokern-Test mit Fisch-Erythrozyten ist hierbei eine schnelle und einfache Methode, um genotoxische Wirkungen, welche die Zellteilung beeinflussen, nachzuweisen (Rodriguez-Cea et al. 2003). Die Mikrokernanzahl der untersuchten Fisch-Erythrozyten überschritt generell den Kontrollwert. Jedoch wäre, wie bereits erwähnt wurde, eine größere Probenanzahl nötig um zuverlässige und auf Populationsniveau relevante Aussagen treffen zu können.

Histopathologische Veränderungen sind strukturelle Biomarker, die in der aquatischen Ökotoxikologie häufig eingesetzt werden. Durch sie können chronische Effekte sogar bei niedrigen Expositions-Level erkannt werden (Wester et al. 2002). In der vorliegenden Studie konnten durch histopathologische Untersuchungen sowohl bei Flohkrebse als auch bei Fischen Beeinträchtigungen auf zellulärer Ebene gezeigt werden, die auch saisonale Schwankungen erfassten. Die einzelnen Organe der Monitororganismen reagierten unterschiedlich auf die Stresssituation: In den Gonaden weiblicher Gammariden wurden sowohl saisonale als auch probestellenspezifische Unterschiede nachgewiesen, während die Mitteldarmdrüsen in allen Gewässerabschnitten ein gleichmäßiges Schädigungs-Level aufwiesen. In den Kiemen der Döbel wurden stärkere Effekte als in den Lebern und Nieren beobachtet. Dieses Phänomen kann durch die Funktion und anatomische Situation der einzelnen Organe erklärt werden: Die Kieme der Fische hat als respiratorisches Organ direkten Kontakt zur äußeren Umgebung (Amin et al. 1992), von daher reagiert sie meistens

sehr schnell und empfindlich auf die Präsenz von Umweltchemikalien (Yoo and Janz 2003). Im Gegensatz dazu weisen die Leber und Niere eine innere anatomische Lage auf (Takashima and Hibiya 1995), was ggf. zu einer verzögerten oder schwächeren Stressantwort führen kann. Die Ergebnisse der Analyse des Stressproteins Hsp70 deuteten in den Freilandfischen auf Jahreszeit- und Organ-spezifischen Effekte hin. In den untersuchten Gammariden konnten keine Unterschiede zwischen den Probestellen gezeigt werden. Allerdings sollten bei Gammariden die methodischen Schwierigkeiten dieses Biomarkertests berücksichtigt werden. Ein Problem stellte der durchgehend hohe Parasitierungsgrad der Tiere dar, welcher durch die daraus resultierende starke Belastung einen Einfluss auf das Stressproteinlevel haben kann (Sures 2008). Die Änderung des Levels an Stressprotein Hsp70 indiziert proteotoxische Wirkungen, deren Ursachen vielfältig sein können. So können nicht nur Umweltchemikalien sondern auch jahreszeitlich spezifische Parameter, wie Temperatur und Fortpflanzungszeit oder auch Parasitierung für den Hsp70-Status verantwortlich sein (Triebskorn 2012). Aus diesem Grund ist es notwendig, diese Methode mit weiteren Biomarkern (zum Beispiel histopathologische Untersuchungen) zu kombinieren um relevante Aussagen über den Gesundheitszustand der Monitororganismen treffen zu können.

Die im Neckarprojekt angewandten Biomarkermethoden ergänzten sich gut und bildeten diverse toxische Aspekte wie geno-, proteo- und cytotoxische Effekte ab. Neben den etablierten Gewässergütekriterien bieten diese Methoden ebenfalls eine Möglichkeit, detaillierte Informationen über chronische Auswirkungen von Belastungen im Gewässer zu erhalten bevor Schädigungen von Populationen oder Ökosystemen sichtbar werden. Die verwendeten Biomarker werden als Effekt-Biomarker bezeichnet. Diese können, im Gegensatz zu Expositions-Biomarkern, welche eine Korrelation zur Ursache der Belastung erlauben, ausschließlich über die Art der Schädigung eine Auskunft geben (Adams 2000).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Flussflohkrebse als auch Döbel äußerst empfindlich auf Stress reagieren. Fische bieten zwar im Vergleich zu Flohkrebse mehr Untersuchungsmöglichkeiten und verfügen als Wirbeltiere über eine größere Relevanz in der ökotoxikologischen Freilandforschung, in bestimmten Situationen ist jedoch ihre Exposition oder Entnahme nicht möglich. Hier bieten histopathologische Untersuchungen an Flohkrebse, die von Frühling bis Ende Herbst in großer Anzahl vorkommen, eine gute Alternative. In der Ökotoxikologie wurden längst Methoden entwickelt, um vor allem in Labortests neben der Bestimmung der Mortalitätsrate sämtliche

bioenergetische- und Verhaltensendpunkte wie Respirationsrate, Ernährungsaktivität, Schwimmverhalten usw. erfassen zu können. Außerdem wurde bereits eine Reihe von Biomarkertests etabliert, wodurch endokrine, teratogene, geno- und proteotoxische Wirkungen bei Flohkrebse nachgewiesen werden können (Kunz et al. 2010). Überraschenderweise gibt es bisher wenig Studien, die den Gesundheitszustand dieser Tiere als Monitoringtools berücksichtigen, obwohl Gammariden als Multilevel Testsysteme für die *in situ* Risikoeinschätzung von Umweltchemikalien äußerst geeignet sind.

3.5 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie lieferte einen eindeutigen Hinweis auf die Präsenz toxischer Potenziale im Tübinger Neckar-Bereich. Durch den Einsatz von Biomarkern konnten auch saisonale Schwankungen erfasst werden. Der Vergleich des Belastungszustandes der einzelnen Probestellen war leider aufgrund der geringen Fangzahlen für Döbel nur begrenzt möglich. Um dieses Problem zu beheben und Informationen über die Expositionsbedingungen zu bekommen, wurde ein aktives Umweltmonitoring mit Bachforellen durchgeführt (siehe Kapitel 4). Mit Hilfe des passiven Monitorings konnte aber gezeigt werden, dass sowohl residente Fische als auch Flohkrebse empfindlich auf Umweltstress reagieren können. Die Untersuchung ihres Gesundheitszustandes mittels ausgewählter Biomarker auf verschiedenen Organisationsebenen dient als effektives Tool für die Charakterisierung des Belastungsstatus aquatischer Lebensräume.

3.6 Literatur

- Adams SM (2000) Assessing sources of stress to aquatic ecosystems using integrated biomarkers. In: Biological resource management connecting science and policy. Springer Berlin, pp 17-29.
- Amin AB, Mortensen L, Poppe T (1992) Histology atlas, normal structure of salmonids. Offset Nord AS, Norway.
- Beisswenger M (2010) Wieder Fische mit zu hohem PCB-Wert in der Ammer. http://www.tagblatt.de/Home/nachrichten/kreis-tuebingen/ammerbuch_artikel,-Wieder-Fische-mit-zu-hohem-PCB-Wert-in-der-Ammer-arid,98441.html. Accessed 13.07.2013.
- Blanar CA, Munkittrick KR, Houlihan J, MacLachy DL, Marcogliese DJ (2009) Pollution and parasitism in aquatic animals: A meta-analysis of effect size. *Aquatic Toxicology* 93 (1):18-28.
- Böttcher M, Hollert H (2005) Mikrotucleus-Test mit RTL-w1-zellen und Fischerythrocyten. SOP, Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P (2009) Fish populations under stress - the example of the lower Neckar river (Fischpopulationen unter Stress – das Beispiel des unteren Neckars). *Environmental Sciences Europe (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung)* 21 (2):197-211.
- Charles J, Crini G, Degiorgi F, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM (2014) Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) exposed to binary copper and nickel mixtures. *Environ Science and Pollution Research* 21 (2):1099-1111.
- Correia AD, Pereira AL, Costa MH, Carrapiço F (2002) Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (crustacea: Amphipoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82 (02):201-204.
- Dußling U, Berg R (2001) Fische in Baden-Württemberg. Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart.
- 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.
- Fader SC, Yu Z, Spotila JR (1995) Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. *Journal of Thermal Biology* 19 (5):335-341.
- Falter R, Schöler HF (1994) Determination of methyl-, ethyl-, phenyl and total mercury in Neckar river fish. *Chemosphere* 29 (6):1333-1338.
- Frommberger R (1991) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in fish from South-West Germany: River Rhine and Neckar. *Chemosphere* 22 (1–2):29-38.

- Haberbosch R, Hoffmann R, Wnuck H (2012) Fish fauna and fishing of the middle Neckar river (Vom Wildfluss zur Wasserstraße - Fischfauna und Fischerei im mittleren Neckar). 1 edn. VFG Service und Verlags GmbH, Stuttgart.
- Haiber G, Schöler HF (1994) Identification of di-o,o'-cl-, mono-o-cl- and non-o-cl-substituted pcb congeners in Neckar river fish. *Chemosphere* 28 (11):1913-1919.
- Ikone- Integrierende Konzeption Neckar-Einzugsgebiet (2003) Gütezustand der fließgewässer im neckar-einzugsgebiet.
http://www.ikone-online.de/fileadmin/template/hefte/IKONE_Heft_5.pdf Accessed 9.05.2011.
- Katip A, Karaer F, Ileri S, Sarmasik S, Aydogan N, Zenginay S (2012) Analysis and assessment of trace elements pollution in sediments of lake Uluabat, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 33 (5):961-968.
- Kunz PY, Kienle C, Gerhardt A (2010) Gammarus spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205:1-76.
- Lafferty KD, Kuris AM (1999) How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography* 44 (3):925-931.
- Landesamt für Natur Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2007) Feststellung der biologischen gewässergüteklasse.
<http://www.lanuv.nrw.de/wasser/oberflaechengewasser/gewaesserguete/gewguetext.htm>.
Accessed 19. 08. 2014
- Landesanstalt für Umwelt Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (2012) Umweltdaten 2012 Baden-Württemberg, vol 1. ABT Print und Medien GmbH Weinheim, Stuttgart.
- Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (2005) Gewässergütekarte Baden-Württemberg 2004.
- Lange C, Kuch B, Metzger JW (2015) Occurrence and fate of synthetic musk fragrances in a small German river. *Journal of Hazardous Materials* 282C:34-40.
- Leino RL, Jensen KM, Ankley GT (2005) Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (1):85-98.
- Lucius R, Loos-Frank B (2008) *Biologie von parasiten*, vol 2. Springer Verlag, Berlin.
- Moliner-Martínez Y, Herraéz-Hernandez R, Verdú-Andres J, Campíns-Falcó P, Garrido-Palanca C, Molins-Legua C, Seco A (2013) Study of the influence of temperature and precipitations on the levels of btex in natural waters. *Journal of Hazardous Materials* 263, Part 1 (0):131-138.
- Palma P, Alvarenga P, Palma V, Matos C, Fernandes R, Soares A, Barbosa I (2010) Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: A case study of the Alqueva reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* 17 (3):703-716.
- Pavlica M, Štambuk A, Malović L, Mladinić M, Klobučar GV (2011) DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* l.) as an indicator of pollution-related genotoxicity in the river Sava. *Environmental Monitoring and Assessment* 177 (1-4):85-94.

- Peakall D, B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 3:157-160.
- Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Triebkorn R (2014) Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106 (0):115-125.
- Pöckl M (1993) Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*). Entwicklungszyklus und Fortpflanzungskapazität. *Natur und Museum* 123 (4):114-125.
- Regierungspräsidium Stuttgart. (2005) Eg – Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/eg), vorläufiger Bericht zur Bestandsaufnahme, Teil b Bearbeitungsgebiet Neckar (Stand 24.02.2005).
- 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 (3):442-448.
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski KU, Nagel R, Kohler HR, Triebkorn R (2006) Bisphenol a in artificial indoor streams: Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (amphipoda). *Ecotoxicology* 15 (2):143-156.
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Nagel R, Triebkorn R, Kohler HR (2005) Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49 (1):53-61.
- Schnurstein A, Braunbeck T (2001) Tail moment versus tail length--application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49 (2):187-196.
- Sures B (2008) Host-parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology* 73 (9):2133-2142.
- Sures B, Siddall R (2003) *Pomphorhynchus laevis* (palaecanthocephala) in the intestine of chub (*Leuciscus cephalus*) as an indicator of metal pollution. *International Journal of Parasitology* 33 (1):65-70.
- Takashima F, Hibiya T (1995) An atlas of fish histology, normal and pathological features. 2 edn. Kodansha Ltd.
- Torres de Lemos C, Milan Rodel P, Regina Terra N, Cristina D'Avila de Oliveira N, Erdtmann B (2007) River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66 (3):391-401.
- Triebkorn R (2012) Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Monitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese "Schussen Aktiv" <http://schussenaktivplus.de>. Accessed 31.10.2014.

- Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler H-R, Triebkorn R (2014) Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar river (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13.
- Wester PW, van der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwis GCM, Vos JG (2002) Aquatic toxicology: Opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11 (3–4):289-295.
- Yoo JL, Janz DM (2003) Tissue-specific hsp70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal-contaminated creek. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (1):110-120.
- Zhu S, Chen H, Li J (2013) Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan lake basin, Eastern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96 (0):154-159.

3.7 Anhänge

Anhang 1: Histopathologie: Entwässerung von Flohkrebsen und Einbettung in Technovit 7100.

Zeit	Lösung
60 min	70% Ethanol
60 min	80% Ethanol
60 min	90% Ethanol
30 min	96% Ethanol
120 min	100% Ethanol
3x10 min	1:2 Mischung aus 100% Ethanol und Technovit7100 (Vorbereitungslösung I)
über Nacht	10g/l Technovit Härter I gelöst in Technovit7100 (Vorbereitungslösung II)
Einbettung mit 1:16 Härter II gelöst in Vorbereitungslösung II	
Aufbringen der Halterung mit Technovit3040 gelöst in Technovit Universal Liquid	

Anhang 2: Histopathologie: Entwässerung von Fischgeweben und Einbettung in Paraffin.

Zeit	Lösung
1x30 min, 1x90 min	70% Ethanol
60 min	80% Ethanol
60 min	90% Ethanol
60 min	96% Ethanol
2x60 min	100% Ethanol
1x90 min, 1x120 min	Isopropanol
180 min	1:2 Mischung aus Isopropanol und Paraffin
1x180 min, 1x300 min	Paraffin
Einbettung der Gewebe in Paraffin	

Anhang 3: Histopathologie: Richardson-Färbung der Flohkrebse (Dünnschnitte, Technovit).

Zeit	Lösung
3 min	Richardsonblau
1 min	70% Ethanol
1 min	Aqua dest.

Anhang 4: Histopathologie: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Flohkrebse (Dünnschnitte, Technovit).

Zeit	Lösung
60 min	Hämatoxylin nach Gill
20 min	Fließendes Leitungswasser
Kurz	Aqua dest.
15 min	Eosin
2x Kurz	96% Ethanol
2x Kurz	100% Ethanol
2x10min	Rotihistol

Anhang 5: Histopathologie: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Fischgewebe (Dünnschnitte, Paraffin).

Zeit	Lösung
2x10 min	Rotihistol
5 min	100% Ethanol
5 min	90% Ethanol
5 min	80% Ethanol
5 min	70% Ethanol
5 min	Aqua dest.
3 min	Hämatoxylin nach Mayer
20 min	fließendes Leitungswasser
5 min	Eosin
kurz	70% Ethanol
5 min	80% Ethanol
5 min	90% Ethanol
5 min	96% Ethanol
5 min	100% Ethanol
2x5 min	Rotihistol

Anhang 6: Histopathologie: Alcianblau – PAS (Periodic Acid Schiff)-Färbung der Fischgewebe (Dünnschnitte, Paraffin).

Zeit	Lösung
3 min	Rotihistol
2 min	96% Ethanol
2 min	80% Ethanol
2 min	60% Ethanol
5 min	Aqua dest.
3 min	3% Essigsäure
30 min	Alcianblau
kurz	3% Essigsäure
5 min	Aqua dest.
10 min	1% Perjodsäure
kurz	Aqua dest.
5 min	Schiffssches Reagenz
3x2 min	Sulfitwasser
15 min	Fließendes Leitungswasser
kurz	Aqua dest.
5 min	70% Ethanol

5 min

80% Ethanol

5 min

90% Ethanol

5 min

100% Ethanol

5 min

Rotihistol

Kapitel 4: Impact of wastewater on fish health: A case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools

Krisztina Vincze¹, Volker Scheil¹, Bertram Kuch², Heinz-R. Köhler¹, Rita Triebskorn^{1,3}

¹*Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Str. 20, D-72072 Tübingen, Germany*

²*Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Bandtäle 2, D-70569, Stuttgart, Germany*

³*Steinbeis-Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany*

Originalpublikation bei Environmental Science and Pollution Research: 1-18, 2015

4.1 Abstract

The present work describes a field survey aiming at assessing the impact of a sewage treatment plant (STP) effluent on fish health by means of biomarkers. Indigenous fish were absent downstream of the STP. To elucidate the reason behind this, brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) were exposed in floating steel cages up- and downstream of a STP located at the Neckar River near Tübingen (Southern Germany), for 10 and 30 days. A combination of biomarker methods (histopathological investigations, analysis of the stress protein Hsp70, micronucleus test, B-esterase assays) offered the possibility to investigate endocrine, geno-, proteo-, and neurotoxic effects in fish organs. Biological results were complemented with chemical analyses on 20 accumulative substances in fish tissue. Even after short-term exposure, biomarkers revealed clear evidence of water contamination at both Neckar River sites, however, physiological responses of caged brown trout were more severe downstream of the STP.

According to this, similar bioaccumulation levels (low $\mu\text{g}/\text{kg}$ range) of DDE and 12 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were detected at both sampling sites, while up to 4-fold higher concentrations of 4 PAHs, methyl-triclosan, and two synthetic musks occurred in the tissues of downstream-exposed fish.

The results obtained in this study suggest a constitutive background pollution at both sites investigated at the Neckar River and provided evidence for the additional negative impact of the STP Tübingen on water quality and the health condition of fish.

Keywords: histopathology, stress protein Hsp70, micronucleus test, B-esterase, bioaccumulation

4.2 Introduction

Sewage treatment plant (STP) effluents belong to the main sources for contaminants in surface waters in industrialized countries, by which numerous household chemicals, pharmaceuticals, consumables as well as biogenic hormones are released directly to the environment after having passed treatment processes (Kolpin et al. 2002). The chemical complexity of STP effluents is highly variable and hard to quantify thoroughly, moreover, in many cases little is known on the toxic effects of both the individual substances and mixtures of them. In this regard, biological effect monitoring is a useful tool to provide information on potential toxicity risks for aquatic organisms (Aguayo et al. 2004).

Fish are considered sensitive monitoring organisms indicating the quality of the aquatic environment (Eggen et al. 2004; Wester et al. 2002). In the open literature there is a large number of passive monitoring studies which were conducted with resident fish (e.g. (Carballo et al. 2005; Tetreault et al. 2012), but also transplanted individuals (caged fish, active monitoring) are used for the investigation of the pollutant burden in habitats with anthropogenic influence (e.g. (Abrahamson et al. 2007; Kerambrun et al. 2011; Oikari et al. 1985; Carney Almroth et al. 2008; Lindström-Seppä and Oikari 1990)

In contrast to laboratory biotests for water quality assessment (proposed e.g. by Escher et al. (2013), *in situ* exposure (caging) of fish for ecotoxicological risk assessment purposes can be highly advantageous, since storage and pre-treatment of water samples are not required. Furthermore, the use of cages for the containment of fish during field exposure allows confinement to the location of interest and convenient sampling (Grizzle et al. 1988). In

addition, during active monitoring it is possible to use individuals of a homogeneous age structure with a known life history, thus de-sensitisation of physiological responses (resistance) of the organisms to environmental chemicals resulted by long-term and multigenerational exposure can be avoided. However, some fundamental differences between resident end exposed fish have to be considered when using data from active monitoring experiments for water quality assessment: In contrast to indigenous individuals, caged fish are usually kept in high densities, receive additional artificial food, do not come in full contact with the environment (e.g. get around sediments) and have no possibility to actively avoid short-term pollution plumes (Bernet et al. 2001).

In order to assess the health of either indigenous or actively exposed organisms, biomarkers can provide information on their physiological status ranging from the molecular to the individual level (Moore et al. 2004; de la Torre et al. 2007). Biomarkers, which are defined as biological responses of organisms that give a measure of exposure and/or of toxic effect (Peakall 1994), such as gene expression alterations, increased biotransformation enzyme levels, immune responses, histological impairments, modified behaviour, etc. can serve as early warning system and provide a better understanding on the environmental and ecological effects of contaminants (Walker 1995).

The Neckar River is an excellent model for ecotoxicological investigations, since it is still recovering from the pollution that has gone along with the rapid industrial development during the last five decades. Today, the water quality is considered as “moderate” according to the European Water Framework Directive (Haberbosch et al. 2012), however, there are still several wastewater-loaded sections registered in the region. Water quality assessment in the Neckar River has been of interest also in the past. There were studies conducted at the lower-Neckar River region (close to the estuary into the Rhine River) using biomarkers: Braunbeck et al. (2009), for instance, detected genotoxic effects and strong histological impairments in roach (*Rutilus rutilus*) and gudgeon (*Gobio gobio*) collected from the Heidelberg Neckar region. Also sediment extracts from a tributary to Neckar River (Forellenbach) were found to exhibit strong aromatic hydrocarbon receptor-mediated effects in rainbow trout liver cell line (RTL-W1) as well as high mutagenicity in the *Salmonella* microsome assay (Brack et al. 2005). Similarly, aromatic hydrocarbon receptor agonist activity could be measured by different cell lines incubated with surface water and suspended particulate matter after raining events from the Heidelberg Neckar River area (Wolz et al. 2008).

Our research sheds a light on toxic effects of the upper Neckar section near Tübingen at several sampling sites up- and downstream of the local STP. Previously published data (Vincze et al. 2014) reported on proteo- and embryotoxic effects of water and sediment samples from the above mentioned area. Our further results obtained by passive monitoring revealed a damaged health status of gammarids (*Gammarus roeseli*) and chub (*Leuciscus cephalus*) in this region. Examination of fish living directly downstream of the Tübingen STP was, however, not possible due to very low catch numbers, although the biological (vegetation and presence of aquatic invertebrates), structural, and physico-chemical parameters at the particular river section were, by all means, suitable for several fish species.

In order to overcome the problem with the very low sample size experienced during the chub's passive monitoring and to assess the impact of the Tübingen STP effluent on fish health, an active monitoring study was carried out. Juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from an uncontaminated fish farm were exposed in floating cages in the Neckar River up- and downstream of the Tübingen STP discharge for 10 and 30 days, respectively. Since there is no uncontaminated reference site in the investigated River section, non-exposed fish from the same hatchery served as control.

In order to provide an understanding of the exposure conditions and their effects in fish, biomarker data for histopathology, micronucleus test (genotoxicity), stress protein Hsp70 (proteotoxicity), and three B-esterases (neurotoxicity and biotransformation) were complemented with chemical analysis of trout tissue. There were 20 bioaccumulative organic substances such as PAHs, synthetic musks, DDT, and a disinfectant derivative selected for this purpose, which frequently occur in wastewater-loaded or polluted aquatic habitats.

The present work addresses both local/case-specific and general aspects: On one hand, we aim to fill the gaps in information about the adverse effects of the effluents of the Tübingen STP on piscine health and their contribution to the pollutant burden in the upper Neckar region. On the other hand, the Neckar River also represents a "model" aquatic habitat with strong anthropogenic influence, thus our further goal is to evaluate and confirm the applied monitoring technique and the combination of the investigated biomarkers in respect to their suitability for environmental risk characterisation. Additionally, our study offers a possibility to compare the consequences of a short- and intermediate-term exposure to STP effluents on the health status of caged fish and to discuss the cohesion between chemical analysis and biological effect data.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Ethics statement

The study was approved by the animal ethics committee of the Regional Council Tübingen (permission number: ZP2/11) and the Rural District Office of the Tübingen region (permission number: 41/691/Ka). According to the requirements of the German Animal Protection Law, brown trout were sacrificed through a spine cut in the neck region following an anaesthetic overdose of tricaine (MS-222) solution.

4.3.2 Exposure of brown trout

Experiments were conducted at two Neckar River sites: site one was located app. 1 km upstream and site two app. 180 m downstream of the Tübingen STP discharge (Fig. 1). The Tübingen STP is a conventional municipal treatment plant (without additional upgrades like, e.g., activated charcoal filter or ozonation) receiving communal wastewater from an area with about 100,000 inhabitants. The daily sewage load adds up between 40,000 and 50,000 m³ (EBT – Disposal Operating Tübingen (Entsorgungsbetriebe Tübingen) 2005). Some basic physicochemical properties of the monitored sites are presented in appendix A.

In the frame of an active monitoring, 30 1.5-year-old brown trout were exposed in floating steel cages at both sites. Brown trout were obtained from a fish hatchery (Alpirsbach, Germany) receiving an unpolluted stream as water source. Fish cages were designed by the authors and custom-built at the workshop of Tübingen University. They consisted of a 0.6x1x0.5 m perforated high-quality stainless steel box with a lockable hatch and two plastic cylinders attached to the upper part of the cage- in order to ensure floating. Cages were fixed with chains to the riverbank at two points each. According to previous limnological measurements (Vincze et al. 2014), the physico-chemical properties of water were suitable for brown trout to survive at both exposure sites and, moreover, this fish species is also native to in the Tübingen Neckar River section (Haberbosch et al. 2012). Exposed fish were fed trout-pellets (equivalent to those used in the fish hatchery) *ad libitum* every other day; at these occasions mortality was recorded and dead trout were removed immediately.

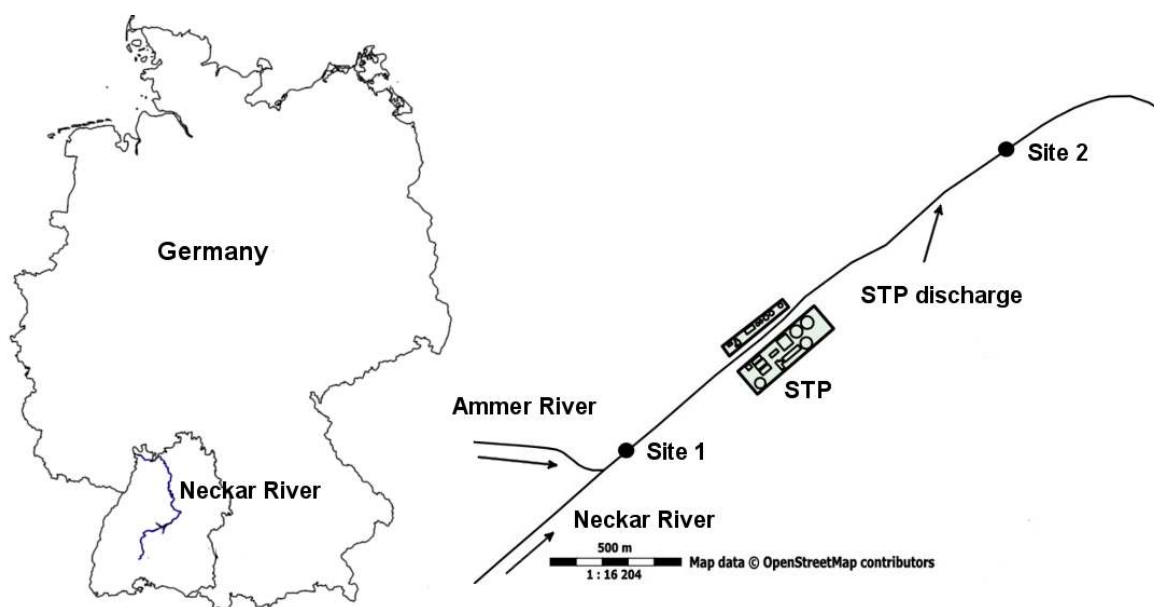


Figure 1: Exposure sites (black dots) along the Neckar River (Southern Germany) up- and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP). Arrows indicate water flow directions and the location of the STP discharge. Created in OpenStreetMap.

4.3.3 Sampling events

Sampling took place after 10 (June 20, 2012) and 30 (July 10, 2012) days, respectively, in order to compare the differences between short- and intermediate-term exposure. During the first sampling event, 50% of the surviving individuals were investigated (14 fish upstream and 12 fish downstream of the STP). At the second event, all remaining fish were sampled (10 trout upstream and 9 downstream of the STP). As a reference, 15 brown trout of identical age from the Alpirsbach hatchery were examined (June 10, 2012). The mean length and weight of control fish were 15.97 cm and 47.79 g, respectively.

Fish were sacrificed by spine-cut in the neck region following an anaesthetic overdose of tricaine (MS-222) solution. Blood was collected with a pipette immediately after spine-cut for the micronucleus assay. Tissue samples of liver, gills, gonads, and kidney were carefully taken for histopathological investigations and were fixed immediately in 2% glutardialdehyde (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) dissolved in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.6, Roth, Karlsruhe, Germany). For the quantification of the heat shock protein (Hsp70) level, tissue samples of gills, liver, gonads, and kidney were placed in Eppendorf tubes and frozen in liquid nitrogen immediately after dissection. Brain samples were processed identically for the B-esterase assays. For residue analysis of organic compounds, the remaining tissue (including muscle and inner organs) was wrapped in aluminium foil and

transported to the laboratory in a cooling box (at 0 - 4°C). Histological and micronucleus samples were kept at 4 °C, while tissues for Hsp70 quantification, B-esterase assays, and chemical analysis were stored at -80 °C until further processing.

4.3.4 Chemicals

All chemicals used were of highest purity available. Unless stated otherwise, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

4.3.5 Micronucleus test

Micronuclei are generated during failure of cell division through the lack of centromeres or inadequate function of microtubules (Al-Sabti and Metcalfe 1995), thus indicating potentials of genotoxicity.

Using a 24x40 mm cover slip (Langenbrick, Emmendingen, Germany) one drop of blood was smeared in a thin layer onto pre-cleaned (96 % ethanol) 76x26 mm microscope slides (two slides per individual, Langenbrick, Emmendingen, Germany) immediately after blood collection. In the following steps, slides were fixed and stained as described in Rocha et al. (2009). The amount of erythrocytes containing micronuclei was assessed by inspecting 1000 cells per slide under the light microscope (Axioskop2, Zeiss, Oberkochen, Germany). For detailed evaluation and scoring criteria, see the work of Rocha et al. (2009) and Boettcher et al. (2010). Results describe the objected fraction of erythrocytes containing micronuclei as percentages.

4.3.6 Hsp70 quantification

Heat shock proteins (Hsps), syn. stress proteins, are among the molecular biomarkers of effect that can be used as indicators for proteotoxic hazards (Gupta et al. 2010). Hsp70 serves multiple roles in the prevention of protein aggregation, it is also involved in nascent protein folding, correct re-folding of damaged polypeptides, and assisting in cellular protein translocation (Frydman 2001).

Hsp70 quantification was carried out based on the work of Köhler et al. (2007). Briefly, tissue samples were mechanically homogenised and prepared for gel electrophoresis. The total

protein concentration for each homogenate was determined according to the method of Bradford (Bradford 1976). Standard amounts of total protein per lane were separated by minigel SDS-PAGE. Following electrophoresis, proteins were electrotransferred to nitrocellulose filters, Hsp70 bands were first labelled with a mouse anti-human Hsp70 monoclonal antibody (Dianova, Hamburg, Germany) whereas, in the following step, a goat anti-mouse IgG (H+L) antibody coupled to peroxidase (Dianova) was applied. The antibody complex was visualised by chloronaphthol. After digitalization of the filters, the optical volume (= grey value intensity x area) of Hsp70 bands was measured by densitometric image analysis (Herolab E.A.S.Y., Wiesloch, Germany). Sample Hsp70 levels were normalised by the mean optical volume calculated for two internal standards (reference homogenate) of the corresponding filter.

4.3.7 Histopathology

Histopathological investigation of various organs offers a possibility to gain structural and mechanistic information on tissue and cellular damage or malfunction. The histological inspection of the gonads also offers a possibility to identify signs for endocrine disruption. Fixed brown trout gills, kidney, liver, and gonad samples were routinely processed for paraffin embedding. For each sample, longitudinal sections of 5 µm in thickness were cut from three different tissue regions. Staining the sections with hematoxylin and eosin solution allowed a differentiation of various cell types in the organs. Sections of gills and liver were additionally stained with periodic acid Schiff reaction in order to identify glycoproteins, e.g. glycogen reserves in the hepatic tissue and mucous cells in the gills.

Samples were qualitatively and semi-quantitatively assessed. Overall tissue condition was summarized for gills, liver, and kidney of each individual fish using a five-grade ranking system: grade 1 - no pathological alterations, complies with control state; grade 2 to 4 - focal mild to moderate alterations, complies with reaction state; grade 5 - extended severe impairments, complies with destruction state. In the gills, the structure of primary filaments and secondary lamellae, furthermore, the condition and proportion of epithelial, pillar, chloride and mucous cells were examined carefully. Fusion of secondary lamellae, epithelial-lifting and aneurism were recorded as well. For detailed ranking criteria see Triebkorn et al. (2008). In the liver, the shape and structure of hepatocytes and their nucleus, the condition of bile canaliculi and blood capillaries, and the quantity of fat and glycogen reserves were

assessed. Any form of impairment, such as necrosis, hypertrophy, hyperplasia, severe vacuolisation, nucleus irregularity, capillary or bile canaliculi dilatation, inflammations, etc. was recorded. For detailed ranking criteria see Triebkorn et al. (2008). In the kidney, the condition and integrity of renal corpuscles, proximal and distal tubules and haematopoietic tissue were evaluated. Ranking was carried out according to the following criteria: Grade 1 - proximal tubules with basophilic cytoplasm, with baso-median located nucleus, distal tubules with very bright cytoplasm and basally located round nuclei, compact glomeruli and haematopoietic tissue; grade 2 - few intercellular macrophages, dilated intercellular spaces; grade 3 - numerous macrophages, reduced haematopoietic tissue, dilated tubules; grade 4 - <20% necrotic cells, strong vacuolisation in the tubuli, high number of macrophages; grade 5 - >20% necrotic cells, severe dilatation and vacuolisation of the tubuli, disintegrated renal corpusculi.

Maturity stage of male and female gonads was evaluated by means of a three-grade scale covering the categories immature (<10% vitellogenic oocytes/no sperms), intermediate (>10% vitellogenic oocytes and < 50% mature oocytes/ <30% sperms) and mature (>50% mature oocytes/ >30% sperms). Any sign of gonadal malformation (like intersex gonads) was recorded as well. Histopathological data were presented as frequencies of the given evaluation grades for each site and exposure duration

4.3.8 B-esterase activity

Acetylcholinesterases (AChE) and carboxylesterases (CbE) belong to the group of hydrolyses which are classified as B-type esterases as they are inhibited by organophosphate compounds (Laguerre et al. 2009). A number of studies provide a solid basis demonstrating that exposure to these substances results in inhibition of AChE and CbE activity in fish (Al-Ghais 2013; Rickwood and Galloway 2004).

Brain samples were mechanically homogenized and prepared for enzyme activity measurements as described by Rault et al. (2008). Total protein content of homogenates was determined according to the method of Lowry, modified by Markwell et al. (1978). AChE activity in a reaction medium containing 5,5-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB, Roth) substrate was measured spectrophotometrically at 405 nm); Details of the method are provided by Ellman et al. (1961) modified by Rault et al. (2008). Since carboxylesterases comprise multiple isoenzymes, the CbE assay was carried out with both 4-nitrophenyl acetate

(NPA) and 4-nitrophenyl valerate (NPV) substrates as described by Sanchez-Hernandez et al. (2009). Specific activities of B-type esterases were expressed as unit (1U = 1 μmol of substrate hydrolyzed per minute) per μg of total proteins.

4.3.9 Chemical analysis of bioaccumulative organic compounds

Fish samples were freeze-dried to constant weight. After homogenization, 2 g of the samples were Soxhlet-extracted (100 mL n-hexane, 6 h). The Soxhlet-extracts were concentrated to 10 mL (rotary evaporator, 350 mbar, 40°C) and stored in 20 mL vials. Aliquots corresponding to 1 g fish sample (dry weight, DW) were transferred into 5 mL vials. After adding of the internal standards (AHTNd₃: 100 μL , 1 ng/ μL AHTN-d₃ in methanol, 16 perdeuterated PAHs according to US-EPA: 100 μL , each 1 ng/L in toluene, DDT-13C¹², DDE-13C¹², DDD-13C¹²: 50 μL , each 1 ng/L in toluene, Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany, LGC Promochem, Wesel, Germany), extracts were concentrated (nitrogen stream, 40 °C) and dissolved in n-hexane (200 μL) before complete dryness. The sample was purified via consecutive elution with increasing solvent polarity (n-hexane, n-hexane/dichloromethane 1:1 v/v, acetone, 5 mL each, LGC Promochem) of the extract on a silica column (1 g). Fractions containing the PAHs, DDE and methyl-triclosan (n-hexane/dichloromethane 1:1 v/v) and the synthetic musks AHTN and HHCB (acetone) were reduced to 50 μL (nitrogen stream, 40 °C).

Analysis of the sample extracts was performed using gas chromatography (HRGC Agilent 6890N) directly coupled to a mass selective spectrometer (LRMS Agilent 5975N). Automatic injection of 1 μL was done in splitless mode at 250 °C. Chromatographic separation was performed on a Varian VF-Xms column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) under constant flow conditions (helium 5.0, 1 mL/min). The GC oven temperature program was the following: initial temperature 80 °C (held 1 min), 7 °C/min 180 °C (held 1 min), 12 °C/min 240 °C, 20 °C/min 300 °C (held 9 min). Samples were analyzed in the single ion monitoring mode using the characteristic fragment ions of the analytes and the corresponding internal standards. The analytes were quantified via the isotope dilution method (PAHs, DDE) or external calibration with internal reference standards (AHTN, HHCB). Depending on the individual sample matrix the limit of quantification (LOQ, signal-noise ratio 6:1) was in the range of 0.1 ng/g DW (PAHs, DDE, methyl-triclosan) and 1 ng/g DW for the synthetic musks (HHCB, AHTN).

4.3.10 Statistical analysis

In order to evaluate mortality data, Fisher's exact test (2-tailed) was applied to the absolute numbers of surviving individuals. Significant differences in histopathology were assessed through a likelihood ratio frequency test. In both above-mentioned tests exposure groups were compared pairwise and, therefore, significance levels were adjusted using the Holm-Bonferroni method. Bioaccumulation, micronucleus frequency, Hsp70 level, and B-esterase activity data was first tested for normal distribution using the Shapiro-Wilks test; in the following step, variance homogeneity was assessed with the Levene test. Where parameter assumptions were met, differences between exposure groups were determined using an all pairs Tukey-Kramer test (Hsp70, B-esterase assays). Data with non-normal distributions or inhomogeneous variances were analysed through the nonparametric Steel-Dwass method (micronucleus test, bioaccumulation). All statistical analysis was carried out using SAS JMP Version 9.0 (SAS Institute GmbH, Böblingen, Germany).

4.4 Results

4.4.1 Mortality

Mortality of exposed brown trout occurred at both sampling sites (Fig. 2); significant differences however, could not be detected. In the first 10 days of exposure, a single dead individual of the total 30 Neckar-introduced fish was counted upstream of the STP, while the number of dead individuals reached 6 downstream. During the first sampling event approximately 50 % of surviving trout were sampled, thus 15 individuals remained upstream and 12 downstream for further exposure. After 30 days, another 5 dead brown trout were recorded at the upstream site and another 3 downstream.

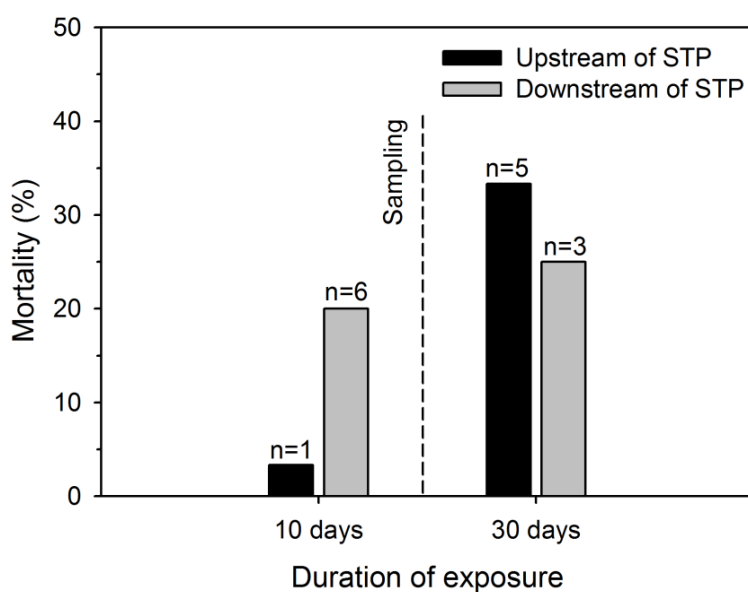


Figure 2: Mortality of brown trout exposed in the Neckar River up- and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP) for 10 and 30 days, respectively. Mortality at day 10 is displayed as the percentage of dead individuals in relation to the initial number of Neckar-introduced fish (n=30), while mortality at day 30 represents the percentage of dead individuals in relation to the total number of brown trout remaining after the first sampling event (n=15 upstream, n=12 downstream).

4.4.2 Micronucleus test

The micronucleus assay with erythrocytes did not reveal any genotoxic effect in the investigated Neckar River section. No differences among the groups were observed, neither between control and Neckar-exposed brown trout, nor between up- and downstream exposed fish (Fig. 3). After 10 and 30 days of exposure, the same low frequencies of erythrocytes containing micronuclei (generally below 0.4 %) were recorded. In addition, neither binuclei nor degenerated blood cells were detected.

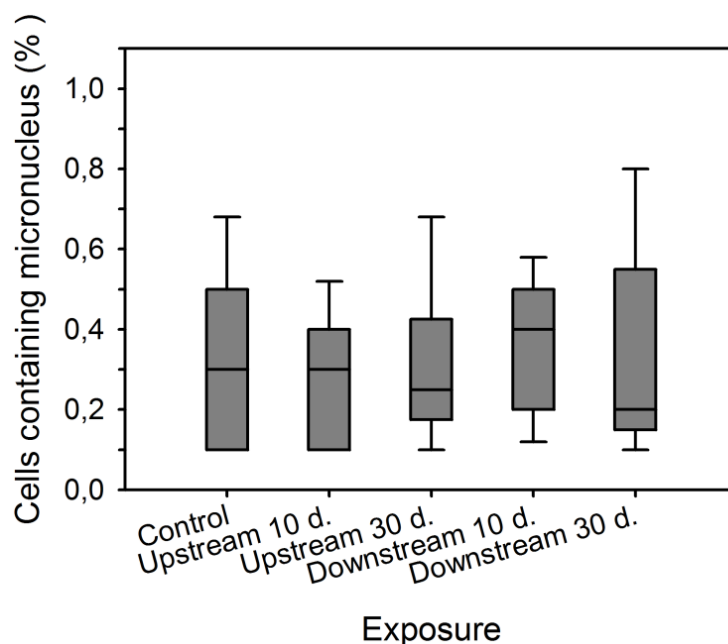


Figure 3: Frequency of micronucleus-containing erythrocytes in brown trout exposed in the Neckar River upstream and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP) for 10 and 30 days, respectively. Results are given as the percentages of fish erythrocytes containing micronuclei of a total 1000 cells scored. Data are given as medians and 25th/75th percentiles (boxes) \pm 5th/95th percentiles (whiskers).

4.4.3 Histopathology

Severe histological abnormalities were recorded in brown trout at both exposure sites. In the gills, fusion of secondary lamella, hypertrophy and hyperplasia of epithelial cells, epithelial-lifting, hypertrophy and an increased number of mucous cells, hypertrophy of chloride cells, and in some cases, cell lesions of the basal membrane and aneurysms could be observed (Figs. 4a and 4b). The liver displayed partial depletion of glycogen and capillary dilatation, also, an increased number of melanomacrophages and granulocytes could be observed as a sign of inflammation. There could be also strong intra- and intercellular vacuolisation and a disintegrated hepatic tissue structure recorded. A high number of hepatocytes occurred with hypertrophic, swollen nuclei, in addition, some individuals displayed strong necrosis of hepatocytes and dilated bile canaliculi (Figs. 4c and 4d). The most remarkable histopathological impairments were, however, recorded in the kidney: Incompact, reduced and partially necrotic hematopoietic tissue with inflammations could be observed. Furthermore, proximal and distal tubules showed proteinaceous fluid in their dilated lumen and intracellular spaces with macrophage infiltration; tubular cells were often hypertrophic and in some cases necrotic with strong vacuolisation, and swollen nuclei. There was also a

high number of completely disintegrated and necrotic glomeruli with capillary dilatation, strong vacuolated epithelial and mesangial cells and with an incontinuos Bowman's capsule recorded (Figs. 4e and 4f). The male and female gonads did not show abnormalities, they were compact with no sign of inflammations, necrosis, lesions etc. (Figs. 4g and 4h). Mixed gonads occurred only in a single individual from the upstream site (10 days). Since such singular observation may have occurred accidentally, it can be assumed that there is no prominent endocrine hazard present in the investigated river section.

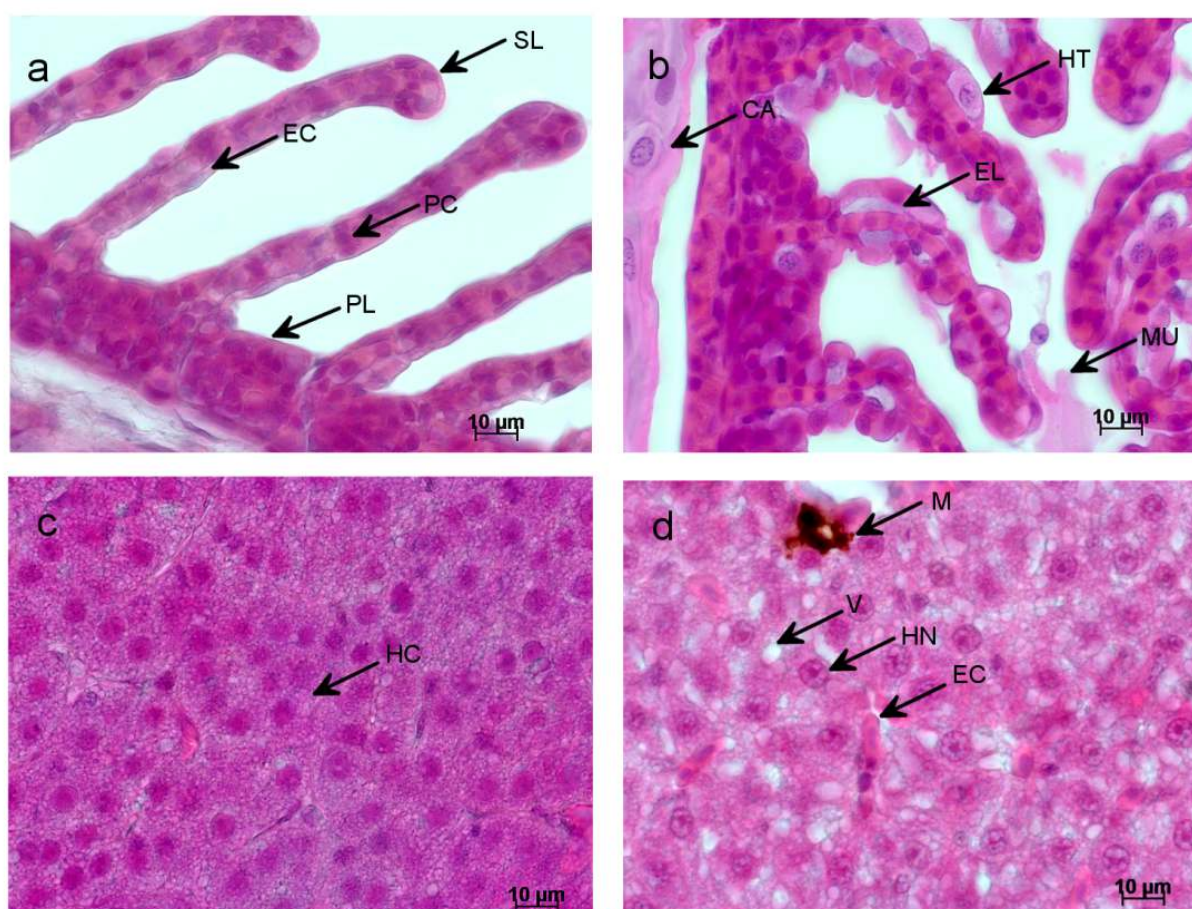


Figure 4a-d: Histopathological alterations in gills (a, b) and liver (c, d). Control fish (left) and brown trout exposed to Neckar water downstream of the Tübingen sewage treatment plant (30 days, right). PL-primary lamella, SL-secondary lamella, EC-epithelial cell, PC-pillar cell, CA-cartilage, EL-epithelia lifting, HT- hypertrophy, MU-mucous fluid, HC-hepatic cell, V-vacuolisation, HN-hypertroph nucleus, ECT-erythrocyte, M-melanomacrophage. Sections were stained with hematoxylin-eosin.

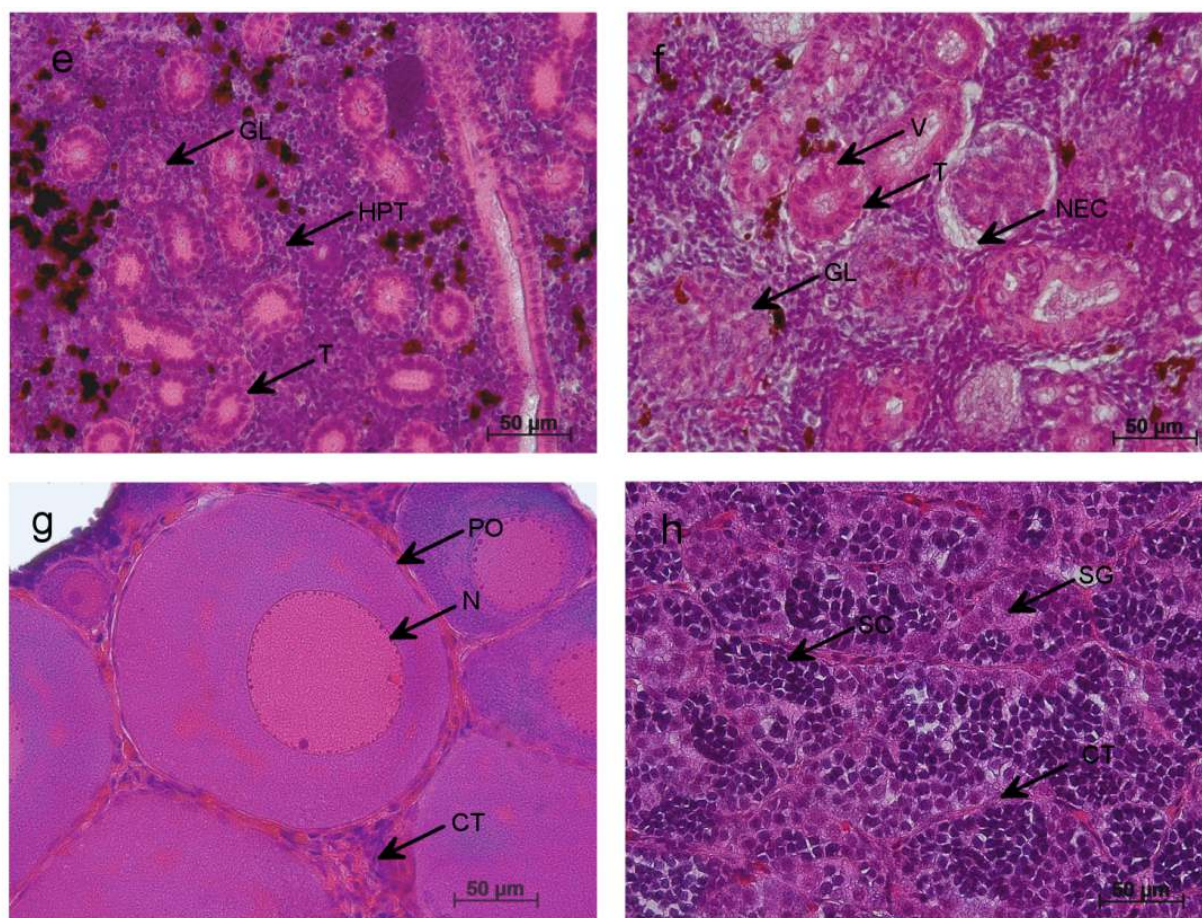


Figure 4e-h: Histopathological alterations in kidney (e, f) and female- (g) and male gonads (h). Control fish (left) and brown trout exposed to Neckar water downstream of the Tübingen sewage treatment plant (30 days, right). GL-glomerulus, T-tubulus, HPT-hematopoietic tissue, NEC-necrosis, PO-primary oocyte, CT-connective tissue, SG-spermatogonium, SC-spermatocyte. Sections were stained with hematoxylin-eosin.

Generally, Neckar-exposed fish tissues and, in some cases, even those of the control specimens were in the reaction state (Fig. 5). Trout exposed for 30 days downstream of the STP showed advanced tissue damage, compared to the control, in the gills ($p = 0.0007$, $\alpha = 0.0167$) (Fig. 5a) and kidney ($p = 0.0163$, $\alpha = 0.05$) (Fig. 5c). The liver (Fig. 5b) and gonads (Fig. 5d and 5e) however, did not reveal any significant differences regarding the tissue condition or maturity stage.

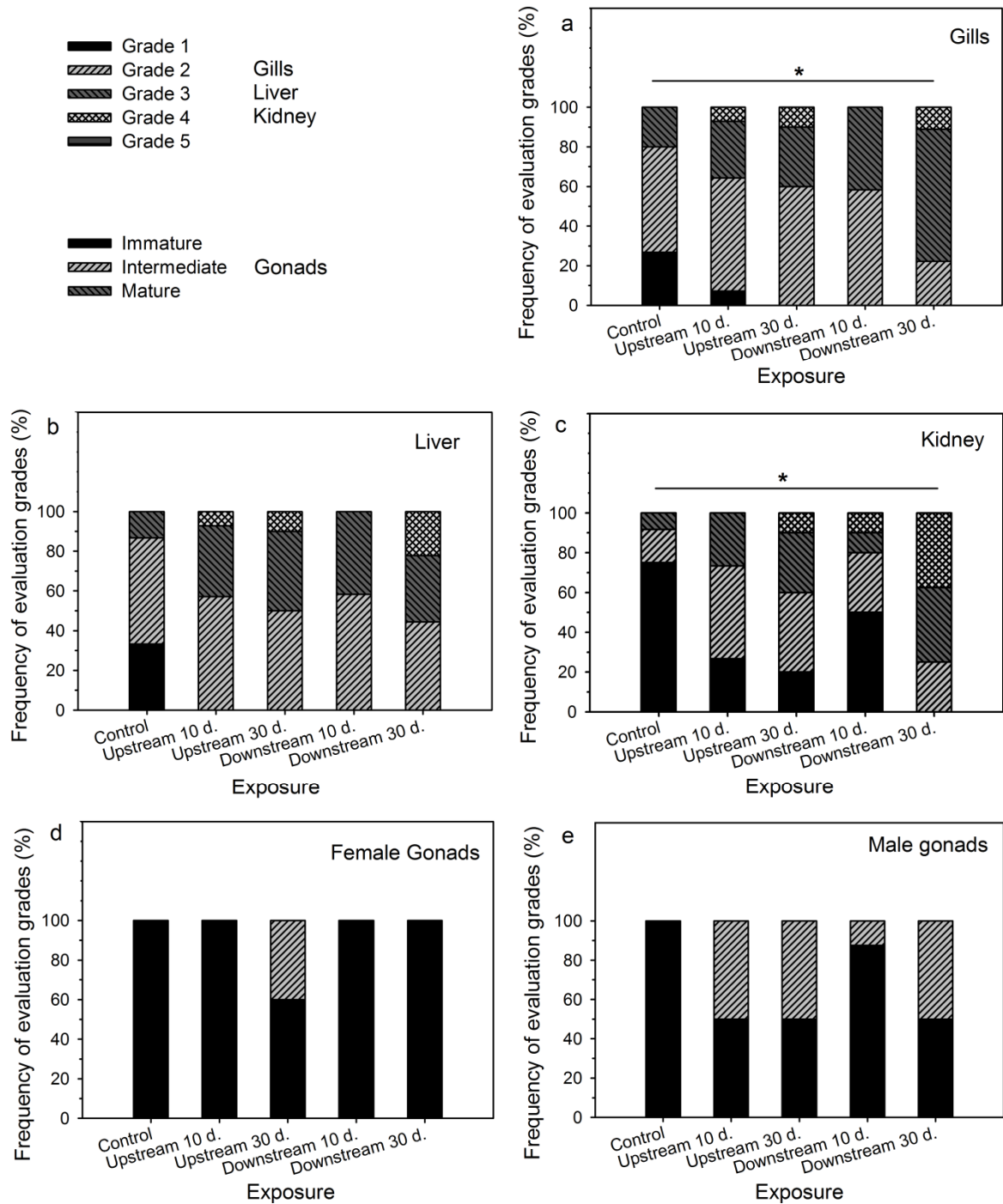


Figure 5: Semi-quantitative histopathological evaluation of gills (a), liver (b), kidney (c), female- (d) and male gonads (e) of brown trout exposed in the Neckar River up- and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP) for 10 and 30 days, respectively. Results are displayed as the frequency (%) of given evaluation grades for each exposure group and organ. Asterisks indicate significant ($*p < \alpha$) differences between exposure groups.

4.4.4 Hsp70 quantification

We observed site-specific as well as duration-dependent differences for the tissues' stress protein levels (Fig. 6, Appendix B). Exposure upstream of the STP discharge led to an Hsp70 induction in the gills (10 days), liver (10 days and 30 days), kidney (30 days) and gonads (10 days) compared to the control. Similarly, brown trout exposed downstream of the STP revealed higher Hsp70 concentrations in the gills (10 days and 30 days), liver (10 days and 30 days), and kidney (30 days) than the control.

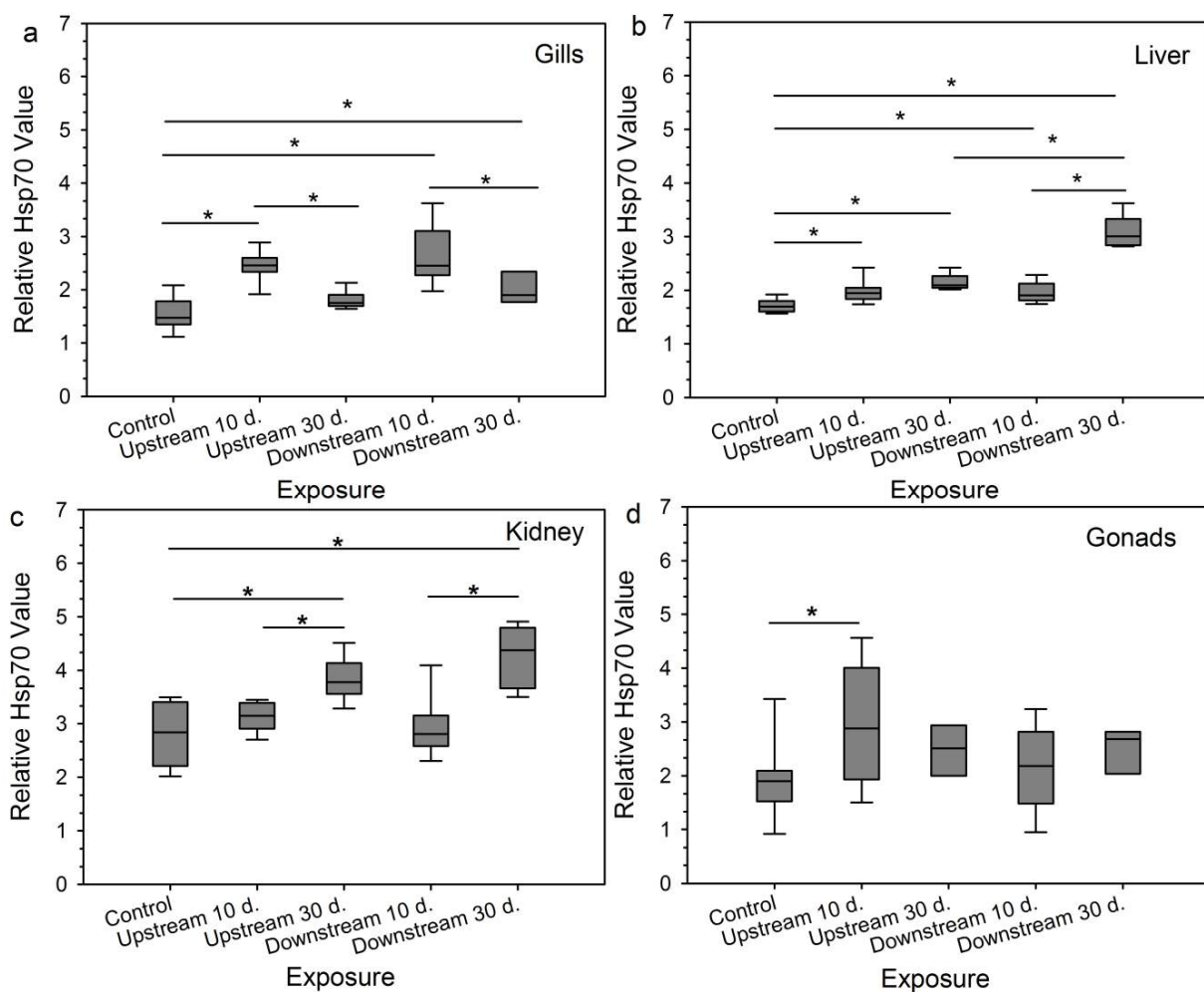


Figure 6: Hsp70 level of gills (a), liver (b), kidney (c) and gonads (d) of brown trout exposed in the Neckar River upstream and downstream of the Tübingen sewage treatment plant for 10 and 30 days, respectively. Hsp70 levels are normalised by internal standards. Data are given as medians and 25th/75th percentiles (box) \pm 5th/95th percentiles (whiskers). Asterisks indicate significant ($*p < 0.05$) differences between exposure groups.

Fish at the downstream site showed a higher stress protein level in the liver when compared to their upstream conspecifics after a 30-day exposure. Interestingly, in gills, Hsp70 levels were considerably increased (upstream as well as downstream) after short-term exposure, while the liver (downstream) and kidney (upstream and downstream) displayed higher Hsp70 concentrations after intermediate-term exposure to the river water.

4.4.5 B-esterase activity

The three B-esterase assays delivered different results regarding the metabolism of xenobiotics in fish brain. AChE activity was higher in brown trout exposed upstream of the STP discharge for 30 days than in the control ($p = 0.0214$, Fig. 7a), while the CbE assay with NPA as a substrate did not reveal any differences between the exposure groups (Fig. 7b). Using NPV as a substrate, however, the CbE assay detected a decreased enzyme activity in fish both from a short-term exposure downstream the STP ($p = 0.0298$) and from an intermediate-term exposure at both sites (upstream: $p = 0.0018$ and downstream: $p = 0.0104$), compared to the control (Fig. 7c).

4.4.6 Chemical analysis of organic compounds

Most of the analysed organic contaminants occurred in the low $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DW) range in the tissues of exposed trout. Nine of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) showed elevated concentration levels after intermediate-term exposure when compared to the short-term one (Fig. 8, Appendix C). Higher concentrations of anthracene (ANT) (10 days), pyrene (PYR) (30 days), benz[a]anthracene (BA) (10 and 30 days) and chrysene (CHR) (10 and 30 days) were detected in downstream-exposed fish, in comparison to the upstream individuals. Similarly, higher concentrations of the two synthetic musks galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) and of the disinfectant derivate methyltriclosan (MTCS) could be measured in the tissues of downstream-exposed trout compared to the upstream ones after 10 as well as after 30 days (Fig 9, Appendix 2). In contrast, almost identical DDE levels were detected in up- and downstream -exposed fish at both sampling events.

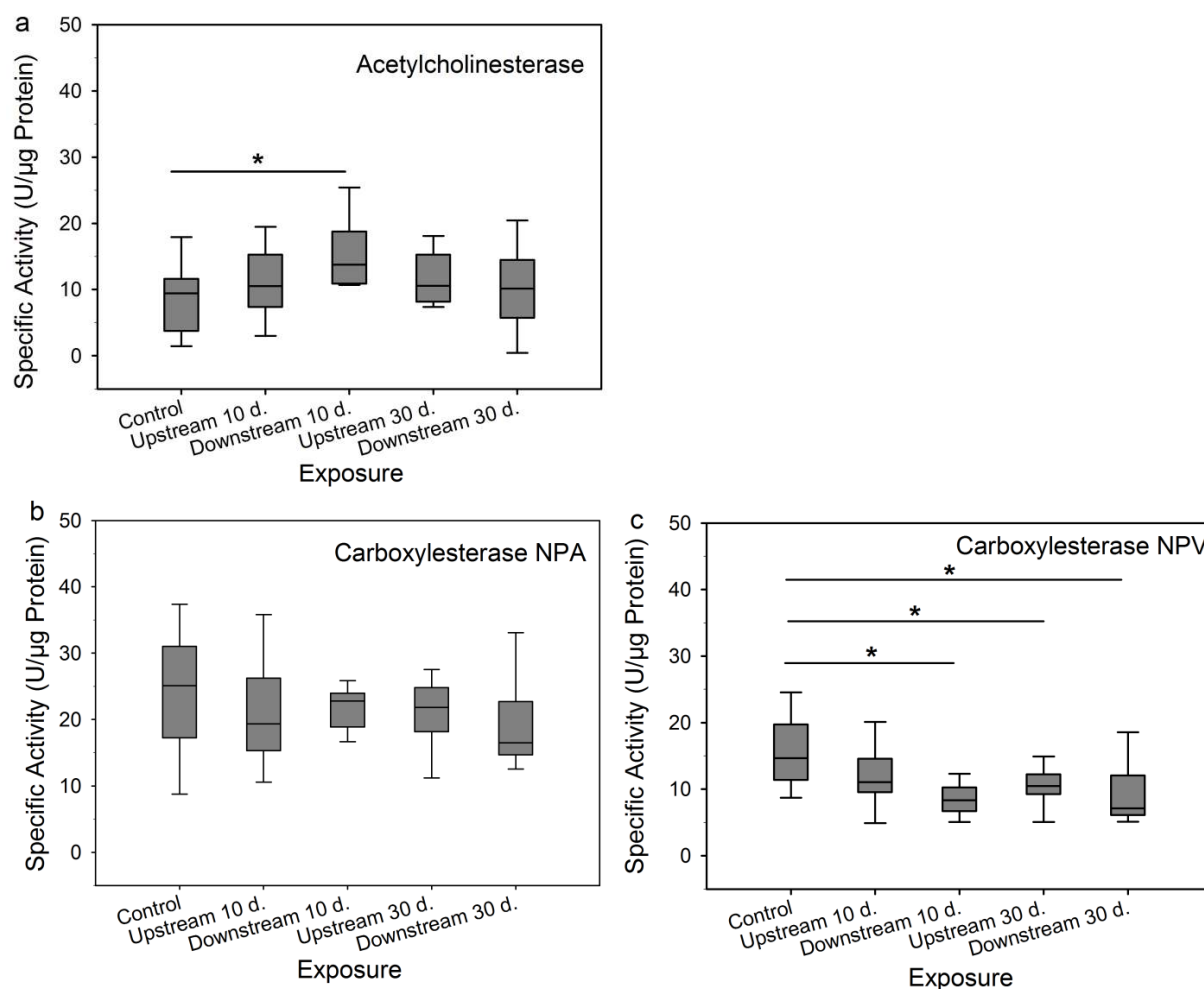


Figure 7: B-esterase activity in the brain of brown trout exposed in the Neckar River upstream and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP) for 10 and 30 days, respectively. The specific activity of acetylcholinesterase (a), carboxylesterase with NPA substrate (b), and carboxylesterase with NPV substrate (c) is given as the amount of substrate units metabolised per μg protein in one minute. Data are given as medians and 25th/75th percentiles (box) \pm 5th/95th percentiles (whiskers). Asterisks indicate significant ($*p < 0.05$) differences between exposure groups.

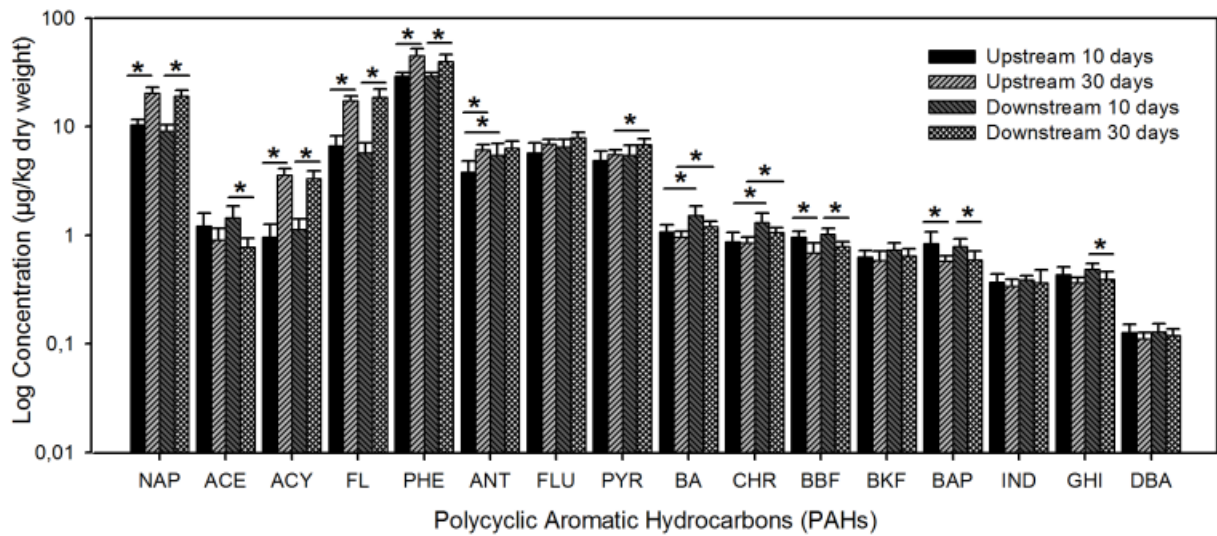


Figure 8: Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in the tissues of brown trout exposed in the Neckar River upstream and downstream of the Tübingen sewage treatment plant (STP) for 10 and 30 days, respectively. Concentration levels (µg/kg dry wt.) are displayed on a logarithmic scale. Data are given as means + S.D. Asterisks indicate significant ($*p < 0.05$) differences between exposure groups.

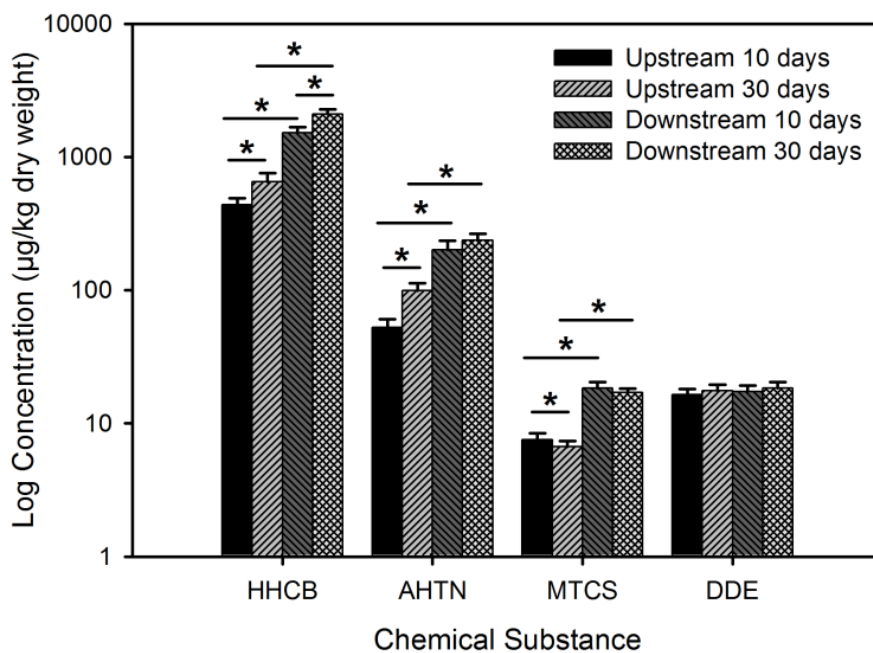


Figure 9: Concentrations of galaxolide (HHCB), tonalide (AHTN), methyltriclosan (MTCS), and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) in the tissues of brown trout exposed in the Neckar River upstream and downstream of the Tübingen sewage treatment plant for 10 and 30 days respectively. Concentration levels (µg/kg DW) are displayed on a logarithmic scale. Data are given as means + S.D. Asterisks indicate significant ($*p < 0.05$) differences between exposure groups.

4.5 Discussion

4.5.1 Toxic burden in the Neckar River and the ecotoxicological effects of the Tübingen STP discharge

Our results shed light on constitutive background pollution in the investigated Neckar River section and confirmed that the Tübingen STP discharge additionally represents a point source with negative impact on fish health.

There was a noticeable mortality of brown trout at both field sites after 10 days of exposure already, which indicates a distinct presence of toxic burden in the whole study area. In this context, we want to point out that there is only a very little chance for adverse effects to be caused by the caging procedure itself, since brown trout were kept at similar densities and received identical diet as they did at the fish farm from which they were originating. Furthermore, identical cages and the same species were repeatedly used in a similar active monitoring study aiming to assess the impact of a STP discharge at another river in Southern Germany of the same size (Maier et al.) whereby mortality of brown trout was close to zero at both up- at downstream sites.

Fish caged upstream of the STP showed a modified AChE and CbE (NPV substrate) activity in their brain after 30 days of exposure and, furthermore, a decreased Hsp70 level could be detected in all organs, in some cases after 10 days already, when compared to the control. Yet, exposure downstream of the STP elicited even more prominent physiological responses: Severe histological alterations, such as aneurisms, the fusion of secondary lamellae, epithelial lifting, hyperplasia of mucous and epithelial cells and chloride cell hypertrophy were induced in the gills after intermediate-term exposure. This group of brown trout also revealed very prominent damage in their kidney, like reduced haematopoietic tissue, disintegrated and necrotic glomeruli, furthermore, necrosis, strong vacuolisation and dilatation and the presence of proteinaceous fluid in the proximal and distal tubuli. Additionally, an elevated stress protein level could be measured in the gills, liver and kidney, and the decrease of CbE activity (NPV substrate) was observed in the brain of brown trout, partially even after short-term exposure. There was, however, no evidence found for the presence of endocrine or genotoxic potentials in the study area.

Chemical analyses and basic physicochemical measurements carried out in the frame of previous investigations (Appendix A) delivered further evidence for contaminant input through the Tübingen STP into the Neckar River. A more detailed discussion of the chemical data will follow below (section 4.3).

Confirming our assumption regarding the background pollution at the upstream site, a number of PAHs were detected, with concentration levels up to 100 µg/g in surface sediments of the Ammer River (Liu et al. 2013) a tributary opening out into Neckar River in direct proximity to the upstream caging site (see Fig. 1). The Ammer is receiving the effluent discharge of two municipal wastewater treatment plants with 90,000 population equivalents, thus water samples collected downstream of the Ammer-STPs also revealed various synthetic musks used in personal care products, such as galaxolide and tonalide with median concentration levels of 0.26 µg/L and 0.06 µg/L respectively (Lange et al. 2015). the presence of environmental contaminants originating from upper STPs and storm water overflow basins have to be regarded. Thus, environmental contaminants that originate from STPs and storm water overflow basins located upstream of our study sites, must be considered relevant in the scheme of analyses.

4.5.2 Evaluation of the active monitoring and the applied biomarker battery

Since investigations in indigenous fish were not possible downstream of the Tübingen STP due to very low catch numbers, we conducted active monitoring experiments with brown trout in order to gain information for a possible explanation for the absence of fish in this river section. Although results from caging experiments cannot always directly be related to the field situation due to several aspects discussed by Oikari (2006), caging nevertheless provides a possibility to relate fish health to water quality, independent of structural stream characteristics.

Biomarker studies in brown trout revealed organ-specific sensitivities and allowed to differentiate between exposure sites and duration of exposure. The micronucleus test is a fast and reliable method assessing genotoxicity. Rodriguez-Cea and colleagues (2003) confirmed that brown trout is one of the most sensitive European species regarding the micronucleus assay: *In situ* surveys of wild freshwater ecosystems with different levels of pollution showed that brown trout inhabiting polluted sites exhibit higher micronuclei frequencies than those caught in clean river systems, while minnows and eels living in polluted sites barely induced

micronuclei. In case of the Tübingen Neckar section however, no genotoxic hazard could be detected: The percentage of erythrocytes with micronuclei was below 0.4 % for all exposure groups. In comparison, Ayllón and co-workers (2000) analysed micronuclei in wild brown trout sampled up- and downstream of the emissions from a military factory containing heavy metals in the Trubia River, Spain. They detected an exponential increase in micronuclei counts (means ranging from 0.04 to 0.41 %) in fish living downstream of the military wastes with respect to trout inhabiting the upstream river areas.

Histological alterations are also frequently used structural biomarkers in aquatic ecotoxicology, since they allow effects to be visible at lower exposure levels than many other “integrative” end-points, such as behavioural changes and mortality (Wester et al. 2002). The present study describes strong impairments in the gills, kidney, and liver of Neckar-transplanted brown trout whereas fish gonads did not show any malformations. Thus, the investigated organs displayed different sensitivity and showed different types of histopathological abnormalities, which can be mainly explained by their physiological functions and anatomic situation: As a respiratory and ion-regulatory organ, the role of gills is to bring blood in close contact with water. For the exchange of gases a large respiratory surface is necessary (Amin et al. 1992). Pollutants may enter to the organisms through the gill lamellae. Therefore, gills are highly susceptible to damage and are rapidly affected by environmental chemicals such as surface active substances, acids, or particle burdens (Pawert et al. 1998). By fusion of the secondary lamellae, as well as by the increased number of protective mucous cells, the exposed surface is reduced. Such impairments increase the thickness of water–blood barrier and decrease the oxygen uptake affecting the proper function of this organ. Aneurisms, epithelial lifting, hyperplasia and hypertrophy of mucus and chloride cells represent mainly cytopathological effects, which can occur in response to a wide variety of chemical stressors or environmental conditions interfering with ion metabolism (Triebkorn et al. 2007). The excretory part of the fish kidney has also an important function in electrolyte and water balance. The high incidence of cytoplasmal vacuolation associated with degeneration in the proximal and distal tubule cells can be related to the presence of various xenobiotics like heavy metals, herbicides (Schwaiger et al. 1997), anti-inflammatory drugs (Schwaiger et al. 2004) etc. Cell damage in the tubulus may cause a disturbance of ion pumps leading to the efflux of ions, enzymes and proteins resulting hypertrophy. The presence of proteinaceous fluid in the tubular lumen impairs the flow of the

filtrate and delays the processes of reabsorption and secretion. Since the excretory kidney maintains an intense blood circulation, pollutants present in the blood can cause severe pathological changes (necrosis, vacuolisation, hypertrophy etc.) also in the renal corpuscle (Silva and Martinez 2007). The liver is the central organ of energy storage (glycogen and fat) as well as toxicant metabolism since fish hepatocytes produce a vast number of phase I and II biotransformation enzymes (for details see Livingstone 1998). An elevated metabolic activity induced by chemical exposure can lead to prominent and clearly identifiable pathological changes such as capillary dilatation, elevated vacuolization and hypertrophy in the hepatocytes or reduced energy reserves etc. (Thophon et al. 2003). Hepatic necrosis can also be strongly associated with oxidative stress; pollutants like pesticides, heavy metals or PAHs have been shown to increase free radical concentrations within the cytoplasm (Abdel-Moneim et al. 2012). Therefore, the liver has a high relevance as a monitor organ for general toxic stress. Male and female gonads, in contrast, are known as specific targets of endocrine disrupting chemicals, thus, gonadal histopathology including the assessment of maturity stages, overall structural features, and the presence of intersex individuals is a tool to identify and understand the effects of potential endocrine disruptors (Leino et al. 2005).

In line with the histopathological results, an elevated Hsp70 level was visible predominantly in the gills, liver, and kidney of fish exposed downstream the STP when compared to the control. In the gills, the induction of Hsp70 was higher after short-term than after intermediate-term exposure, while the liver and kidney revealed higher Hsp70 concentrations after intermediate-term exposure. Tribskorn et al. (2002) reported a similar phenomenon when investigating juvenile brown trout at two time points after a supposed contaminant release in the Katzenbach stream system (also Southern Germany). The authors provided a mechanistic explanation for the differences in the kinetics of Hsp70 induction in the various fish organs: In the case of kidney and liver, stress response requires accumulation of proteotoxic chemicals. Therefore, proteotoxic action and, thus, Hsp70 induction in these organs occurs with some temporal delay, whereas the gill tissue responds immediately even to short-term events due to its close contact with the environment. A large number of further studies (Köhler et al. 1999; Scheil et al. 2010; Hofmann 1999; Hallare et al. 2004; Osterauer and Köhler 2008) have demonstrated that Hsp70 expression is closely linked to a variety of biotic and abiotic stress factors showing a high sensitivity of this stress response system even to minor impacts. To interpret data on Hsp70 levels, however, it should be taken into account,

that a low stress protein level not only indicates homeostasis (“control” state), but can be a consequence of a pathophysiological breakdown of the biochemical stress response (non-compensation zone) instead (Eckwert et al. 1997). Therefore, the combination with complementary biomarkers (for instance histopathological investigations, biotransformation enzymes, and B-esterase measurements, etc.) is crucial for a both sensitive and accurate diagnosis of an organism’s health status.

Fish acetylcholinesterase and carboxylesterase are widely known biomarkers of exposure for organophosphates, carbamates as well as for other contaminants (Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot 2000; Wheelock et al. 2008). For instance, the inhibition of CbE and AChE activity was described in fish when exposed to PAHs such as anthracene and pyrene (Oliveira et al. 2012; Palanikumar et al. 2012; Leticia and Gerardo 2008). The analysis of three B-esterase enzymes in brown trout brain samples provided further information about the toxic potentials in the investigated Neckar River section. Interestingly, the AChE and CbE assays with the substrate NPA did not reveal any or only minor differences in enzyme activity between the exposure groups. In contrast, CbE assay with NPV as the substrate showed a clear-cut response towards enzyme inhibition in fish after short-term exposure downstream the STP and after intermediate-term exposure at both sites. B-esterase sensitivity can largely vary depending on the inhibitor substance (Wogram et al. 2001). Organophosphates and carbamates show, for instance, an increased affinity for CbE over AChE, suggesting that CbE activity provides a more sensitive endpoint (Wheelock et al. 2008). Also, CbE activity comprises different enzyme isoforms which can be found in various tissues including brain, muscles, liver, and blood (Sato and Hosokawa 1998) and plays a significant role in the metabolism and subsequent detoxification of numerous agrochemicals and pharmaceuticals (Wheelock et al. 2008). AChE in contrast, is responsible for the removal of the neurotransmitter acetylcholine from the synaptic cleft through hydrolysis in the parasympathetic as well as in the sympathetic nervous system (Fulton and Key 2001) and does not play any role in toxicant metabolism. Considering these facts, esterase inhibition elicited by certain non-organophosphorous xenobiotics is a reasonable explanation for the distinct CbE (NPV substrate) response and the lack of changes in AChE and CbE (NPA substrate) levels.

4.5.3 Effectivity of the combination of chemical analysis and biological effect data

In total, 20 organic substances were analysed in the current study (16 PAHs, MTCS, DDE, CHR, HHCB), which, most likely, only partially mirror the whole picture at the two field sites, since non-bioaccumulating or easily degradable chemicals were not investigated. In general, and this is also the case in the Neckar River, the exposure situation in the field is often too complex to establish clear cause-effect relationships (Wester et al. 2002). For instance, Henneberg et al. (2014) identified endocrine-disruptive activity in a tributary to Lake Constance (Germany) by *in vitro* and *in vivo* studies while these effects could not be related to analytical data, neither in surface water, sediment or fish tissue, even though chemical analyses had aimed at tracing a vast number of different potential contaminants.

In the Tübingen Neckar region, most of the measured organic contaminants occurred in the low $\mu\text{g}/\text{kg}$ range in tissues of caged brown trout. Higher concentration levels of the synthetic musks HHCB and AHTN, of the disinfectant derivate MTCS, and of 4 PAHs were detected downstream of the STP when compared to the upstream site. Additionally, previous physicochemical measurements ((Vincze et al. 2014), see Appendix A) revealed slightly elevated nutrient and chloride values at the downstream site compared to the upstream one.

Although the exact mode of action of the analysed bioaccumulative substances is largely unknown yet, there is some information available through mesocosm studies and laboratory experiments, which have been carried out under conditions with more limited variables in order to investigate the identity of the specific chemicals associated with distinct adverse effects (Wester et al. 2002). Different PAHs such as benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, and benzo[a]pyrene, for example, can play a significant role in the aetiology of neoplasms and related hepatic lesions and vacuolisation (Vethaak et al. 1996), they are also known to severely affect the innate and acquired immunity (Reynaud and Deschaux 2006) and cause deleterious effects in reproduction (Nicolas 1999), growth, and overall condition in fish (Logan 2007). Despite their ongoing presence in STP effluents, information on the effects of synthetic musks on fish health have been, until recently, quite scarce in the available literature. For HHCB, evidence was found for estrogen-antagonistic activity using *in vitro* and *in vivo* test systems (Simmons et al. 2010). Furthermore, HHCB as well as AHTN were found to interfere with enzymes involved in the synthesis and metabolism of steroids (CYP isoforms) (Schnell et al. 2009). AHTN also exerted

developmental toxicity in zebrafish with a LOEC value in the concentration range similar to the measured levels in sewage effluents and recipients, suggesting adverse impact on indigenous fish (Carlsson and Norrgren 2004). MTCS is a derivative of the widely used bactericide triclosan which is, similarly to the synthetic musks, primarily emitted via STPs into surface water (Lindström et al. 2002). The toxicity of triclosan towards aquatic organisms like fish, crustaceans, and algae has been demonstrated with EC_{50} values in a range close to its environmental concentrations (Matozzo et al. 2012; Liang et al. 2013). Furthermore, it has even been shown to induce cytotoxic, genotoxic, and endocrine disruptor effects (Bedoux et al. 2012). For MTCS, however, little information is available regarding its impact on fish health.

Considering the adverse effects of the above-mentioned substances, there is a high chance that these contaminants negatively influence the health status of fish either living or being caged in the Neckar River. In the current study, 12 measured pollutants showed elevated tissue concentration levels after intermediate-term exposure (30d) when compared to the short-term one (10d). In line with this, exposed brown trout showed more prominent physiological responses (histology, Hsp70, CbE) after a 30 day-caging. Thus, the findings of the chemical analysis strongly support the results of the applied biomarker tests and increase the plausibility that the release of environmental pollutants via STPs negatively affects fish health.

4.6 Conclusions

The present study revealed a constitutive background pollution at the investigated upstream and downstream Neckar River sites and provided evidence for an additional, negative impact of the Tübingen STP on fish health. The applied biomarker battery revealed information on responses of fish at different biological levels, which can plausibly be related to contaminants in the stream water. Although only few pollutants were chemically analysed, even these data shed a light on the complex pollution burden at the investigated field sites. Consequently, the techniques used in the current study are highly recommended for an assessment of the ecotoxicological status of freshwater systems and for the identification of potential contaminant sources.

4.7 Acknowledgements

The authors acknowledge the Carl Zeiss Foundation and the Foundation of the Landesnaturschutzverband (LNV) Baden-Württemberg for their financial support. We also thank Simon Schwarz for advice on the statistics, Alexandra Scheil and Bálint Nagy for comments on the manuscript, Stefanie Kraus for the introduction to the B-esterase assays and Andreas Dieterich, Anja Henneberg, Carla Lorenz, Diana Maier, Katharina Peschke and Paul Thellmann for their assistance and help in the field.

4.8 References

- Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, Elmenshawy OM (2012) Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere* 88 (8):1028-1035.
- Abrahamson A, Andersson C, Jönsson ME, Fogelberg O, Örberg J, Brunström B, Brandt I (2007) Gill EROD in monitoring of cyp1a inducers in fish—a study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in stockholm and uppsala waters. *Aquatic Toxicology* 85 (1):1-8.
- Aguayo S, Muñoz MJ, de la Torre A, Roset J, de la Peña E, Carballo M (2004) Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of The Total Environment* 328 (1–3):69-81.
- Al-Ghais SM (2013) Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin* 74 (1):183-186.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343:121-135.
- Amin AB, Mortensen L, Poppe T (1992) Histology atlas, normal structure of salmonids. Offset Nord AS, Norway.
- Ayllón F, Suciú R, Gephard S, Juanes F, Garcia-Vazquez E (2000) Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 470 (2):169-176.
- Bedoux G, Roig B, Thomas O, Dupont V, Le Bot B (2012) Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 19 (4):1044-1065.
- Bernet D, Schmidt H, Wahli T, Burkhardt-Holm P (2001) Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* l.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48 (2):140-147.
- Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seitz N, Rocha PS, Hollert H, Braunbeck T (2010) Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube river by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 700 (1–2):11-17.
- Brack W, Schirmer K, Erdinger L, Hollert H (2005) Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-o-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (10):2445-2458.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2):248-254.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P (2009) Fish populations under stress - the example of the lower Neckar river (Fischpopulationen unter Stress – das Beispiel des unteren Neckars). *Environmental Sciences Europe (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung)* 21 (2):197-211.

- Carballo M, Aguayo S, de la Torre A, Muñoz MJ (2005) Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of sewage treatment plants. *Science of The Total Environment* 341 (1–3):71-79.
- Carlsson G, Norrgren L (2004) Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (1):102-105.
- Carney Almroth B, Albertsson E, Sturve J, Förlin L (2008) Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (3):370-378.
- de la Torre FR, Salibián A, Ferrari L (2007) Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68 (8):1582-1590.
- EBT – Disposal Operating Tübingen (Entsorgungsbetriebe Tübingen) (2005) Service report 2004 (Anerkennung Dienstleistung 2004). <http://www.um.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/11336/>. Accessed 8. 07. 2013.
- Eckwert H, Alberti G, Kohler H-R (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* 6 (5):249-262.
- Eggen RI, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, Schweigert N (2004): Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 38 (3):58A-64A.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7 (2):88-95.
- Escher BI, Allinson M, Altenburger R, Bain PA, Balaguer P, Busch W, Crago J, Denslow ND, Dopp E, Hilscherova K, Humpage AR, Kumar A, Grimaldi M, Jayasinghe BS, Jarosova B, Jia A, Makarov S, Maruya KA, Medvedev A, Mehinto AC, Mendez JE, Poulsen A, Prochazka E, Richard J, Schifferli A, Schlenk D, Scholz S, Shiraishi F, Snyder S, Su G, Tang JYM, Burg Bvd, Linden SCvd, Werner I, Westerheide SD, Wong CKC, Yang M, Yeung BHY, Zhang X, Leusch FDL (2013) Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with *in vitro* bioassays. *Environmental Science & Technology* 48 (3):1940-1956.
- Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 70 (1):603.
- Fulton MH, Key PB (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (1):37-45.
- Grizzle JM, Horowitz SA, Strength DR (1988) Caged fish as monitors of pollution: Effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Journal of the American Water Resources Association* 24 (5):951-959.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences* 86 (11–12):377-384.
- Haberbosch R, Hoffmann R, Wnuck H (2012) Fish fauna and fishing of the middle Neckar river (vom Wildfluss zur Wasserstraße - Fischfauna und Fischerei im mittleren Neckar). 1 edn. VFG Service und Verlags GmbH, Stuttgart.

- Hallare AV, Köhler HR, Triebkorn R (2004) Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56 (7):659-666.
- Henneberg A, Bender K, Blaha L, Giebner S, Kuch B, Kohler HR, Maier D, Oehlmann J, Richter D, Scheurer M, Schulte-Oehlmann U, Sieratowicz A, Ziebart S, Triebkorn R (2014) Are *in vitro* methods for the detection of endocrine potentials in the aquatic environment predictive for *in vivo* effects? Outcomes of the projects SchussenAktiv and SchussenAktivPlus in the lake Constance area, Germany. *PLoS One* 9 (6):e98307.
- Hofmann GE (1999) Ecologically relevant variation in induction and function of heat shock proteins in marine organisms. *American Zoologist* 39:889-900.
- Kerambrun E, Sanchez W, Henry F, Amara R (2011) Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154 (3):187-195.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36 (6):1202-1211.
- Köhler H-R, Eckwert H, Triebkorn R, Bengtsson G (1999) Interaction between tolerance and 70kda stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Applied Soil Ecology* 11 (1):43-52.
- Köhler HR, Sandu C, Scheil V, Nagy-Petrica EM, Segner H, Telcean I, Stan G, Triebkorn R (2007) Monitoring pollution in river Mures, Pomania, part III: Biochemical effect markers in fish and integrative reflection. *Environmental Monitoring and Assessment* 127 (1-3):47-54.
- Laguerre C, Sanchez-Hernandez JC, Köhler HR, Triebkorn R, Capowiez Y, Rault M, Mazzia C (2009) B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Pollution* 157 (1):199-207.
- Lange C, Kuch B, Metzger JW (2015) Occurrence and fate of synthetic musk fragrances in a small german river. *Journal of Hazardous Materials* 282C:34-40.
- Leino RL, Jensen KM, Ankley GT (2005) Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (1):85-98.
- Leticia A-G, Gerardo G-B (2008) Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish haemulon plumieri. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (3):787-797.
- Liang X, Nie X, Ying G, An T, Li K (2013) Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere* 90 (3):1281-1288.
- Lindström-Seppä P, Oikari A (1990) Biotransformation and other toxicological and physiological responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*) caged in a lake receiving effluents of pulp and paper industry. *Aquatic Toxicology* 16 (3):187-204.

- Lindström A, Buerge IJ, Poiger T, Bergqvist P-A, Müller MD, Buser H-R (2002) Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental Science & Technology* 36 (11):2322-2329.
- Liu Y, Beckingham B, Ruegner H, Li Z, Ma L, Schwientek M, Xie H, Zhao J, Grathwohl P (2013) Comparison of sedimentary PAHs in the rivers of Ammer (Germany) and Liangtan (China): Differences between early- and newly-industrialized countries. *Environmental Science & Technology* 47 (2):701-709.
- Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 120 (1):43-49.
- Logan DT (2007) Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 13 (2):302-316.
- Maier D, Blaha L, Giesy JP, Henneberg A, Köhler H-R, Kuch B, Osterauer R, Peschke K, Richter D, Scheurer M, Triebkorn R Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Research* (in press).
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87 (1):206-210.
- Matozzo V, Formenti A, Donadello G, Marin MG (2012) A multi-biomarker approach to assess effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research* 74 (0):40-46.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552 (1-2):247-268.
- Nicolas J-M (1999) Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology* 45 (2-3):77-90.
- Oikari A, Holmbom B, Ånäs E, Miilunpalo M, Kruzynski G, Castrén M (1985) Ecotoxicological aspects of pulp and paper mill effluents discharged to an inland water system: Distribution in water, and toxicant residues and physiological effects in caged fish (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* 6 (3):219-239.
- Oliveira M, Gravato C, Guilhermino L (2012) Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (teleostei, gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19 (0):206-214.
- Osterauer R, Köhler H-R (2008) Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86 (4):485-494.
- Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M (2012) Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75 (0):187-197.

- Pawert M, Muller E, Triebkorn R (1998) Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue Cell* 30 (6):617-626.
- Peakall D, B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 3:157-160.
- Rault M, Collange B, Mazzia C, Capowiez Y (2008) Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (12):3086-3091.
- Reynaud S, Deschaux P (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77 (2):229-238.
- Rickwood CJ, Galloway TS (2004) Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology* 67 (1):45-56.
- Rocha PS, Luvizotto GL, Kosmehl T, Bottcher M, Storch V, Braunbeck T, Hollert H (2009) Sediment genotoxicity in the Tiete river (Sao Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (7):1842-1848.
- 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 (3):442-448.
- Rodríguez-Fuentes G, Gold-Bouchot G (2000) Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two mexican lagoons. *Marine Environmental Research* 50 (1-5):357-360.
- Sanchez-Hernandez JC, Mazzia C, Capowiez Y, Rault M (2009) Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150 (4):503-511.
- Satoh T, Hosokawa M (1998) The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38:257-288.
- Scheil V, Zürn A, Köhler H-R, Triebkorn R (2010) Embryo development, stress protein (hsp70) responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environmental Toxicology* 25 (1):83-93.
- Schnell S, Martin-Skilton R, Fernandes D, Porte C (2009) The interference of nitro- and polycyclic musks with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp: An *in vitro* study. *Environmental Science & Technology* 43 (24):9458-9464.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68 (2):141-150.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6 (1):75-86.
- Silva AG, Martinez CBR (2007) Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23 (2):185-192.

- Simmons DB, Marlatt VL, Trudeau VL, Sherry JP, Metcalfe CD (2010) Interaction of galaxolide with the human and trout estrogen receptor-alpha. *Science of The Total Environment* 408 (24):6158-6164.
- Tetreault GR, Bennett CJ, Cheng C, Servos MR, McMaster ME (2012) Reproductive and histopathological effects in wild fish inhabiting an effluent-dominated stream, Wascana creek, SK, Canada. *Aquatic Toxicology* 110–111 (0):149-161.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution* 121 (3):307-320.
- Triebskorn R, Adam S, Casper H, Honnen W, Pawert M, Schramm M, Schwaiger J, Köhler H-R (2002) Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11:451-465.
- Triebskorn R, Casper H, Scheil V, Schwaiger J (2007) Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (4):1405-1416.
- Triebskorn R, Telcean I, Casper H, Farkas A, Sandu C, Stan G, Colarescu O, Dori T, Kohler HR (2008) Monitoring pollution in river Mures, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment* 141 (1-3):177-188.
- Vethaak AD, Jol JG, Meijboom A, Eggens ML, Rheinallt T, Wester PW, van de Zande T, Bergman A, Dankers N, Ariese F, Baan RA, Everts JM, Opperhuizen A, Marquenie JM (1996) Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus*) after long-term exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. *Environmental Health Perspectives* 104 (11):1218-1229.
- Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R (2014) Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar river (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13.
- Walker CH (1995) Biochemical biomarkers in ecotoxicology — some recent developments. *Science of The Total Environment* 171 (1–3):189-195.
- Wester PW, van der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwis GCM, Vos JG (2002) Aquatic toxicology: Opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11 (3–4):289-295.
- Wheelock C, Phillips B, Anderson B, Miller J, Miller M, Hammock B (2008) Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (ties). In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, 117-178.
- Wogram J, Sturm A, Segner H, Liess M (2001) Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7):1528-1531.

Wolz J, Engwall M, Maletz S, Olsman 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 Research 15 (7):536-553.

4.9 Appendices

Appendix A: Basic physicochemical features of the caging sites up- and downstream of the Tübingen STP measured in May 2012 (Vincze et al. 2014).

Physicochemical features	Site 1 (downstream)	Site 2 (upstream)
Air temperature (°C)	13.3	15.3
Water temperature (°C)	14.5	15.1
O ₂ (mg/L)	9.7	9.55
O ₂ (%)	99.1	97.3
Conductivity (µS)	924	901
pH	7.74	8.12
Nitrite-N (mg/L)	0.03	0.03
Nitrate-N (mg/L)	5.0	3.4
Ammonium-N (mg/L)	<0.04	<0.04
Chloride (mg/L)	58	51
Ortho-Phosphate-P (mg/L)	0.20	0.16
Overall hardness (°dH)	26	26
Carbonate hardness (°dH)	15	16

Appendix B: Significance levels (*p*-values) of Hsp70 data after comparing the different exposure groups by each organ. Asterisks indicate significant **p* < 0.05 differences.

Compared groups Hsp70 analysis	Gills	Liver	Kidney	Gonads
Control vs. upstream 10 day	< 0.0001*	0.0029*	0.4471	0.0413*
Control vs. upstream 30 day	0.4991	0.0122*	< 0.0001*	0.5214
Control vs. downstream 10 day	< 0.0001*	0.0003*	0.9839	0.9704
Control vs. downstream 30 day	0.0253*	0.0006*	< 0.0001*	0.6131
Upstream 10 d. vs. downstream 10 d.	0.6415	0.9994	0.8360	0.1330
Upstream 30 d. vs. downstream 30 d.	0.6258	0.0026*	0.4367	1.000
Upstream 10 d. vs. upstream 30 d.	0.0022*	0.0693	0.0086*	0.8670
Downstream 10 d. vs. downstream 30 d.	0.0115*	0.0014*	< 0.0001*	0.8792

Appendix C: Significant ($*p < 0.05$) differences between exposure groups in tissue concentration levels of various bioaccumulative organic compounds.

Compared groups	Substance and significant p -value
Upstream 10 d. vs. downstream 10 d.	ANT $p = 0.0375$, BA $p = 0.0034$, CHR $p = 0.0038$, HHCB $p = 0.0001$, AHTN $p = 0.0001$, MTCS $p = 0.0001$
Upstream 30 d. vs. downstream 30 d.	PYR $p = 0.0103$, BA $p = 0.0192$, CHR $p = 0.0151$, HHCB $p = 0.0016$, AHTN $p = 0.0016$, MTCS $p = 0.0016$
Upstream 10 d. vs. upstream 30 d.	NAP $p = 0.0003$, ACY $p = 0.0003$, FL $p = 0.0003$, PHE $p = 0.0003$, ANT $p = 0.0022$, BBF $p = 0.0062$, BAP $p = 0.0014$, HHCB $p = 0.0003$, AHTN $p = 0.0003$, MTCS $p = 0.0003$
Downstream 10 d. vs. downstream 30 d.	NAP $p = 0.0008$, ACE $p = 0.0028$, ACY $p = 0.0008$, FL $p = 0.0008$, PHE $p = 0.0046$, BBF $p = 0.0052$, BAP $p = 0.0205$, GHI $p = 0.0419$, HHCB $p = 0.0019$,

4.10 Abbreviations

ACE-acenaphthene

ACY-acenaphthylene

AChE- acetylcholinesterase

AHTN-tonaide

ANT-anthracene

BA-benz[a]anthracene

BAP-benzo[a]pyrene

BBF-benzo[b]fluoranthene

BKF-benzo[k]fluoranthene

CbE- carboxylesterase

CHR-chrysene

DDE-dichlorodiphenyldichloroethylene

DW-dry weight

FL-fluorene

FLU-fluoranthene

GHI-benzo[ghi]perylene

HHCB-galaxolide

Hsp-heat shock protein

IND-indeno[1,2,3-cd]pyrene

MTCS-methyltriclosan

NAP-naphthalene

NPA-4-nitrophenyl acetate

NPV-4-nitrophenyl valerate

PAH-polycyclic aromatic hydrocarbon

PHE-phenanthrene

PYR-pyrene

STP-sewage treatment plant

Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten

Kapitel 1: Vincze K, Scheil V, Triebskorn R (2011): Kartierung des Neckars im Umkreis von Tübingen. *Als Ergebnisbericht dem Regierungspräsidium Tübingen und dem Kreisfischereiverein Tübingen vorgelegt, August 2011*

Kompletter Eigenanteil an der Strukturkartierung (in der Anwesenheit der Gewässerwarte des Kreisfischereivereins Tübingen), Makrozoobenthosbeprobung, -Bestimmung, Auswertung und Erstellung des Berichtes. Fachliche Betreuung durch Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Rita Triebskorn.

Kapitel 2: Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R (2014): Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13

Versuchsplanung mit Hilfe von Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Rita Triebskorn. Kompletter Eigenanteil an der Bearbeitung der Proben vom Jahr 2011, Auswertung und Erstellung des Manuskripts. Die Proben vom Jahr 2010 wurden zusammen mit der Bachelorkandidatin Katharina Graf bearbeitet. Fachliche Betreuung durch Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Rita Triebskorn.

Kapitel 3: Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R: Charakterisierung des Gesundheitszustandes von residenten Fischen und Wirbellosen mit Hilfe von Biomarkern im Neckar bei Tübingen (Passives Umweltmonitoring). *Unveröffentlichte Daten*

Versuchsplanung mit Hilfe von Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Rita Triebskorn. Die Probenahmen erfolgten in Kooperation mit dem Kreisfischereiverein Tübingen und mit Hilfe der Mitarbeiter der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere, Universität Tübingen. Kompletter Eigenanteil an der Bearbeitung der Proben, Auswertung und Erstellung des Manuskripts. Fachliche Betreuung durch Dr. Volker Scheil, Prof. Dr. Heinz Köhler und Prof. Dr. Rita Triebskorn.

Kapitel 4: Vincze K, Scheil V, Kuch B, Köhler H-R, Triebkorn R (2015): Impact of wastewater on fish health: A case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-18

Versuchsplanung mit Hilfe von Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Rita Triebkorn. Die Probenahmen erfolgten mit Hilfe der Mitarbeiter der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere, Universität Tübingen. Kompletter Eigenanteil an der Durchführung der Biomarkertests, Auswertung und Erstellung des Manuskripts. Die chemischen Analysen wurden im Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart (Arbeitsgruppe von Dr. Bertram Kuch) durchgeführt. Fachliche Betreuung durch Dr. Volker Scheil, Prof. Dr. Heinz Köhler und Prof. Dr. Rita Triebkorn.

Publikationsliste

Originalpublikationen in internationalen Fachzeitschriften

- 2015 Vincze K, Scheil V, Kuch B, Köhler H-R, Triebskorn R (2015): Impact of wastewater on fish health: A case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-18
- 2014 Vincze K, Gehring M, Braunbeck T (2014): (Eco)toxicological effects of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7 -diol (TMDD) in zebrafish (*Danio rerio*) and permanent fish cell cultures. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (13):8233-8241
- 2014 Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R (2014): Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26 (3):1-13
- 2011 Hettyey A, Vincze K, Zsarnóczai S, Hoi H, Laurila A (2011): Costs and benefits of defences induced by predators differing in dangerousness. *Journal of Evolutionary Biology* 24 (5):1007-1019.
- 2010 Hettyey A, Zsarnóczai S, Vincze K, Hoi H, Laurila A (2010): Interactions between the information content of different chemical cues affect induced defences in tadpoles. *Oikos* 119 (11):1814-1822.

Beiträge zu wissenschaftlichen Kongressen und Tagungen

- Mai 2014 Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R: Characterisation of a sewage treatment plant effluent using biomarkers in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) as tools in active monitoring, Jahrestagung von SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe, Basel, Vortrag (auf Englisch)
- Juni 2013 Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebskorn R: Biomarker studies in fish as tools for health assessment of the Neckar river in the Tübingen area, Micropol & Ecohazard 2013, Zürich, Vortrag (auf Englisch)

- Dezember 2012 Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebkorn R: Biomarker studies using fish and invertebrates as tools for health assessment of the Neckar river in the Tübingen area, Meeting of Students in Evolution and Ecology (StEvE), Tübingen, Vortrag (auf Englisch)
- September 2012 Vincze K, Scheil V, Köhler H-R, Triebkorn R: Biomarkerstudien mit Fischen und Invertebraten als Werkzeuge zur Charakterisierung des Gesundheitszustandes des Neckars, Gemeinsame Jahrestagung von SETAC GLB (Society of Environmental Toxicology and Chemistry, German-Language Branch) und der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh (Gesellschaft Deutscher Chemiker), Leipzig, Vortrag (auf Deutsch)
- September 2010 Vincze K, Gehring M, Braunbeck T: Ökotoxikologische Bewertung der Effekte von 2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol (TMDD), Gemeinsame Jahrestagung von SETAC GLB (Society of Environmental Toxicology and Chemistry, German-Language Branch) und der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh (Gesellschaft Deutscher Chemiker), Dessau, Poster, Posterpreis
- Oktober 2008 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Erkennung von Prädatorgefahr und phänotypische Plastizität bei Springfroschlarven (*Rana dalmatina*), Ungarische Amphibienkonferenz, Budapest, Vortrag (auf Ungarisch)
- Januar 2008 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Prädator-induzierte phänotypische Plastizität bei frühen Lebensstadien des Springfrosches (*Rana dalmatina*), Tagung des Ungarischen Biologenvereins, Sektion Zoologie, Budapest, Vortrag (auf Ungarisch)
- Dezember 2007 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Prädator-induzierte phänotypische Plastizität bei frühen Lebensstadien des Springfrosches (*Rana dalmatina*), 10. Ungarische Ethologie Konferenz, Göd, Poster
- November 2007 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Phänotypische Antworten des Springfrosches (*Rana dalmatina*) auf Prädatoranwesenheit in frühen Lebensstadien, 8. Ungarische Verhaltensökologietreffen, Cluj-Napoca, Vortrag (auf Ungarisch)
- November 2007 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Prädator-induzierte phänotypische Plastizität bei frühen Lebensstadien des Springfrosches (*Rana dalmatina*), Studentenkonzferenz, Eötvös Loránd Universität, Budapest, Poster, Posterpreis
- September 2006 Vincze K, Zsarnoczai S, Hettyey A: Der Einfluss von vier Prädatorarten auf Grasfroschlarven (*Rana temporaria*), 7. Ungarische Ökologie Konferenz, Budapest, Poster

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Lehrbereich Physiologische Ökologie der Tiere der Universität Tübingen am Institut für Evolution und Ökologie durchgeführt. Die Promotionsarbeit wurde durch die Carl Zeiss Stiftung und die Stiftung des Landesnaturschutzverbandes Baden-Württemberg finanziert.

Besonders danken möchte ich meinen Betreuern, Prof. Dr. Rita Tribskorn, Dr. Volker Scheil und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler für ihre umfassende Betreuung während der Durchführung meiner Forschungsprojekte und der Erstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Thomas Braunbeck und Prof. Dr. Ewald Müller für ihre Bereitschaft zur Prüfungsabnahme danken.

Für die Sprachkorrektur und Vorschläge zur Dissertation möchte ich mich bei Katharina Peschke bedanken.

Ich danke Simon Schwarz für die Statistik-Beratung.

Ein besonderer Dank geht (in alphabetischer Reihenfolge) an Andrea Demuth, Andreas Dieterich, Katharina Graf, Leonie Hannig, Lisa Hannslik, Anja Henneberg, Stefanie Kraiss, Maddalena di Lellis, Carla Lorenz, Diana Maier, Sandra Maute, Katharina Peschke, Alexandra Scheil, Simon Schwarz, Paul Thellmann, Mara Wolter und alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere für ihre Unterstützung im Labor und während der Freilandprobenahmen.

Ich Bedanke mich bei Dr. Manuel Konrad, Christoph Dapp und Hans-Joachim Vogel vom Regierungspräsidium Tübingen für die wertvollen Ratschläge. Bei den Mitgliedern des Kreisfischereivereins Tübingen, insbesondere bei den Herren Udo Dubniczki, Michael Schneider, Andreas Fritz, Adolf Stradinger und Klaus Brilisauer bedanke ich mich für die Elektrofischung und Unterstützung während der Gewässerkartierung.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie und ganz besonders an meinen Mann, Bálint Nagy.