

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe Jens Peter Konradt

aus: Dinslaken

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Stoffwechselenzyme und ultrastrukturelle Veränderungen in Leber
und Gehirn von Bachforelle und Bachschmerle als Biomarker zur
Erfassung von Umweltschadstoffen

Gutachter: HD Dr. Thomas Braunbeck

Prof. Dr. Werner Herth

Vorwort

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden im Zeitraum 1996 – 2000 am Zoologischen Institut I der Universität Heidelberg durchgeführt. Die Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes“ Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien“ durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich HD. Dr. Thomas Braunbeck für die Möglichkeit unter seiner Betreuung diese Dissertation anfertigen zu können, ganz herzlich danken. Sein Rat, aber auch seine kritischen Anmerkungen machten zu einem ganz wesentlichen Teil diese Arbeit erst möglich.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. Werner Herth für die Übernahme des Korreferats.

Ein ganz großes Dankeschön gilt des weiteren meinen Eltern und meiner Schwester, die mich über all die Jahre des Studium und der Promotion unterstützt und aufgemuntert haben und ohne die ich mit Sicherheit heute nicht da stehen würde, wo ich stehe.

Unendlich dankbar bin ich meiner langjährigen Weggefährtin und Freundin Ute Bieberstein, die mich auch in einer Phase aufgebaut und unterstützt hat, als die Fertigstellung dieser Arbeit “auf des Messers Schneide stand”.

Ein ganz großes Dankeschön gilt des weiteren einer treuen Freundin Monika Kempf für das Korrektur lesen, die Korrekturarbeiten, sowie dafür, dass sie immer da war, wenn es “eng” wurde.

Mein Dank geht jedoch auch an die Arbeitsgruppe, die immer wieder kurzfristig bei Probenahmen einspringen musste und mit wertvolle Tipps und Hilfestellungen das Gelingen der Arbeit unterstützte, namentlich: Dr. T. Zahn, Dr. M. Strmac, Dr. A. Schnurstein, Dipl. Biol. U. Bieberstein, Dipl. Biol. T. Berbner, Dipl. Biol. M. Islinger, Dipl. Biol. S. Knörr, Dipl. Biol. S. Pawlowski, Dipl. Biol. H. Hollert, E. Leist,

Frau Adam für die Hilfestellungen im Umgang mit den Graphikprogrammen und die Fotoarbeiten, sowie

Frau Kempendorf und Frau Mummert für die Tipps und Unterstützung im Bereich der Elektronenmikroskopie.

Dank auch an das Team VALIMAR für die vielen erfolgreichen Probenahmen bei Wind und Wetter.

Vielen Dank auch meinen Freunden für die Aufmunterungen und Unterstützungen in den ganzen Jahren.

..... es ist viel passiert, es hat sich vieles verändert und nichts ist wie es einmal war..... doch auch Dir - Sabine Eggers - möchte ich auf diesem Weg meinen Dank für deine Unterstützung und Aufmunterung beim Gelingen der Arbeit aussprechen.....es hat länger gedauert als geplant, und manch' einer konnte nicht warten, doch jetzt ist es soweit!

Heidelberg, im November 2000

Heidelberg, im November 2000

.....2000, ein Jahr
voller Emotionen
und Entbehrungen.....

Widmung

.....diese Dissertationsarbeit widme
ich meinem Sohn Luca Robin, der in
die heiÙe Phase der Fertigstellung
dieser Arbeit geboren wurde.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Versuchsgewässer.....	10
2.2 Versuchstiere in den <i>In Vivo</i> -Experimenten an Krähenbach und Körsch	13
2.3 Halbfreilanduntersuchungen - das Bypass-System	14
2.4 Regenerationsexperiment nach Bypass-Exposition	16
2.5 Experiment zur Wirkung des 10-fach konzentrierten Körsch-Schadstoffcocktails in Kombination mit Ammoniak auf Bachforellen.....	16
2.6 Laborexposition von Bachforelle und Bachschmerle der biochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen.	17
2.7 Pulsversuch: PAH-Cocktail.....	18
2.8 Versuchsaufbau zur Ethanolcocktail und - PAH-Cocktailexposition mit Bachforelle und Bachschmerle	19
2.9 Biochemische Methoden	20
2.9.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen	20
2.10 Präparation der Organe für biochemische Untersuchungen.	22
2.11 Enzymmessungen	23
2.12 Statistik.....	27
2.13 Elektronenmikroskopie	28
2.14 Embryotoxizität	29
3. Veränderungen in den Aktivitäten von Stoffwechsellenzymen in Fischen unterschiedlich stark belasteter Gewässern nach Halbfreilandexposition zwischen 1995 und 1999.....	33
3.1 Einleitung	33
3.2 Ergebnisse	34
3.3 Diskussion	46
4. Freilandexposition contra Exposition im Bypass-System - Ein Vergleich zweier Systeme.	53
4.1 Einleitung	53
4.2 Ergebnisse	54
4.3 Diskussion	65
5. Exposition von Fischen gegenüber unterschiedlichen Körsch-Cocktailkonzentrationen....	68
5.1 Einleitung	68
5.2 Ergebnisse	68
5.3 Diskussion	73
6. Schadstoffbelastung von Bachforellen bei steigenden Ammoniakkonzentrationen.....	77
6.1 Einleitung	77
6.2 Ergebnisse	78
6.3 Diskussion	82
7. Regenerationsversuche nach Freilandexposition von Fischen: Bachforelle - <i>In vivo</i>	88
7.1 Einleitung	88
7.2 Ergebnisse	89
7.3 Diskussion	92
8. Biochemische und ultrastrukturelle Reaktionen in der Leber von Bachforelle und Bachschmerle nach einem Expositionspuls nach 2-wöchiger Grundbelastung gegenüber einem ausgewählten Schadstoffcocktail	93
8.1 Biochemische Reaktionen	93
8.2 Ultrastrukturelle Veränderungen	109
9. Embryotoxizität	138

9.1 Einführung.....	138
9.2 Ergebnisse	138
9.3 Diskussion	147
10. Zusammenführung.....	151
11. Zusammenfassung	158
12. Publikationen und Tagungsbeiträge.....	159
13. Abkürzungsverzeichnis.....	160
14. Literatur	161
15. Anhang.....	175

1. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Validierung von biochemischen Parametern als Biomarker zur Erfassung der Wirkung von Umweltchemikalien aus Fließgewässern in ausgewählten Monitororganen von Fischen.

Umweltschadstoffe (Xenobiotica)

Viele Chemikalien können im aquatischen Bereich in mehr oder minder geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei etliche von ihnen bereits in sehr geringen Konzentrationen in der Umwelt eine biologische Wirkung entfalten. Einige Chemikalien stellen Strukturanaloga zu körpereigenen Stoffen dar und können so in Konkurrenz zu diesen treten, oft mit fatalen Folgen für die betroffenen Organismen. Einst zielgerichtet produziert zum Nutzen von uns Menschen, werden viele Stoffe und Chemikalien zu Umweltschadstoffen und zu einem Problem, dem wir uns nicht verschließen können: Als Beispiel seien die Pseudoöstrogene genannt, Stoffe mit einer östrogenähnlichen Hormonwirkung. Als Weichmacher in der Kunststoffindustrie (Alkylphenole) (Jobling and Sumpter, 1993; White *et al.*, 1994) oder als Pflanzenschutzmittel (DDT) (Sumpter *et al.*, 1995) verwendet, entfalten sie selbst oder ihre Metabolite in der Umwelt eine ähnliche, jedoch ungerichtete und unkontrollierte östrogene Wirkung bei aquatischen Organismen. Mögliche Effekte reichen von der Verweiblichung von Populationen in Form der Ausbildung von Mischgonaden bis hin zur Rückbildung von Hodengewebe bei männlichen Tieren (George, 1995; Jobling and Sumpter, 1996).

Stoffklassen wie die PAHs (polyaromatischen Kohlenwasserstoffe) oder die PCBs (polychlorierten Biphenyle) zeigen z. T. nicht nur östrogene Wirkung (Sumpter *et al.*, 1995) sondern sind darüber hinaus vielfach wichtige Carcinogene, Lebergifte, Promotoren (Giulio *et al.*, 1993; Köhler, 1990; Marlins *et al.*, 1984; McCain *et al.*, 1977; Stein *et al.*, 1990) oder Genotoxine (Friedberg *et al.*, 1995; Maccubin, 1994).

Eintrag von Umweltschadstoffen

Haupteintragsquellen stellen neben industriellen Abwässern kommunale Abwässer oder Oberflächenabflüsse aus der Landwirtschaft (run-off) dar. Einmal in der Umwelt, scheinen für viele Xenobiotica Verbreitungsgrenzen nicht existent. Sofern sie nicht direkt wasserlöslich sind, werden Umweltchemikalien vielfach an Schwebstoffe und organische Partikel gebunden, die eine ubiquäre Verbreitung ermöglichen. Nach Hochrechnungen von Kelly *et al.*, 1991 werden beispielsweise etwa 8,74 t pro Jahr PAHs alleine über die Atmosphäre in den Eriesee eingetragen, hinzu kommen weitere 41 t durch den Fluß Detroit.

Auch wenn Xenobiotica häufig in Konzentrationen vorgefunden werden, die *per se* noch keine biologischen Effekte erwarten lassen, besteht für Toxikologen doch Anlass zur Sorge: Der Grund liegt in der Bioakkumulation und der Biomagnifikation der Umweltgifte. Aufgrund ihrer meist lipophilen Eigenschaft reichern sich Schadstoffe im körpereigenem Lipid der Organismen an. Bleibt dabei die Biodegradation der Schadstoffe, d.h. die Metabolisierung mit Abbau- und Ausscheidungsrate gegenüber der Akkumulationsrate in den Organismen zurück,

kommt es zu einer Aufkonzentrierung der Chemikalien. Schadstoffe wie die PAHs, die leicht metabolisiert werden, scheinen in höchsten Gewebekonzentrationen überwiegend am Anfang der Nahrungskette, d.h. vor allem bei Invertebraten vorzuliegen, bei denen die Aufnahme und Elimination nicht wie bei den Endgliedern der Nahrungskette in einem ausgeglichenen Verhältnis vorliegen (Livingstone *et al.*, 1994). Dagegen reichern sich schwer metabolisierbare Substanzen wie zahlreiche PCBs entlang der Nahrungskette an und erreichen höchste Konzentrationen in den Endgliedern (Livingstone *et al.*, 1994; Nunn *et al.*, 1995).

Toxizitätsprüfung von Chemikalien

Nach den Einträgen des "Chemical Abstract Service" waren 1992 über 11 Mio. chemische Verbindungen beschrieben, wobei die jährliche Zuwachsrate etwa 400.000 betrug. Allein in der EU sind schätzungsweise 65.000 - 100.000 Substanzen im Handel; ca. 30.000 werden in der BRD produziert, davon 5000 Verbindungen mit mehr als 10 t pro Jahr (Streit, 1992), die in unterschiedlichen Ausmaß freigesetzt werden. Schritte, diese Entwicklung zumindest zu überwachen, war die Verabschiedung des Chemikaliengesetzes der Bundesrepublik Deutschland 1982 sowie des Pflanzenschutzmittel-Gesetzes im Jahr 1998 (Bach *et al.*, 1999). Inzwischen besteht das Bestreben, Gesetze zur Überwachung von Chemikalien innerhalb der EU zu harmonisieren (Ahlers and Diderich, 1998; Peter and Heger, 1999; Fuhrmann, 2000).

In Abhängigkeit von der produzierten bzw. importierten Menge unterliegen ab 1982 auf den Markt gebrachte Chemikalien der Prüfung und Einschätzung ihres toxikologischen Gefährdungspotentials auf die Umwelt, wobei Organismen unterschiedlicher trophischer Ebenen wie Bakterien, Algen, Wasserflöhe und Fische herangezogen werden müssen (Rudolph and Boje, 1986). In Stufe I (bis zu einer Produktion von < 1 t/Jahr) müssen Kurzzeit-Toxizitätstest durchgeführt werden. Ermittelt wird bei einer Dauer von 48 - 96 h die Konzentration, in der die Hälfte der eingesetzten Testtiere stirbt (LC₅₀-Test). Bei Produktionsraten von < 100 t/Jahr sind Langzeittest u.a. mit Fischen vorgeschrieben. Hier werden die Konzentrationen ermittelt, bei denen gerade kein Effekt mehr zu beobachten ist (NOEC, No Observed Effect Concentration). In Stufe II bei Produktionsraten > 1000 t/Jahr werden in Langzeitversuchen zusätzlich auch Auswirkungen auf die F1 und F2-Generation sowie die Reproduktionsrate untersucht (Peter and Heger, 1999).

Aus ökotoxikologischer Sicht sind derartig erhobene Daten nur z.T. befriedigend, da umweltrelevante Konzentrationen meist sehr viel niedriger anzusetzen sind, und eine Extrapolation akuter Daten auf chronisch subletale Werte eine große Streuung aufweist (Peter and Heger, 1999). Zudem trifft man im Freiland in der Regel auf eine Kombination mehrerer Schadstoffe, die zu antagonistischen- bzw. synergetischen Effekten führen können (Arnold, 1995). Darüber hinaus sind die erarbeiteten Daten substanz- und oft speziesspezifisch (Braunbeck *et al.*, 1990c), so dass im Zweifelsfall für andere in Frage kommenden Substanzen keine anwendungsfähigen Daten existieren. Des Weiteren betrifft die Kenntnis der potentiell toxischen Wirkungen nur die Chemikalien, die nach der Einführung des Chemikaliengesetzes auf den

Markt kamen. Das Wissen zu früher kommerzialisierten Chemikalien (vor dem Stichtag) ist dagegen meist gering (Peter and Heger, 1999).

Freilanduntersuchungen

Ein weiteres Problem der Ökotoxikologie sind umweltstabile Chemikalien, deren Vertrieb oder Produktion bereits eingestellt wurde, die jedoch in der Umwelt kaum abgebaut werden und daher oft eine sehr lange Halbwertszeit besitzen. Um die Komplexität und das Gefährdungspotential der Altlasten, aber auch neu hinzugekommener Chemikalien in umweltrelevanten Konzentrationen aufzudecken, rückte in den letzten 10 Jahren das Freiland verstärkt ins Zentrum nationaler und internationaler Untersuchungsprojekte, in deren Folge eine Fülle neuer Testmethoden zur Erfassung der ökotoxikologischen Wirkung von Xenobiotica entwickelt wurde (Braunbeck *et al.*, 1990; Braunbeck, 1995; DiGiulio *et al.*, 1993; Goksøyr *et al.*, 1987; Goksøyr *et al.*, 1994; Nott *et al.*, 1987; Oost *et al.*, 1997; Vigano *et al.*, 1994).

Biomarker

Zur Aufklärung chemikalienbedingter Schäden in Organismen wurde in den 80er Jahren in den USA das Konzept des Biomarkers entwickelt (Gestel and Brummelen *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1990; Peakall *et al.*, 1992). Als Biomarker werden Parameter definiert, die sich besonders als biologische Kenngrößen für die Belastung von Organismen durch Umweltchemikalien eignen (Braunbeck, 1995). Nach McCarty und Shugart 1990 eignen sich prinzipiell alle Strukturen und Funktionen lebender Systeme als Biomarker, sofern sie nur messbar sind, ursächlich mit dem Schadstoff zusammenhängen und durch Veränderungen auf der Ebene von Molekülen, Organellen, Zellen, Organismen, Individuen, Populationen und Ökosystemen die vorausgegangenen Expositionen anzeigen. Zur Indikation von toxischen Noxen sollten multidisziplinäre Biomarker zum Einsatz kommen (Helma *et al.*, 1994), um neben der unterschiedlichen Sensitivität bisweilen auch die Spezifität von Markern für bestimmte Belastungsarten ausnutzen zu können. Als Beispiel sei die Acetylcholinesterase, ein sensibler und spezifischer Marker für die Pestizidbelastung mit Carbamaten und Organophosphaten genannt (Bocquené *et al.*, 1995). Gegenüber der chemischen Analytik haben Biomarker den Vorteil, dass sie über die Zeit selbst geringe Konzentrationen von Schadstoffen integrieren, die am Rande oder unter der chemischen Nachweisgrenze liegen und gleichzeitig eine biologische Wirkung verknüpfen, so dass sich parallel, ergänzend oder ersetzend zur kostenintensiven chemischen Analyse verschiedene biologische Endpunkte erfassen und bewerten lassen.

Integration und Ziele der vorliegenden Studie

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Studie war es, ausgewählte Stoffwechsellzyme aus der Leber und dem Gehirn einheimischer Fischarten als Biomarker zur Erfassung von Umweltchemikalien zu etablieren und validieren. Die Untersuchungen waren integraler Bestandteil des vom BMBF geförderten Kooperationsprojektes "Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien" (VALIMAR). Aus einer Fülle multi-

1. Einleitung

disziplinärer Untersuchungsmethoden sollte ein Test-Set entwickelt werden, das unter ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten eine Erfassung und Einschätzung des toxikologischen Gefährdungspotentials von Umweltschadstoffen auf Organismen bis hin zur ökosystemaren Ebene gestattet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedlich stark belastete Modellgewässer (Krähenbach/Körsch) im Großraum Stuttgart auf ihr ökologisches Schädigungspotential charakterisiert. In einer ersten Phase wurden unter Halbfreilandbedingungen in Bypass-Systemen (vgl. Kap. 2) die einheimischen Fischarten Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) in unterschiedlichen Zeitintervallen exponiert und Veränderungen in 13 ausgewählten Stoffwechsellenzymen der Leber und des Gehirns erfasst. In einer zweiten Phase wurden parallel zu den Halbfreilandexpositionen Bachforellen und Bachschmerlen durch Elektrofischung dem Freiland entnommen und Veränderungen in den Stoffwechsellenzymen in Beziehung zu Markerantworten des Halbfreilands gesetzt.

In ergänzenden Laborstudien wurde das Regenerationsverhalten der Stoffwechsellenzyme sowie synergistische Effekte zwischen Schadstoffen beleuchtet. An ausgewählten Schadstoffcocktails aus Inhaltsstoffen und Konzentrationen der stärker belasteten Körsch wurde das Induktions- und zeitliche Integrationsverhalten der Stoffwechsellenzyme nach chronisch subletaler Belastung untersucht und in Relation zu ultrastrukturellen Befunden sowie zu teratogenen Untersuchungen an frühembryonalen Stadien des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio*) gesetzt.

Im Detail sollten in den Untersuchungen folgende Fragen behandelt werden:

- Können die Stoffwechsellenzyme zur Differenzierung komplex belasteter Gewässer herangezogen werden?
- Können Schlussfolgerungen aus Ergebnissen der Stoffwechsellenzyme mit Befunden anderer Biomarker korreliert werden?
- Können die Stoffwechsellenzyme unter Halbfreilandbedingungen die tatsächliche Belastung im Freiland wiedergeben, d.h. inwieweit stimmen Halbfreiland- und Freilanduntersuchungen überein?
- Inwieweit spielen Art- und Habitatszugehörigkeit bei der Sensitivität der Biomarker bei beiden Fischarten eine Rolle?
- Lassen sich Effekte allein auf die Schadstoffbelastung der Tiere zurückführen?
- Können die ausgewählten Biomarker nach chronischer Belastung im Halbfreiland mit komplexen Schadstoffgemischen regenerieren?
- Gibt es Antagonie- bzw. Synergieeffekte zwischen den Schadstoffen und dem Ammoniak / Ammoniumeintrag aus mehreren Kläranlagen?
- In welchem Zeitfenster integrieren und indizieren die Biomarker Belastungsspitzen der Gewässer?
- Lassen sich die Befunde der Stoffwechsellenzyme mit ultrastrukturellen Veränderungen korrelieren?

1. Einleitung

- Wie sensitiv sind die Antworten der Stoffwechselenzyme im Vergleich zu anderen biologischen Endpunkten wie Parametern aus Teratogenitätstests mit dem Zebrafisch?

Die Variabilität von biologischen Systemen spiegelt sich bereits auf zellulärer Ebene wider. Unabhängig von der Spezies stimmen viele Zellen in ihrer Grundorganisation überein und sind somit für vergleichende Untersuchungen schadstoffbedingter Veränderungen hervorragend geeignet. Im Zentrum der vorliegenden Untersuchungen stand die Leber. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der inneren Homöostase, d. h. der physiologischen Stabilität des Stoffwechsels eines Organismus (Chambers and Yarbrough, 1976; Arias *et al.*, 1988; Gingerich, 1982; Personen *et al.*, 1987, Hinton, 1994). Auf Umweltveränderungen reagiert sie mit einer Anpassung zellulärer Prozesse, die sich in der Struktur der Zellkomponenten und der Enzymatik verschiedener Stoffwechselwege manifestieren kann.

Insgesamt wurden 12 verschiedene Leit- und Stoffwechselenzyme in der Leber untersucht. Als strukturelles Korrelat zu Befunden der Cocktailexpositionen wurden zusätzlich ultrastrukturelle Befunde herangezogen. Darüber hinaus wurde im Gehirn der Versuchstiere die Aktivität der Acetylcholinesterase bestimmt, die als Marker für die Kontamination von Carbamaten und Organophosphaten angesehen wird (Bocquené *et al.*, 1995). Abb. 1.1 gibt eine Übersicht über die Stoffwechselenzyme in den einzelnen Leberkompartimenten.

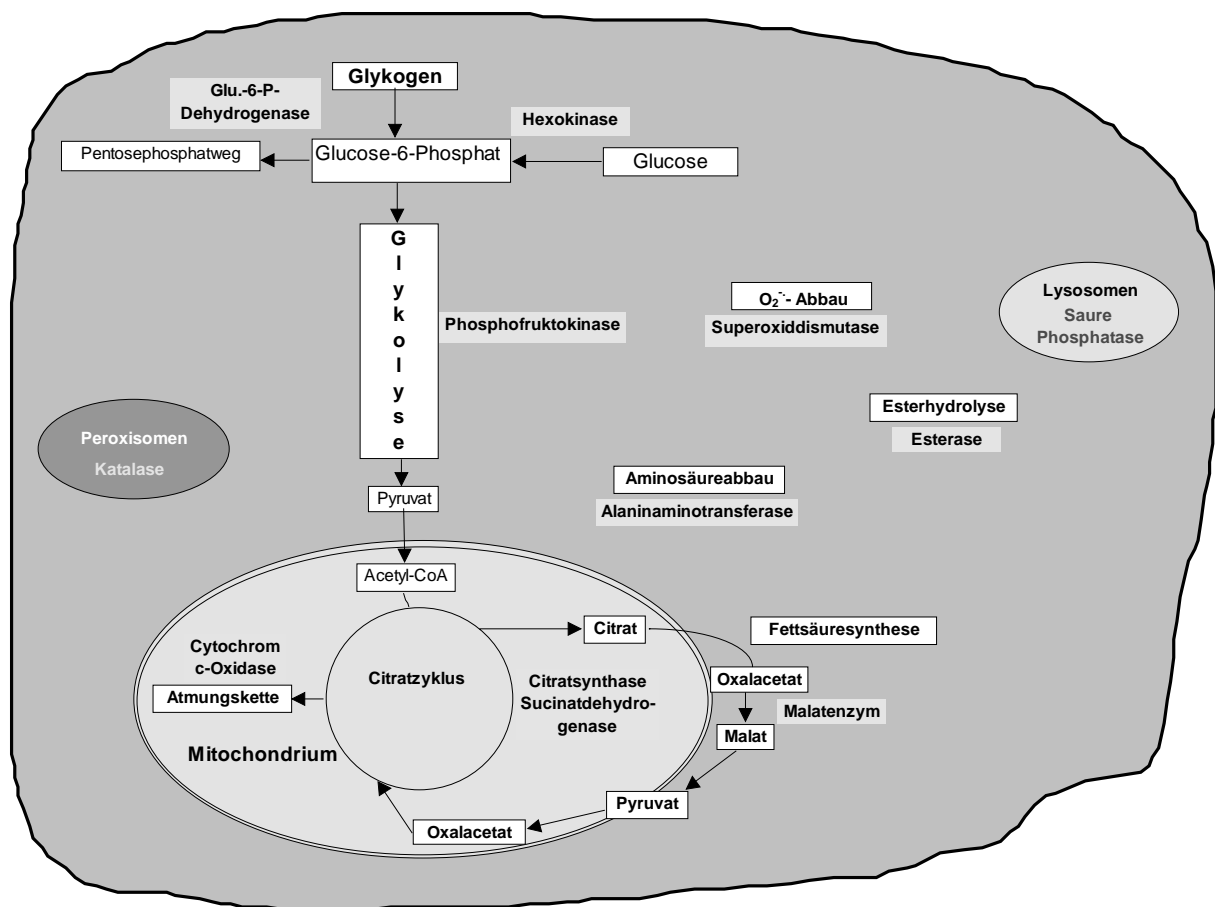


Abb. 1.1 Übersicht der ausgewählten Stoffwechselenzyme in den Stoffwechselwegen sowie den Zellkompartimenten der Leberzelle.

1. Einleitung

Zellen stellen, für sich genommen, die kleinsten lebenden Einheiten dar, die trotz ihrer Heterogenität in den Organsystemen und ihrer Aufgaben in grundlegenden Eigenschaften übereinstimmen. Von daher sollten vergleichende Untersuchungen zu zellulären Veränderungen als Biomarker geeignet sein. Der Angriffspunkt von Chemikalien liegt auf der Ebene von Molekülen (Hinton, 1994; Braunbeck, 1995; Segner and Braunbeck, 1998). Sie ist der Startpunkt für Veränderungen, die sich entlang einer Kettenreaktion schließlich in Effekten auf Populations- und Ökosystemebene manifestieren können. Regulierende und modifizierende zelluläre Prozesse entscheiden dabei, ob Interaktionen mit einer toxischen Chemikalie schließlich auf höheren Ebenen biologischer Integration enden (Segner and Braunbeck, 1998).

Von daher sollten im Rahmen dieser Arbeit erfasste Veränderungen in den Leitenzymen verschiedener Stoffwechselwege, aber auch ultrastruktureller Marker, Aufschluss über den Wirkungsort bzw. über zelluläre Kompensationsantworten auf chemische Stressoren geben können.

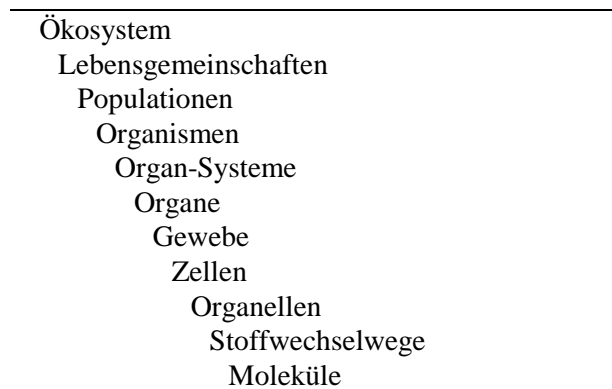


Abb.1.2 Ebenen biologischer Organisation (nach Hinton,1994)

Embryotoxizitätstests

Um einen Vergleich mit der Sensitivität anderer Marker mit hoher ökologischer Relevanz zu erhalten, wurden Zebrafische in Early Life Stage-Tests und Embryonalvaltests in vergleichbaren Konzentrationen des ausgewählten Schadstoffcocktails (9 PAHs und 3 Pestizide) auf mögliche teratogene (keimschädigende) Effekte untersucht. Da es sich bei der Embryonalvalphase um einen sehr sensitiven Lebensabschnitt handelt (McKim, 1977; McKim, 1985; Kristensen, 1994;), sollte sich im Early Life Stage-Test (ELS) und Embryonalvaltest besonders die Wirkung umweltrelevanter Schadstoffkonzentrationen nachweisen lassen. Durch den Einsatz von ELS-Tests lassen sich Rückschlüsse auf die Wirkung von Umweltproben auf den Gesamtorganismus ziehen. Darüber hinaus stellt der ELS-Test ein Testsystem dar, welches eine hohe Übertragbarkeit der Befunde auf Freilandorganismen erwarten lässt.

Untersuchungsgewässer

Im Rahmen des Kooperationsprojektes VALIMAR wurden zur Validierung der Biomarker mit Krähenbach und Körsch zwei sehr heterogen und diskontinuierlich belastete Gewässer

1. Einleitung

ausgewählt (vgl. Kap. 2). Beide Gewässer zeichneten sich im Wasserkörper durch eine subletale Belastung an Schwermetallen, Pestiziden und PAHs aus (Abb. 1,2-1.5). Im deutlich höher kontaminierten Sediment kamen des weiteren PCBs hinzu (Abb. 1.4) (Honnen *et al.*, 1996; Honnen *et al.*, 1997b; Honnen *et al.*, 1998).

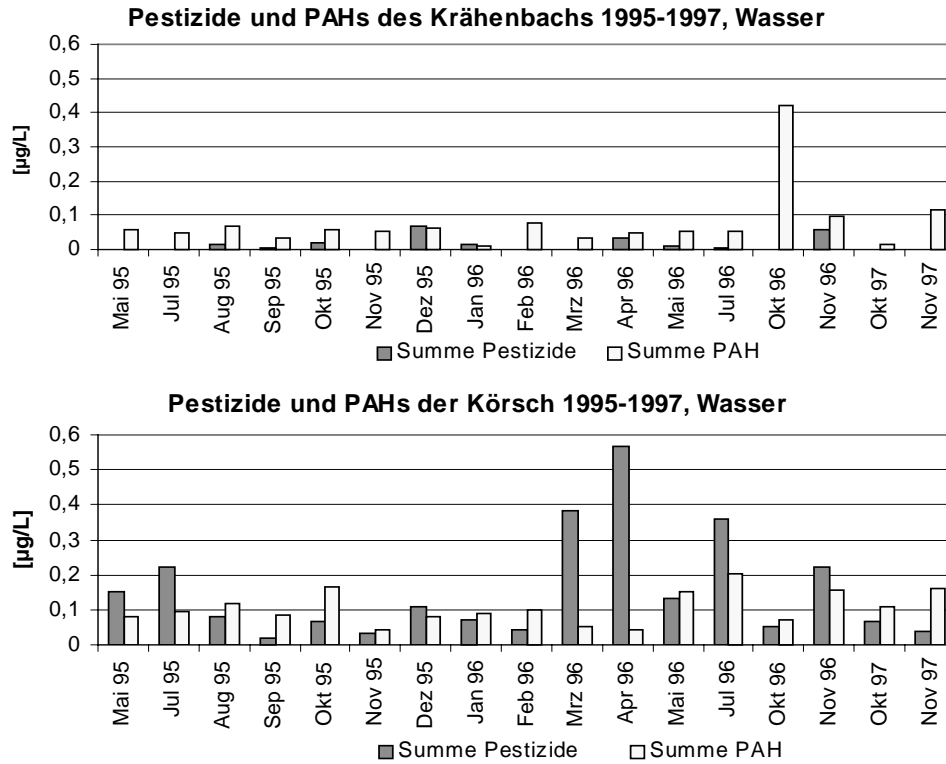


Abb.1.2 PAH- und Pestizidbelastung im Wasserkörper von Krähenbach und Körsch. (Daten von Honnen *et al.* 1996-98).

1. Einleitung

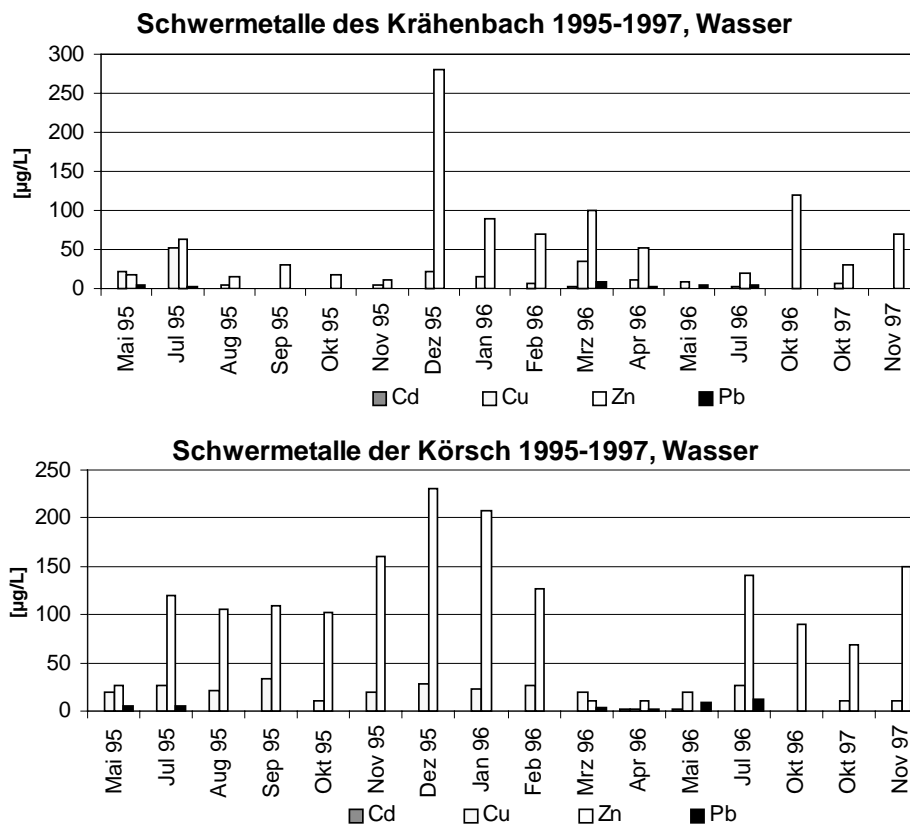


Abb. 1.3 Schwermetallbelastung im Wasserkörper von Krähenbach und Körsch. (Daten von Honnen et al. 1996-98).

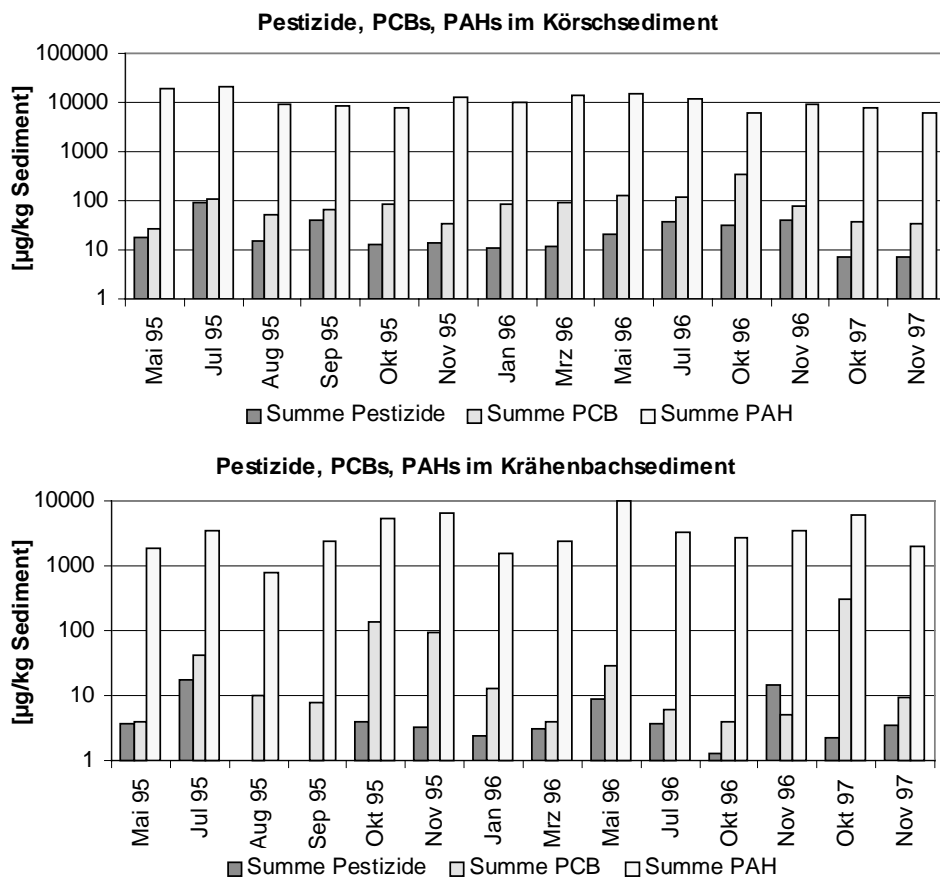


Abb. 1.4 PAH-, PCB- und Pestizidbelastung im Sediment von Krähenbach und Körsch (Daten von Honnen et al. 1996-98).

1. Einleitung

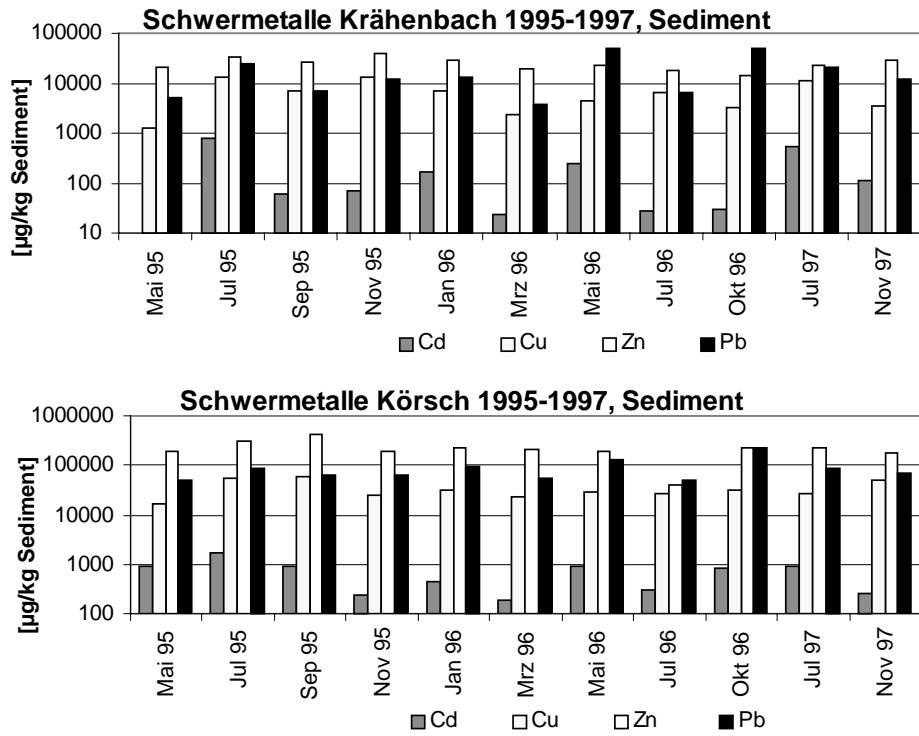


Abb. 1.5 Schwermetallbelastung im Sediment von Krähenbach und Körsch (Daten von Honnen et al. 1996-98).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsgewässer

Als Untersuchungsgewässer wurden mit Aich und Körsch zwei strukturell ähnliche, kleine Fließgewässer im Großraum Stuttgart ausgewählt (Abb. 2.1.1), die entlang ihrer Mittel- und Unterläufe eine z.T. erhebliche, jedoch unterschiedliche Belastung durch PAHs, PCBs, Pflanzenschutzmittel und Schwermetalle infolge dichter Besiedlung, Industrie, Verkehr (Flughafen Stuttgart) und Landwirtschaft aufweisen. Als Vergleichsstandort zu dem an der stärker belasteten Körsch gelegenen Probenahmestandort Körsch A wurde ein kleiner Zufluss am Oberlauf der Aich gewählt, der Krähenbach.

Körsch. Die Körsch erreicht eine Länge von 25 km, bevor sie bei Deizisau in den Neckar mündet (Abb. 2.1.1). Mit weiteren 95 km Wasserstrecke an Zuflüssen beträgt das Wassereinzugsgebiet rund 125 km², das die gesamte Filderebene des Großraums Stuttgarts einschließt. Die Filderebene weist eine dichte Besiedlung mit intensiver Landwirtschaft und lokaler Industrie auf. Dies spiegelt sich in der relativ hohen Zahl an Kläranlagen entlang der Körsch wider, die eine potentielle Kapazität von über 330.000 Einwohnerequivalenten (ATV-Landesgruppe, 1994) aufweisen. Für die Körsch bedeutet dies, dass sie bei einer jährlichen Gesamtwasserfracht von 57 Mio. m³ durch etwa 20,4 Mio. m³ geklärter Abwässer belastet wird, dies sind rund 35,8 % der Gesamtwasserfracht (Triebskorn *et al.*, 1996b). In Trockenphasen können die Kläranlagenausläufe jedoch bis über 80 % des Bachwassers erreichen.

Entlang des Flussoberlaufes sind darüber hinaus etwa 40 Regenüberlaufbecken und Regenüberläufe zu zählen, die als Auffangbecken von Wasserstößen bei Starkregen zwar die Zuflüsse der Klärwerke entlasten, die Körsch jedoch zusätzlich belasten (Triebskorn *et al.*, 1996b).

Im Durchschnitt weist die Körsch (Abb. 2.1.1) eine Wassertiefe von 0,5 m auf und erreicht mit 8 m ihre Maximalbreite, meist ist sie jedoch nur 3-5 m breit. In langsam strömenden Abschnitten kommt es zu Schlamm- und Sandablagerungen, stellenweise wurde der Gewässergrund der teilweise noch mäandrierenden Körsch künstlich befestigt. Die Basis der Filderebene stellt eine Kalk-Sandsteinplatte (Relikt des Liasmeeres) dar (Frank, 1960). Bedingt durch die Geologie des Untergrundes und den im Wasser gelösten Kalk ist das Wasser der Körsch als „hart“ einzustufen (Triebskorn *et al.*, 1996b).

Die Körsch wurde in der Gütekarte der Fließgewässer Baden-Württemberg (Ministerium für Umwelt, 1992) mit Güteklasse III (stark verschmutzt) eingestuft, der dann in sie einmündende Sulzbach gar mit Güteklasse III - IV (sehr stark verschmutzt).

Die Probenahmenstellen der Halfreilandexperimente befanden sich an dem mit Körsch A gekennzeichneten Gewässerunterlauf unterhalb der Mündung des Sulzbaches (Abb. 2.1.1). Für die Freilanduntersuchungen wurde als interne Referenz der mit Körsch E bezeichnete Bachoberlauf in die Untersuchungen einbezogen (Abb. 2.1.1).

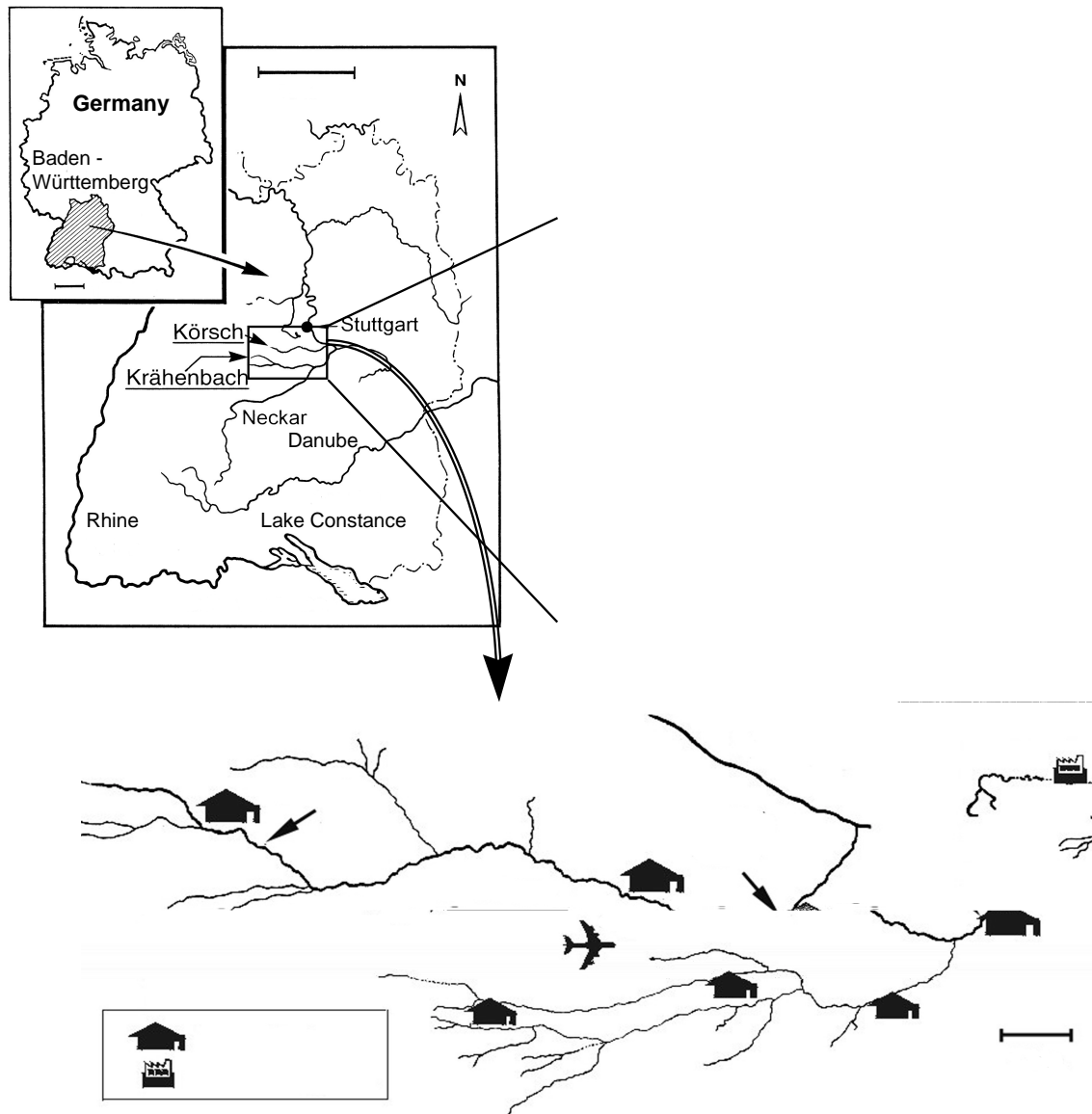


Abb. 2.1.1 Die Untersuchungsgewässer Aich/Krähenbach und Körsch im Großraum Stuttgart.

Krähenbach/Aich. Der stark mäandrierte Krähenbach (Abb. 2.1.2) ist in seiner Natürlichkeit weitgehend erhalten geblieben. Sein knapp 10 km² großes Wassereinzugsgebiet liegt in einer schwach besiedelten Landschaft, die von Waldbeständen und wenig landwirtschaftlich genutzten Flächen (Streuobstwiesen, Acker- u. Grünland) dominiert wird. Kläranlagen sind entlang seiner Wegstrecke nicht zu finden, jedoch zwei Regenüberlaufbecken.

Bei einer Breite von 2-3 m weist er eine Tiefe von meist weniger als 1 m auf. Der Bachgrund besteht aus Kies mit größeren Steinen, Sand und Grobschluff. Die ständige Erosion an Sandstein und Muschelkalk macht den Krähenbach zu einem schwach basischen Carbonatgewässer, dessen Wasser als „hart“ einzustufen ist (Triebskorn *et al.*, 1996b). In der Gütekarte der Fließgewässer in Baden Württemberg ist der Krähenbach nicht erfasst, jedoch weisen projektinterne Untersuchungen auf eine Einstufung zwischen II und III hin.



Abb. 2.1.2 Die Körsch am Bypass-Standort



Abb. 2.1.3 Der Krähenbach am Bypass-Standort

Die Beprobungsstellen für die Halbfreilanduntersuchungen (Bypass) befanden sich im Unterlauf des Krähenbaches, bevor dieser in die Aich einmündet (Abb. 2.1.1). Die Freilanduntersuchungen wurden im Bereich des Bypass-Standortes durchgeführt; als Referenz wurde zusätzlich jedoch der als Aich C beschriebene Gewässerabschnitt (Abb. 2.1.2) in die Untersuchungen mit aufgenommen.

2.2 Versuchstiere in den *In Vivo*-Experimenten an Krähenbach und Körsch

Als Versuchstiere für die Untersuchungen wurden die beiden einheimischen Fischarten Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) ausgewählt. Beide Fischarten bewohnen den Wasserkörper in unterschiedlichen Habitaten und kommen a priori in beiden Gewässern vor.

Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*). Die räuberisch lebende Bachforelle (Abb. 2.2.1) aus der Familie der Salmoniden (Lachsfische) ist ein Bewohner klarer sauerstoffreicher Fließgewässer der Forellenregion (Gebhardt und Ness, 1990). Dort bewohnt sie standorttreu Vertiefungen und Ausspülungen des Bachbettes (Gumpen und Kolke), unterspülte Ufer oder Hindernisse, die ihr Schutz und Deckung geben. Ihre Nahrung setzt sich - stark von ihrer eigenen Größe abhängig - aus Insektenlarven bis Kleinfischen (z. B. Elritzen, Gründlingen) zusammen. Als Winterlaicher fällt ihre Fortpflanzungszeit in die Monate Oktober - Januar. Sie erreicht eine Länge bis zu 60 cm, meist beträgt diese jedoch etwa 20 - 25 cm. Als Vertreter des freien Wasserkörpers ist eine Belastung vor allem über das Wasser und schwebstoffgebundenen Kontaminationen zu erwarten.

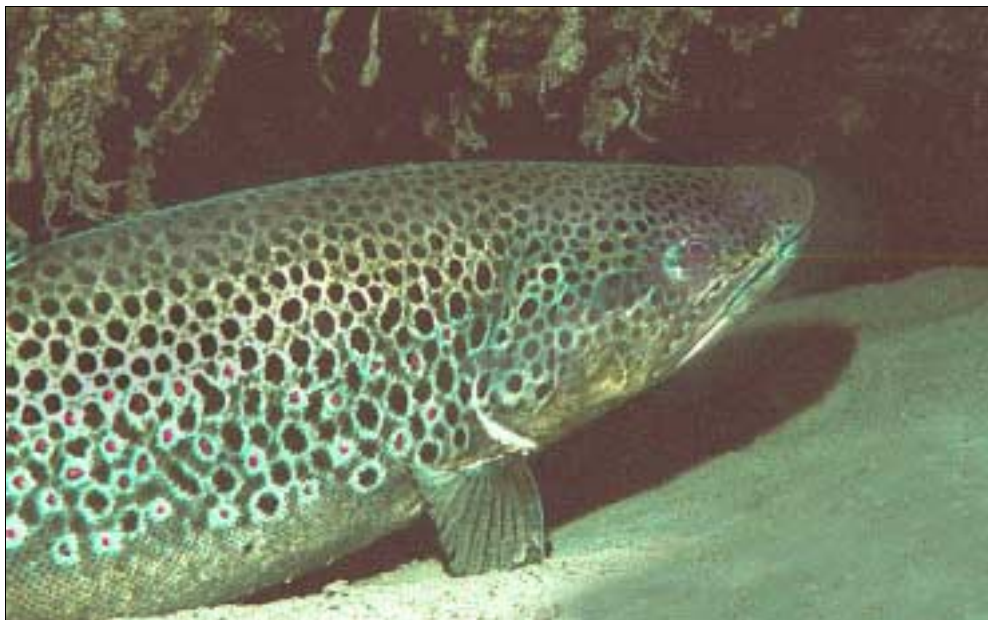


Abb. 2.2.1 Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*)

Bachschmerle (*Barbatula barbatula*). Die Bachschmerle (Abb. 2.2.2) aus der Familie der Cobitidae (Schmerlen) ist ein stationärer Bodenfisch der Forellen- bis Barbenregion (Gebhardt and Ness, 1990). Sie lebt unter Steinen oder zwischen Pflanzen versteckt und macht sich mit einsetzender Dämmerung auf die Nahrungssuche nach Wirbellosen und Fischlaich. Ihre Laichzeit fällt in die Monate März bis Mai. Sie erreicht eine Länge von etwa 8 - 12 cm, maximal 16 cm. Als benthosnaher Bodenfisch ist die Bachschmerle verstärkt Sedimentkontaminationen ausgesetzt.



Abb. 2.2.2 Bachschmerle (*Barbatula barbatula*)

Herkunft der Versuchstiere. Die in den Halbfreilanduntersuchungen eingesetzten juvenilen Bachforellen wurden von einer lokalen Forellenzucht in Haigerloch-Gruol bezogen. Dagegen wurden die von 1995 -1996 eingesetzten Bachschmerlen (4-6 cm Körperlänge) durch Elektrobleifischung dem Butzbach kurz vor dessen Mündung in die Fils bei Uhingen bzw. der Eyach entnommen. Vor Einsatz in die Halbfreilandanlagen wurden die Bachschmerlen für 4 Wochen unter Laborbedingungen an die Aquarienhaltung und künstliche Fütterungen adaptiert. Bachschmerlen der Bypassuntersuchungen zwischen 1997 bis 1999 wurden von einer Fischzucht in Unterrieden (Oberallgäu) bezogen.

Futter und Futtermenge. Die Bachforellen wurden mit ALMA Brutfutter 2 (Botzenhard GmbH, Kempten; 2% des Körpergewicht/Tag), die Bachschmerlen mit Novofect Zierfisch-Futtertabletten (JBL, Neuhofen; 2% des Körpergewicht/Tag) und 1x wöchentlich Chironomidenlarven *ad libitum* (Tribskorn *et al.*, 1996b) über Futterautomaten gefüttert.

2.3 Halbfreilanduntersuchungen - das Bypass-System

Die Biomarkeruntersuchungen an den Modellgewässern Krähenbach und Körsch wurden in Halbfreiland- oder sogenannten Bypass-Systemen durchgeführt (Abb. 2.3.1). An jedem Gewässerstandort wurden über eine Tauchpumpe (Typ: KP 250 M1, Grundfos, Weimar) fünf 250 L Aquarien kontinuierlich mit 1000 L/Std. gefördertem Bachwasser durchflossen, das nach der Passage der Aquarien wieder in die Gewässer zurückgeleitet wurde. Durch eingebrachte Feinsedimente und Steine wurde der natürliche Untergrund der Modellgewässer nach-

gestellt, wobei Grobschlamm einmal wöchentlich entfernt wurde. Über Strömungspumpen wurde eine den Fließgewässern vergleichbare durchschnittliche Strömung (23 cm/s) simuliert.

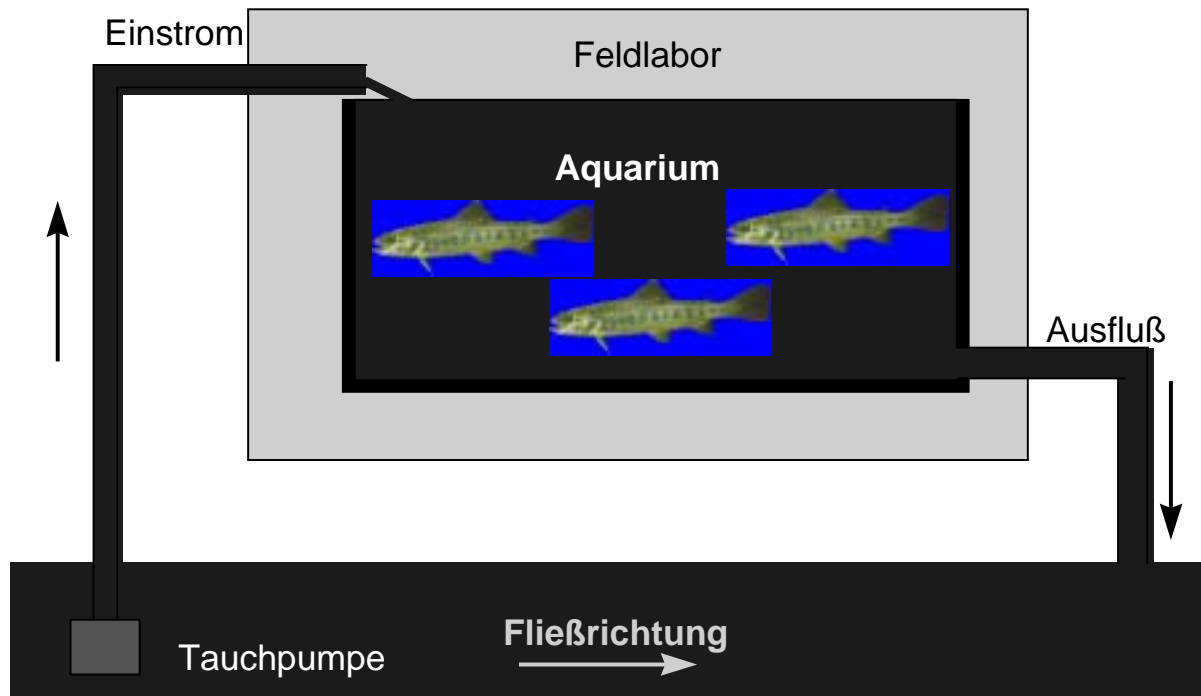


Abb. 2.3.1 Das Bypass-System

Laborkontrollen zur Bypass-Exposition. Zeitgleich zu den Untersuchungen im Freiland wurden Versuchstiere im Labor unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Über Zeitschaltuhren wurden die Lichtverhältnisse sowie über Klimakammern die Wassertemperatur den Bedingungen im Freiland angepasst. Kot- und Futterreste wurden einmal pro Woche entfernt.

Expositionszeiten der Versuchstiere im Bypass. Die Untersuchungen zum Verhalten der einzelnen Biomarker wurden insgesamt über einen Zeitraum von 5 Jahren begleitet. Die Expositionsintervalle der Versuchstiere reichten dabei von wenigen Wochen bis zu mehreren Monaten (Tab. 2.3.1).

Tab. 2.3.1. Probenahmezeitpunkte, Expositionszeiträume der in den Bypass-Systemen exponierten Bachforellen und Bachschmerlen

Spezies	Beprobung	Expositionsdauer	Expositionszeitraum
Bachforelle	10-95	08 Wo	17/08/95-12/10/95
	10-95	13 Wo	13/07/95-12/10/95
	12-95	16 Wo	17/08/95-07/12/95
	12-95	21 Wo	13/07/95-07/12/95
	07-96	12 Wo	03/05/96-24/07/96
	09-96	20 Wo	03/05/96-18/09/96
	07-97	07 Wo	26/05/97-10/07/97
	11-97	24 Wo	26/05/97-07/11/97
	05-98	50 Wo FRL	26/05/97-07/05/98
	07-98	24 Wo FRL	26/05/98-16/07/98
	11-98	24 Wo FRL	26/05/98-05/11/98
	05-99	24 Wo FRL	20/11/98-11/05/99
	07-99	06 Wo FRL	21/05/99-06/07/99
	11-99	23 Wo FRL	21/05/99-03/11/99
	Bachschmerle	10-95	13 Wo
12-95		15 Wo	24/08/95-07/12/95
08-96		12 Wo	28/06/97-18/09/96
07-97		07 Wo	26/05/97-10/07/97
11-97		24 Wo	26/05/97-07/11/97
07-98		09 Wo FRL	12/05/98-16/07/98
05-99		24 Wo FRL	20/11/98-11/05/99
07-99		05 Wo FRL	02/06/99-06/07/99
11-99		13 Wo FRL	03/08/99-02/11/99

FRL= zeitgleiche Freilandbeprobung zu den Bypassuntersuchungen

2.4 Regenerationsexperiment nach Bypass-Exposition

Im Anschluss an die Halbfreilanduntersuchungen im November 1997 wurden 6 Monate im Bypass exponierte Bachforellen der Standorte Krähenbach und Körsch A für 12 Wochen in 200 L Glasaquarien unter kontrollierten Bedingungen im Labor am Zoologischen Institut, Abt. Physiologische Ökologie der Universität Tübingen in Durchflusssystemen (kontinuierliche Belüftung, Temperatur 12 ± 2 ° C) gehalten. Über Futterautomaten wurden die Tiere täglich mit 1-2 % des Körpergewichts entsprechenden Menge ALMA[®] Brutfutter2 (Fa. Bolzenhard GmbH, Kempten) gefüttert; Futterreste wurden wöchentlich entfernt. Die Beprobung der Versuchstiere entspricht den unter 2.11 beschriebenen Methoden.

2.5 Experiment zur Wirkung des 10-fach konzentrierten Körsch-Schadstoffcocktails in Kombination mit Ammoniak auf Bachforellen

Juvenile Bachforellen wurden unter Laborbedingungen in der Versuchsanlage Wielenbach der Bayerischen Landesamt für Wasserforschung sowohl der 10-fachen mittleren Konzentration der Körsch-Freilandwerte, einer steigenden Ammoniakkonzentration (je 7 Tage 10, 20, 30 µg/L, 4 Tage 40 µg/L, 3 Tage 50 µg/L) sowie einer Kombination aus 10-fachem Körschcock-

2. Material und Methoden

tail und steigender Ammoniakkonzentration exponiert. Als Lösungsvermittler wurde 0,01 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Eine Lösungsmittel- und Wasserkontrolle wurde parallel durchgeführt. Die Beprobung der Versuchstiere entspricht den unter **2.11** beschriebenen Methoden.

Abb. 2.5.1 Fischdaten von Bachschmele und Bachforelle zu den Versuchen 2.5 - 2.7

	Länge [cm]	Gewicht [g]	Alter [Monate]	Herkunft
Ammoniakversuch				
Bachforelle	13	15	9	Versuchsanlage Wielenbach
Ethanolcocktail				
Bachforelle	15	42	12	Forellenzucht, Haigerloch-Gruol
PAH-Cocktail				
Bachforelle	14	31	10	Forellenzucht, Haigerloch-Gruol
Bachschmerle	9 - 10	4 - 5	10	Fischzucht, Unterrieden (Allgäu)

2.6 Laborexposition von Bachforelle und Bachschmerle der biochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen.

Ethanol-Cocktail: Einjährige Bachforellen (Tab. 2.5.1) wurden 34 Tage in Glasaquarien der 1-fachen, 10-fachen und der 50-fachen mittleren Konzentration der Körsch-Freilandwerte exponiert (Tab. 2.6.1). Als Lösungsvermittler wurde 0,01 % Ethanol gewählt. Als Referenz diente ein Ethanolansatz ohne Schadstoff sowie eine Wasserkontrolle. Die Versuchstiere wurden täglich mit ca. 2 % des Körpergewichts Futtermenge Trouvit 20/2 (Milkivit-Werke GmbH, Bergheim) gefüttert. Die Wasserparameter sind Tab. 2.8.1 zusammengefasst.

Tab. 2.6.1 Mittelwerte der Körschbelastung sowie die Konzentrationen des Ethanolcocktails und des PAH-Cocktails im Pulsversuchs mit Bachforelle und Bachschmerlen.

	Konzentration Körschwasser [ng/L Wasser]	Ethanol-Cocktail nominell / real [ng/L Wasser]	PAH-Cocktail nominell [ng/L Wasser]	Chemikalien 50-fache Konz. [mg/ 0,5 L]
Lindan (HCH)	26	1,170 / 1,864	1170	58,25
p,p, DDT	---	5 / n.n.	---	0,27
p,p, DDT	---	10 / n.n.	---	0,51
Polychlorphenol (PCP)	39	32 / 0,064	31,6	1,56
Hexachlorbenzol (HCB)	---	6 / n.n.	6	0,3
Trifluralin		74 / n.n.	74	3,7
PCB28	---	1,2 / n.n.	---	0,59
PCB52	---	9 / n.n.	---	0,45
PCB101	---	5 / n.n.	---	0,27
PCB138	---	3 / n.n.	---	0,23
PCB153	---	5 / n.n.	---	0,17
PCB180	---	1 / n.n.	---	0,04
Naphthalin	21,6	2,38 / 1,83	---	119

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 2.6.1

	Konzentration Körschwasser [ng/L Wasser]	Ethanol-Cocktail nominell / real [ng/L Wasser]	PAH-Cocktail nominell [ng/L Wasser]	Chemikalien 50-fache Konz. [mg/ 0,5 L]
Acenaphthylen	1,6	75 / 98	---	3,75
Acenaphthen	2,4	495 / 537	---	24,75
Fluoren	13,1	78 / 88	15,6	3,9
Phenanthren	35,3	212 / 150	212	10,6
Anthracen	2,1	42 / 34	41,9	2,1
Fluoranthen	11,1	58 / 36	58,0	2,9
Pyren	11,1	33 / 19	33,4	1,67
Benz(a)anthracen	0,8	---	4,78	0,24
Chrysen	1,4	---	5,8	0,29
Benzo(b)fluoranthen	1,8	---	4,58	0,23
Benzo(a)pyren	0,6	---	3,68	0,18

n.n. = nicht nachweisbar: real Konzentration und Daten nach Honnen et. al. (Projektpartner: chemische Analytik), grau hinterlegt: Chemikalieneinwaage des PAH-Cocktails

2.7 Pulsversuch: PAH-Cocktail.

Bachforellen und Bachmerlen wurden 14 Tage einem ausgewählten PAH- Pestizidcocktail (im Folgenden nur noch als PAH-Cocktail bezeichnet) mit der 50-fachen mittleren Konzentration (Tab. 2.6.1) der Körsch-Freilandwerte belastet (Abb. 2.7.1, Abb. 2.8.1). Als Lösungsvermittler wurde 0,01 % Dimethylsulfoxid (DMSO) gewählt. Am Tag 15 wurde parallel zur 50-fachen Grundbelastung bei einem Teil der Versuchstiere die Belastung für 48 h auf die 200-fache Dosis der Freilandwerte erhöht, um danach zur 50-fachen Grundbelastung zurückzukehren. Beprobungen für die biochemischen und morphologisch-ultrastrukturellen Untersuchungen erfolgten 2 und 10 Tage nach Beendigung des Belastungspeaks an den Versuchstagen 18 und 26. Ein Lösungsmittelansatz dientet als Referenz. Die Fütterung der Bachforellen erfolgte mit einer 1 - 2 % des Körpergewichts entsprechenden Futtermenge an Trouvit 20/2 (Milkivit-Werke GmbH, Bergheim), die der Bachschmerlen mit Trockenfutter Tetramin (Fa. Tetra, Melle) und dem Tablettenfutter für Welse und Schmerlen (Fa. Sera Viformo, Heinsberg). Die Wasserparameter sind in Tab. 2.8.1 zusammengefasst.

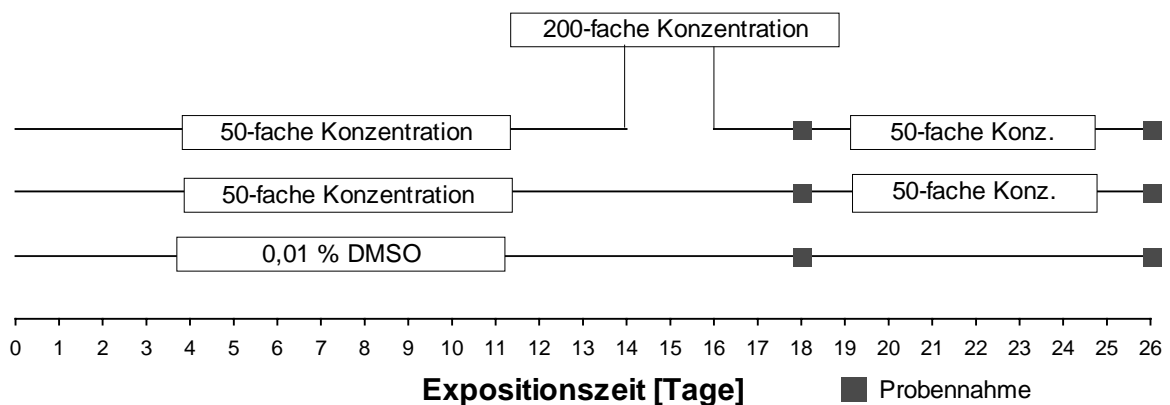


Abb. 2.7.1 Expositionsprofil des PAH-Cocktail-Experiments mit Bachforelle und Bachschmerle

2.8 Versuchsaufbau zur Ethanolcocktail und - PAH-Cocktailexposition mit Bachforelle und Bachschmerle

Die Exposition der Versuchstiere erfolgte in einem Durchfluss-System (Abb. 2.8.1), bei der sechs 150 L Glasaquarien mit Brunnenwasser durchflossen wurden. Aus einem kontinuierlich belüfteten Vorratsbecken wurde die Wasserzufuhr in die einzelnen Aquarien durch Durchflussregler (Rotameter®, Rota Yokokawa, Wehr) begrenzt. Aus den einzusetzenden Schadstoffen bzw. Lösungsmitteln wurde zunächst eine erste Stammlösung (100.000-fach konzentriert) angesetzt, die dann in Vorratsgefäßen (5 L Erlenmeyerkolben, Fa. Schott) zu einer zweiten Stammlösung (10.000-fach) weiter verdünnt wurde. Über Schlauchpumpen (Ismatec, Glattburg-Zürich, CH) wurde der Schadstoffeintrag in die Aquarien dosiert. Die Zuleitungen bestanden bis auf den Pumpenbereich aus Glasröhren (0,5 cm Innendurchmesser). Das schadstoffhaltige Wasser wurde nach Passage der Becken über Aktivkohlefilter gereinigt und zusammen mit dem Wasser der Kontrollaquarien abgeführt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Versuchstiere zu gewährleisten, wurden die Aquarien zusätzlich belüftet. Wasserparameter und Besatz können Tabelle 2.8.1 entnommen werden.

Tab. 2.8.2 Wasserdaten und Versuchsparameter der Laborexpositionen mit Bachforelle und Bachschmerle.

	Ethanolcocktail	Pulsversuch-PAH-Cocktail	Pulsversuch-PAH-Cocktail
Fischart	Bachforelle	Bachforelle	Bachschmerle
Expositionszeitraum	04.05. - 8.06.1997	27.11. - 22.12.1998	25.03. - 24.04.1999
Lösungsmittel	0,01 % ETOH	0,01% DMSO	0,01% DMSO
Wasserwerte			
Ammonium [mg/L]	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Nitrit [mg/L]	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Chlorid [mg/L]	90 - 96	90 - 100	89 - 95
Carbonathärte [dH]	15 - 15,2	15 - 15,2	13,2
Gesamthärte [dH]	25	25	25
pH-Wert	8,0 - 8,3	8,0 - 8,3	8 - 8,1
Temperatur [° C]	11,8 - 19,2° C	12 ± 1,5	14,0 ± 0,5
tägl. Wasserdurchsatz/ Aquarium	450 L	450 L	450 L
Aquarienvolumen [L]	145	145	145
Sauerstoffsättigung [%]	53 - 92	70 - 100	80 - 100
Besatz [Tiere/Becken]	27	30	39 - 41

2. Material und Methoden

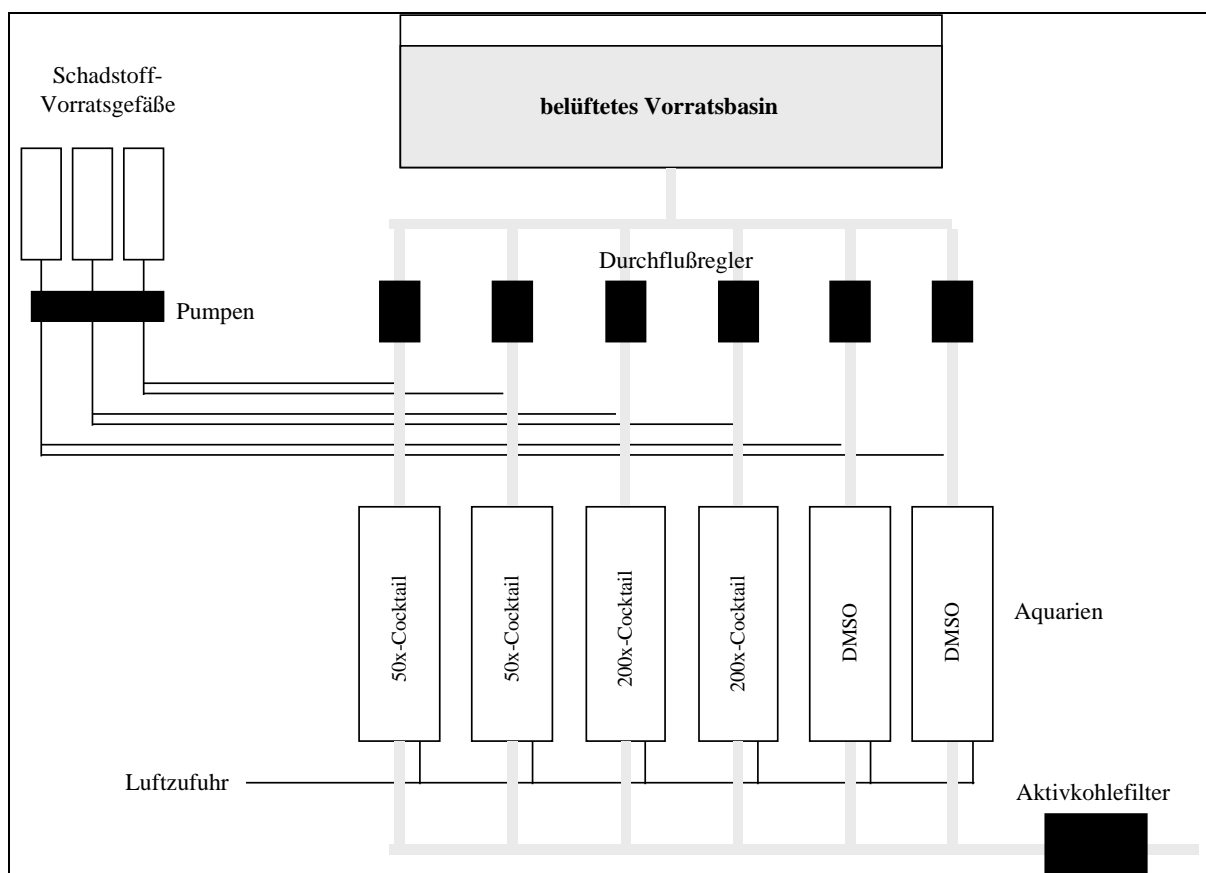


Abb. 2.8.1 Expositionsanlage für die Pulsexperimente mit Bachforelle und Bachschmerle am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte

- pH-Meter, 761 Calimatic Fa. Knick
- Mikrotiterplatten-Spectralphotometer, Fa. SLT, Crailsheim
- Ultraschall-Desintegrator, Sonoplus D70, Fa. Bandelin, Berlin
- Homogenisator PT 1200 Polytron, Fa. Kinematica, Littau, CH
- Wärmebad, Fa. GFL, Burgwedel
- Vortex VF2 Fa. Janke und Klunkel, Staufen
- Kühlzentrifuge, Biofuge 17RS, Fa. Heraeus Sepatech, Hanau
- 4 Kanal Perfusionsionspumpe, MS4 Reglo, Fa. Ismatec, Glattburg-Zürich, CH
- Tischzentrifuge 5417 C, Fa. Eppendorf, Engelsdorf
- Potter-Elvehjem-Homogenisator Fa. Braun, Melsungen

Verbrauchsmaterialien

- unsterile 96 well-Mikrotiterplatten, Fa. Nunc, Wiesbaden

2. Material und Methoden

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf, Hamburg
- Kanülen, Sterican 0,9 x 40, Fa. Braun AG, Meisungen

Enzyme

Laktatdehydrogenase (EC.1.1.1.27)	Sigma, Deisenhofen
Glycerophosphat Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.8)	Sigma, Deisenhofen
Triosephosphat Isomerase (E.C.5.3.1.1)	Sigma, Deisenhofen
Aldolase (E.C.4.1.2.13)	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-P-Dehydrogenase (E.C 1.1.1.49)	Sigma, Deisenhofen

Chemikalien

Alle Chemikalien waren von p. a.-Qualität.

Acetylthiocholiniodid	Serva, Heidelberg
Acetyl-CoA-Na -Salz	Sigma, Deisenhofen
ϵ -Aminocapronsäure	Serva, Heidelberg
Antimycin	Sigma, Deisenhofen
ATP-Na-Salz (Adenosintriphosphat)	Serva, Heidelberg
Benzocain (Ethyl-4-Aminobenzoat)	Sigma, Deisenhofen
Cytochrom c	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Baker, Deventer, NL
Dithiobisnitobenzoesäure	Serva, Heidelberg
Dithiotreitol	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Eserin (Physiostigmin)	Sigma, Deisenhofen
Fruktose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
HEPES (N-(2-(Hydroxyethyl)-Piperizin-N-2-Ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Imidazol	Merck, Darmstadt
K_3HPO_4	Roth, Karlsruhe
KCl	Baker, Deventer, NL
KH_2PO_4 -Na	Serva bzw. Roth
α -Ketoglutarat	Sigma, Deisenhofen
L-Alanin	Serva, Heidelberg
L-Malat-Na-Salz	Sigma, Deisenhofen
Maleimid	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
$MgCl_2$	Roth, Karlsruhe
Mops (Morpholinopropan-Sulfonsäure)	Serva, Heidelberg
NADH-Na ₂ -Salz	Sigma, Deisenhofen

2. Material und Methoden

NADPH-Na-Salz	Serva bzw. Sigma
NADP-Na ₂ -Salz	Serva, Heidelberg
NaHCO ₃	Serva bzw. Roth
NaOH	Serva, Heidelberg
Natriumdithionit (Na ₂ S ₂ O ₄)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
<i>o</i> -Nitrophenylacetat	Sigma, Deisenhofen
Phenazinmethosulfat (PMS)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Pyridoxalphosphat	Sigma, Deisenhofen
Rinder-Serum-Albumin	Sigma, Deisenhofen
Succinat-Na-Salz	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Titaniumoxysulfat (TiOSO ₄)	Packard, Illinois
Trinatrium-Citrat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	Packard, Illinois

2.10 Präparation der Organe für biochemische Untersuchungen.

Für die biochemischen Untersuchungen wurden die Fische zunächst in einer gesättigten Lösung Ethyl-4-aminobenzoat (Benzocain) betäubt und anschließend die Körpermaße Länge und Gewicht bestimmt. Nach ventraler Öffnung der Bauchdecke und Freilegung des Herzens wurde dem Versuchstier der Sinus venosus durchtrennt, und das Gesamttier über den Ventrikel mittels einer peristaltischen Pumpe (Ismatec MS-4-Reglo-Schlauchpumpe) und einer Kanüle (0,4-0,6 mm Innendurchmesser) mit eiskalter 0,9 % NaCl-Lösung perfundiert, bis die Leber blutleer war. Die Leber wurde entnommen, kleingeschnitten und in 2 ml Homogenisationspuffer (250 mM Sucrose, 5 mM Mops (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,1 % Ethanol, 200 mM Phenazinmethosulfatefluorid gelöst in 5 ml Isopropanol, 1 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 0,2 mM Mercaptoethanol, 0,02 mM Dithiotreitol) aufgenommen und für ca. 2 Minuten bei 300 U/min eisgekühlt mit einem einzigen Potterstoß homogenisiert (Potter-Elvehjem Homogenisator). Um ein Minimum von 200 mg Leber zu erhalten, wurden je nach Lebergewicht der Versuchstiere die Organe von 1-3 Tieren gepoolt.

Bei 10.000 g wurde das Homogenat für 20 Minuten bei 4 ° C in einer Haereus-Biofuge 17 RS zentrifugiert. 800 μ l des Überstandes wurden für weitere Aufarbeitungsschritte abgenommen. Der restliche Überstand sowie das gewonnene Pellet wurden separat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu den Aktivitätsbestimmungen der Enzyme auf -70° C gelagert.

Für die im Gehirn zu untersuchenden Enzyme wurde das Gehirn präpariert, gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aktivitätsbestimmung auf -70 ° C eingefroren. Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Gehirne in Homogenisationspuffer aufgetaut. Bei den Bachforellen wurden pro 10 mg Gehirn / 115 μ l Homogenisationspuffer, bei den Bachschmerlen pro 10 mg Gehirn / 50 μ l Homogenisationspuffer zugegeben und anschließend in einem Polytron-Homogenisator homogenisiert.

2.11 Enzymmessungen

Die Aktivitäten ausgewählter Stoffwechsellzyme wurden im Gehirnhomogenat sowie in zwei spezifischen Fraktionen des Leberhomogenates, dem Pellet bzw. dem Überstand, photometrisch bestimmt (Tab. 2.11)

Tab.2.11 Funktion und Lokalisation der ausgewählten Stoffwechsellzyme sowie Aktivität für Referenzbestimmung

Enzym:	Funktion - Lokalisation	Fraktion	Referenz
Acetylcholinesterase	Gehirn - Synapsen des ZNS	Gehirn	Ellman et al. 1961
Alaninaminotransferase	Cytosol - Aminosäureabbau	Überstand	Bergmeyer 1970
Citratsynthase	Mitochondrien - Citratzyklus	Pellet	Srere et al. 1963
Cytochrom C-Oxidase	Mitochondrien - Citratzyklus	Pellet	Cooperstein & Lazarow 1950
Esterase	Cytosol - Esterhydrolyse	Überstand	Beaufay et al. 1974
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Cytosol - Pentosephosphatweg	Überstand	Kornberg & Horecker 1955
Hexokinase	Cytosol - Phosphorylierung von Glucose	Überstand	Bergmeyer 1970
Katalase	Peroxisomen - H ₂ O ₂ -Abbau	Pellet	Baudhuin et al. 1964
Malatenzym	Cytosol - Fettsynthese	Überstand	Ochoa 1955
Phosphofruktokinase	Cytosol - Glykolyse	Überstand	Mommsen et al. 1980
Saure Phosphatase	Lysosomen - saure Hydrolyse	Pellet	Moss 1983
Succinatdehydrogenase	Mitochondrien - Citratzyklus	Pellet	Ackrell et al. 1978
Superoxiddismutase	Cytosol - O ₂ ⁻ -Abbau	Überstand	Ewing & Janero 1995

Sämtliche photometrische Aktivitätsbestimmungen wurden in 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten in einem Mikrotiterplattenreader durchgeführt. Die Aktivitäten wurden entweder als spezifische Aktivität in Milli-Units pro mg Protein (mU/mg Protein) oder als Gesamtaktivität in Milli-Units bzw. Units pro g Organ (mU/g Organ) berechnet, wobei 1 U der Umsetzung von 1 µmol Substrat pro 1 Minute entspricht.

$$\text{U/ml Messlösung} = (\Delta E \times V_{\text{ges}} \times \text{Probenverdünnung}) / (\epsilon \times V_e \times d \times \Delta t)$$

Die Aktivität der Katalase wurde in Beaufay-Units (B.U.) berechnet (Baudhuin et al. 1964):

$$\text{B.U./ml Messlösung} = ((\log \text{ Probe} - \log \text{ Blank}) \times V_{\text{ges}} \times \text{Probenverdünnung}) / V_e \times \Delta t \times \text{Beaufay-Faktor (50)}$$

mit:

d: Schichtdicke in cm, Mikrotiterplatte 0,0028 x V_{ges}

ε : mikrosomaler Extinktionskoeffizient µM⁻¹ x cm⁻¹

Δ t: Messintervall in Minuten

ΔE: molarer Absorptionskoeffizient

V_{ges}: Gesamtvolumen im Test (ml)

Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7). Die cytosolische Acetylcholinesterase wurde nach (Ellman, 1961) bestimmt. Die Reaktion von Dithiobisnitrobenzoat mit durch die enzymatische Reaktion gebildetem Thiocholin wurde für 3 Minuten bei 415 nm verfolgt (Extinktionskoeffizient $13,6 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

250 μl 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 8) wurden zu 10 μl unverdünnter Probe pro Well pipettiert. Nach 2 min. Inkubation bei 0 ° C wurden 25 μl (3,84 mM Dithiobisnitrobenzoesäure in 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer pH 7,0; 6,7 mM NaHCO_3) zugegeben. Nach 2 Minuten Vorlauf auf Eis wurde die Reaktion mit 25 μl 5 mM Acetylthiocholinjodid gestartet (25 ° C). Durch selektive Hemmung der Acetylcholinesterase mit Physostigmin (Eserin) (250 μl 0,05 mM gelöst in 0,1 M KH_2PO_4) wurde die Umsetzung von Acetylcholiniodid durch die Pseudocholinesterase ermittelt. Ein zusätzlicher Leerwert ohne Substrat diente zur Korrektur der Thiole und der Bestimmung der Absorption der Probenlösung.

Alaninaminotransferase (E.C. 2.6.1.2). Die Aktivität der cytosolischen Alaninaminotransferase wurde nach (Bergmeyer, 1970) bestimmt. Dabei wird Alanin durch die Alaninaminotransferase in Pyruvat umgesetzt, welches in der Folgereaktion durch die Laktatdehydrogenase unter Verbrauch von NADH in Laktat reduziert wird. Zu 10 μl unverdünnter Probe wurden 250 μl Reaktionsgemisch (50 mM HEPES-Puffer (pH 7,5), 1,2 mM NADH, 1,6 M L-Alanine, 0,25 mM Pyridoxalphosphat) und 10 U Laktatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) zugegeben. Nach 3 Minuten Vorlauf wurde die Reaktion bei 25 ° C mit 25 μl 105 mM α -Ketoglutarat gestartet und für 3 Minuten verfolgt. Ein Blank ohne Substrat diente zur Korrektur substratunabhängiger NADH-Oxidationen. Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt $6,2 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Citratsynthase (E.C. 4.1.3.7). Die Bestimmung der katalytischen Aktivität der mitochondrialen Citratsynthase wurde nach den Vorgaben von (Srere, 1963) durchgeführt. Verfolgt wird bei 415 nm die katalytische Umsetzung von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat, wobei das dabei freigesetzte CoA mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) zu einem photometrisch aktiven Thiol weiterreagiert (Extinktionskoeffizient $13,6 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

250 μl eines Reaktionsgemisches (50 mM Tris Puffer pH 8,0; 0,1 mM Acetyl-Coenzym A; 0,1 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat) wurden zu 15 μl Probe (unverdünntes Pellet) gegeben. Nach 2 Minuten Vorlauf wurde die Reaktion mit 25 μl 5,5 mM Oxalacetat gestartet. Die Extinktionsänderung wurde bei 415 nm für 3 Minuten bei 25 ° C aufgezeichnet. Ein Leerwert ohne Enzym diente zur Korrektur spontaner Substratumsetzungen.

Cytochrom C Oxidase (E.C. 1.9.3.1). Die katalytische Aktivität der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase wurde mit Hilfe der Methode nach (Cooperstein and Lazarow, 1950) bestimmt. Bei 550 nm wurde die Oxidation von reduziertem Cytochrom c verfolgt (Extinktionskoeffizient von oxidiertem Cytochrom c $21,1 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Das Reaktionsgemisch (135 mg Cytochrom c, 15 ml 0,5 M K_3HPO_4 pH 7,4; 250 μl Emasol, 2,5 ml 0,1 M EDTA, pH 7,4, ad 250 ml H_2O) wurde durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, bis die Extink-

tion der Lösung bei 550 nm 0,7 betrug (Farbumschlag von rot nach pink). Zu 10 μl Probe (1:10 verdünntes Pellet) wurden 250 μl Reaktionsgemisch pipettiert und die Reaktion sofort bei 550 nm für 2 Minuten bei 25 ° C verfolgt. Ein Leerwert ohne Enzym diente zur Korrektur enzym-unabhängiger Oxidation des Cytochrom C.

Esterase (E.C. 3.1.1.1). Die Aktivität der cytosolischen Esterase wurde nach (Beaufay *et al.*, 1974) bestimmt. In der Reaktion wird die Bildung von *o*-Nitrophenol aus *o*-Nitrophenylacetat bei 415 nm verfolgt (Extinktionskoeffizient von *o*-Nitrophenol $3,06 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Zu 10 μl Probenüberstand wurden 250 μl Reaktionsgemisch (40 μl 0,5 M KH_2PO_4 Puffer (pH 7,4), 10 μl 10 % Triton x-100, 10 μl 0,1 M EDTA (pH 7,4) und 940 μl H_2O) zugegeben und für 10 Minuten bei 25 ° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μl 6 mM *o*-Nitrophenylacetat (6 mg *o*-Nitrophenylacetat in 1 ml eiskaltem Ethanol gelöst und 1:5 mit 0,1 M TVBE-Puffer verdünnt) gestartet und bei 415 nm für 3 Minuten verfolgt. Eine Referenz ohne Substrat und ein Leerwert ohne Probe dienten zur Korrektur spontaner Substratumsetzungen.

Glucose-6P-Dehydrogenase (E.C 1.1.1.49). Die Aktivität der cytosolischen Glucose-6P-Dehydrogenase wurde nach (Kornberg and Horecker, 1955) bestimmt. Bei 340 nm wurde die Reduktion des Coenzyms NADP zu NADPH verfolgt (Extinktionskoeffizient $6,02 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Zu 20 μl unverdünntem Überstand wurden 250 μl eines Reaktionsgemisches (0,5 M Tris-Puffer, pH 7,5; 6,3 mM MgCl_2 ; 0,4 mM NADP; 5 mM Maleimid) gegeben. Nach 3 Minuten Vorlauf (25 ° C) wurde die Reaktion durch die Zugabe von 25 μl 37 mM Glucose-6-phosphat gestartet und über 3 Minuten bei 340 nm verfolgt. Ein Leerwert ohne Enzym diente zur Korrektur spontaner Substratumsetzungen.

Hexokinase (E.C 2.7.1.1). Die Aktivität der cytosolischen Hexokinase wurde nach (Bergmeyer, 1970) bestimmt. In zwei Reaktionen entstand aus Glucose und ATP durch die Hexokinase zunächst Glucose-6-Phosphat, welches durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase unter Bildung von NADPH umgesetzt wurde. Bei 340 nm wurde über 3 Minuten die Bildung von NADPH verfolgt (Extinktionskoeffizient von NADPH: $6,2 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

250 μl Reaktionsgemisch (50 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, 1 mM Glucose, 5 mM MgCl , 0,16 mM NADP, 2 U Glucose-6P-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.49)) wurden mit 30 μl unverdünnter Probe gemischt, und nach 6 Minuten Vorlauf wurde die Reaktion mit 25 μl 10 mM ATP gestartet. Ein Leerwert ohne Probe diente zur Korrektur enzymunabhängiger NADPH-Bildung.

Katalase (E.C.1.11.1.6). Die Aktivität der peroxisomalen Katalase wurde nach (Baudhuin *et al.*, 1964) bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von H_2O_2 in H_2O und $\frac{1}{2} \text{O}_2$ wurde über die Umwandlung von Titanoxid in und das gelbe Titansulfat-Peroxid bestimmt (415 nm Extinktionskoeffizient $19,1 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

4 μl Probe (Pellet, 1:100 verdünnt) wurden zusammen mit 50 μl 1% Triton X-100 und 500 μl Reaktionsgemisch (10 ml 10 mM Imidazol-HCl-Puffer pH 7,2; 100 mg Rinderserumalbumin,

2. Material und Methoden

35 µl 30 % H₂O₂ ad 100 ml H₂O) in einem Eppendorf Tube gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit 500 µl Titanoxysulfat (6.8 g TiOSO₄ in 1 L konz. H₂SO₄ kochen und nach Filtration mit konz. H₂SO₄ auf das 1,5-fache verdünnen) gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf Eis wurde das gelbe Titansulfat-Peroxid bei 415 nm quantifiziert. Ein Blank ohne Enzym diente zur Korrektur spontaner Substratumsetzungen.

Malatenzym (E.C.1.1.1.40). Die katalytische Aktivität des cytosolischen Malatenzyms wurde nach (Ochoa, 1955) bestimmt. Die NADP⁺-abhängige oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat und NADPH wurde bei 340nm gemessen (Extinktionskoeffizient: 6,2 µMol⁻¹ x cm⁻¹). Zu 20 µl cytosolischen Überstand (1:10 verdünnt) wurden 250 µl Reaktionsgemisch (50 mM HEPES Puffer, pH 7,4; 1 mM MgCl₂, 2 mM NADP) gegeben. Nach 4 Minuten Inkubation bei 25 ° C wurde die Reaktion mit 25 µl 11.2 mM L-Malat gestartet und die Reaktion bei 340 nm für 3 Minuten verfolgt.

Phosphofruktokinase (E.C.2.7.1.11). Die katalytische Aktivität der cytosolischen Phosphofruktokinase wurde nach (Mommssen *et al.*, 1981) bestimmt. Im Verlauf der glykolytischen Reaktionskaskade wurde zunächst Fructose-6-Phosphat mit ATP durch die Phosphofruktokinase zu Fructose-1,6-Bisphosphat und ADP umgesetzt. In der Folgereaktion erfolgte die Spaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat in die Isomere Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat entstand unter Reduzierung von NAD⁺ zu NADH 1,3-Bisphosphoglycerat. Photometrisch verfolgt wurde die Bildung von NADH bei 340 nm (Extinktionskoeffizient von NADH: 6,2 µMol⁻¹x cm⁻¹). Zu 25 µl cytosolischem Überstand (unverdünnt) wurden 250 µl eines Reaktionsgemisches (50 mM Tris-Puffer, pH 7,5; 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl; 0,75 mM ATP, 0,12 mM NADP, 1 U/ml Glycerophosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.8), 1 U/ml Aldolase (E.C.4.1.2.13), 1 U/ml Triosephosphat-Isomerase (E.C.5.3.1.1)) gegeben. Nach 2 Minuten Vorlauf bei 25 ° C wurde die Reaktion mit 25 µl Substrat (3mM Fructose-6-Phosphat und 130 µM Fructose-2,6-Bisphosphat) gestartet und die Reaktion 3 Minuten bei 340 nm verfolgt. Ein Leerwert ohne Substrat diente zur Korrektur substratunabhängiger Umsetzungen.

Saure Phosphatase (E.C 3.1.3.2). Die Aktivität der lysosomalen Sauren Phosphatase wurde nach den Vorgaben von (Moss, 1983) bestimmt. Verfolgt wurde bei 415 nm die Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat in 4-Nitrophenol, das unter basischen Bedingungen in das Nitrophenolat-Ion dissoziiert (Extinktionskoeffizient 3,06 µMol⁻¹ x cm⁻¹).

50 µl Substrat (7,6 mM 4-Nitrophenylphosphat gelöst in 45,9 mM Citrat-Puffer, pH 4.9) und 10 µl Probe (Pellet) wurden für 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend sofort mit 200 µl 0.1 M NaOH gestoppt und die Menge an gebildetem Nitrophenolat bei 415 nm gemessen. Nach Zugabe von NaOH wurde zur Korrektur der Absorbtion der Probenlösung in jeden Leerwert 10 µl Probe pipettiert.

Succinatdehydrogenase (E.C.1.3.99.1). Die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase wurde nach den Vorgaben von (Ackrell *et al.*, 1978) bestimmt. In der durch die Succinatdehydrogenase katalysierten Reaktion wurde Succinat oxidiert und Phenazinmethosulfat (PMS) reduziert. Durch Reoxidierung des PMS durch 2,6 Dichlorphenolindophenol (DCIP) wurde die Bildung des Phenolations bei 595 nm verfolgt. 10 µl Probe (1:5 verdünnt) wurden mit 250 µl Reaktionsmedium (25° C, 40 mM KH₂PO₄-Puffer (pH 7,5), 25 mM Na-Succinat, 0,02% (w/v) Phenazinmethosulfat (PMS), 0,004 % (w/v) 2,6-Dichlorphenolindo-phenol (DCIP), 0,1 mM KCN, 1 µg Antimycin A /mg Probenprotein) gemischt und die Extinktionsänderung wurde über 3 Minuten verfolgt. Ein Blank ohne Probe diente zur Korrektur spontaner DCIP-Reduktion. Der Extinktionskoeffizient von PMS beträgt 19,1 µMol⁻¹ x cm⁻¹.

Superoxiddismutase (EC 1.15.1.1) Die katalytische Aktivität der Superoxiddismutase wurde nach (Ewing and Janero, 1995) bestimmt. In der Reaktion wurde Nitroblautetrazolium (NBT) zu einem stabilen Formazanprodukt reduziert.

Zu 30 µl Probe wurden 225 µl eines Reaktionsgemisches (0,1 mM EDTA, 62 µM Nitroblautetrazolium (NBT), 98 µM NADH, 50 mM K₂HPO₄-Puffer) pipettiert; die Reaktion wurde mit 25 µl Substrat (33 µM Phenazinmethosulfat, 0,1 mM EDTA) gestartet und bei 550 nm über 5 Minuten verfolgt. Ein Blank ohne Enzym diente zur Korrektur spontaner Substratumsetzungen. Der Extinktionskoeffizient von PMS beträgt 19,1 µMol⁻¹ x cm⁻¹.

Bestimmung des Proteingehaltes. Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von (Bradford, 1976) in 96-Well-Mikrotiterplatten bestimmt. Aus Hühner-Ovalbumin wurde zur Quantifizierung des Proteingehaltes eine Eichreihe mit max. 0,4 mg/ml Protein erstellt. Zu 8 µl Probe (1:100 verdünnt) wurden 250 µl Messlösung (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 gelöst in 50 ml 95 % Ethanol, 100 ml 85 % Phosphorsäure ad 1 L a. bidest) gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm in einem Spectra Mikrotiterplattenreader (SpectraTM SLT, Crailsheim, FRG) bestimmt. Ein Leerwert ohne Probe diente als Referenzkorrektur der Messlösung.

2.12 Statistik

Statistische Unterschiede in den Enzymaktivitäten wurden mit dem **nicht parametrischen**-Wilcoxon-Mann-Whitney U-test (Sachs, 1974) erfasst. Die Signifikanzniveaus lagen bei: $p < 0.05$ (*, schwach signifikant), $p < 0.01$ (**, signifikant), $p < 0.001$ (***, stark signifikant).

Zur Unterscheidung der Testgewässer wurden die signifikanten Abweichungen in den Enzymaktivitäten von den Kontrollwerten in zwei Richtungen überprüft:

- Numerisch (ohne Wichtung): Unabhängig vom Signifikanzniveau wurden alle signifikanten Abweichungen der Enzymaktivitäten an jedem Modellgewässer gezählt. Die Anzahl der Abweichungen spiegelt das Potential eines Gewässers wider, Aktivitätsänderungen in den Markerenzymen zu induzieren.

- mit Wichtung: Jedes Signifikanzniveau wird gewichtet: $p < 0,05 = 1$ Punkt, $p < 0,01 = 2$ Punkte, $p < 0,001 = 3$ Punkte. Die Anzahl der Punkte spiegelt das Potential eines Gewässers, schwerwiegende Veränderungen in den Enzymaktivitäten zu induzieren, präziser wider als bei der numerischen Auswertung.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt neben Linien- und Balkendiagrammen auch als Box-Whisker-Plot in Sigma Plot (SPSS, Erkrath). Die in Abb. 2.12.1 grau eingefärbte Box zwischen der 25 % Perzentile (1.Quartil) und der 75 Perzentile (3.Quartil) enthält 50 % der erhobenen Daten; der Median ist als Linie innerhalb der Box dargestellt. Die je 25 % unterhalb bzw. oberhalb der Box liegenden Werte sind durch Whisker gekennzeichnet und werden durch Minimum bzw. Maximum begrenzt. Die Ausreißer der erhobenen Daten sind als Kreis dargestellt.

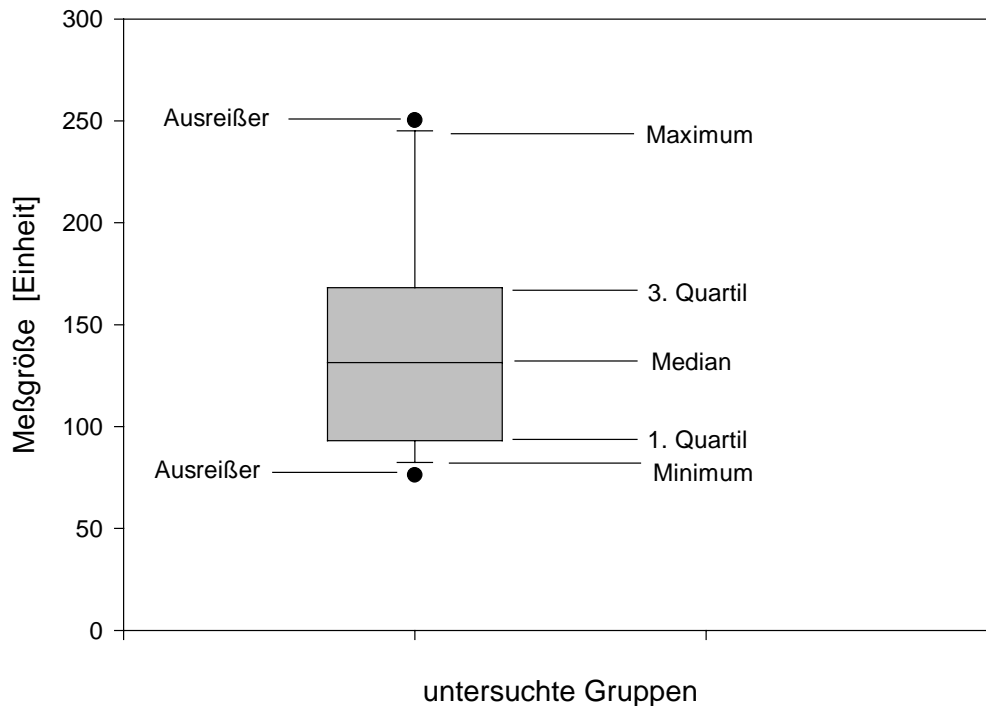


Abb. 2.12.1 Box- and Whisker-Plot nach Sigma Plot (SPSS, Erkrath)

2.13 Elektronenmikroskopie

Perfusion. Aus den Pulsversuchen mit Bachforelle und Bachschmerle wurden zu jedem Beprobungstermin jeweils sechs Tiere einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt. Die Versuchstiere wurden, wie im Abschnitt 2.10 beschrieben, perfundiert. Im Unterschied zur beschriebenen Methode wurde als Fixierungsmittel Perfusionsfixans I (1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 2,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) pH 7,6) verwendet. Mit Erreichen der Fixierungsstarre der Leber wurde die Perfusion

beendet. Nach Entfernung der Gallenblase wurde die Leber in Blöckchen von ca. 2 - 3 mm Kantenlänge geschnitten und in Perfusionsfixans I bei 4° C inkubiert.

Organeinbettung. Nach 2 x 10 Minuten Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6, 4 ° C), wurden die Leberproben über Nacht in Fixans II (2,5 Glutardialdehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer mit 4 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, Fa. Serva., Heidelberg) und 0,05 % CaCl₂, pH 7,6, 4° C) inkubiert. Nach drei weiteren Spülschritten á 10 Minuten in 0,1 M Cacodylatpuffer wurden die Proben zur Darstellung von Membranen und Glykogen für 90 Minuten in reduziertes Osmium (1:1 Gemisch aus OsO₄ und K₄(Fe[CN]₆) = Osmiumferrocyanit, (Karnovsky,1971) überführt. Der Osmierung folgten je drei weitere Spülschritte mit 0,1 M Cacodylat- und 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2; 4° C) und über Nacht eine *En Bloc*-Kontrastierung bei 4° C in 1 % Uranylacetat gelöst in 0,05 M Maleatpuffer. Über eine aufsteigende Alkoholreihe mit 4° C kaltem 75, 85, 95 und 100 % Ethanol (ungekühlt) wurden die Proben entwässert und anschließend für 24 Stunden in ein 1:1-Gemisch aus Ethanol und Spurr (Spurr, 1969) überführt. Nach einer 6-stündigen Inkubation in einem 1:3 Ethanol-Spurr Gemisch wurden die Proben schließlich in reines Spurr transferiert, um 24 Stunden später in Beemkapseln eingebettet zu werden. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgte für 48 h bei 70 ° C im Wärmeschrank. An einem Reichert OM-U2 Ultramikrotom wurden für die Orientierung mit dem Lichtmikroskop Semidünnschnitte sowie Ultradünnschnitte von 200 nm Dicke für die Elektronenmikroskopie erstellt. Zur Verstärkung des Kontrastes wurden die Ultradünnschnitte für 6 min mit Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963).

2.14 Embryotoxizität

Um den in den Pulsversuchen mit Bachforelle und Bachschmerle eingesetzten Schadstoffcocktail auf sein entwicklungsgefährdendes Potential auf Fischembryonen und Fischlarven zu untersuchen, wurden im Labor Embryotoxizitätstest mit nachfolgenden Early Life Stage-Tests nach Nagel mit dem Zebraärbling (*Danio rerio*) durchgeführt.

Zebraärbling (*Danio rerio*). Als Modellfisch für *In vivo* und *In vitro*-Untersuchungen ist der Zebraärbling aufgrund seiner Größe, Toleranz gegen Temperatur- und pH-Schwankungen, bestens geeignet. Neben der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gehört er zu den am besten charakterisierten Fischarten. Die problemlose Zucht im Labor gestattet eine ausreichende Versorgung mit genetisch einheitlichen Tieren bzw. Eiern, da ein Laichansatz bis zu 300 Eier liefert.



Abb. 2.14.1 Zebrahärling (*Danio rerio*)

Eigewinnung: Einen Tag vor der Eigewinnung wurden die Zuchttiere mehrmals täglich mit Artemien (*Artemia salina*) *ad libitum* gefüttert. Zuchtpaare aus zwei Männchen und ein Weibchen wurden über Nacht in separaten Laichkästen der Ablaihanlage zusammengesetzt.

In einem halb gefüllten Durchflussaquarium (150 x 80 x 40 cm) wurden sechs Laichkästen in einer Doppelreihe auf passende Laichschalen aufgesetzt. Künstliche Wasserpflanzen dienen der Stimulation der Laichpaare. Um ein Auffressen der Gelege durch die Zuchtpaare zu verhindern, fielen die Eier durch Drahtgitterböden der Laichkästen in die Laichschalen. Sichtschutz zwischen benachbarten Laichkästen sollte eine größtmögliche Abschirmung der Laichpaare gewähren. Eine Umwälzpumpe sorgte für eine kontinuierliche Wasserumwälzung in allen Laichkästen, während die Wassertemperatur durch Heizmatten auf konstanten $26 \pm 1^\circ \text{C}$ gehalten wurde. Die Laichanlage wurde mit Aquarienwasser (Sauerstoffgehalt: 7,5 mg/L; Gesamthärte: 20° dH; Carbonathärte: 12° dH; Ammonium: nicht nachweisbar; Nitrit < 0,05 mg/L) befüllt und kontinuierlich belüftet. Die Dunkelperiode wurde über Zeitschaltuhren mit 8 Stunden vorgegeben.

Die Eier wurden am Morgen kurz nach Beginn der Lichtphase aus den Laichschalen entnommen und auf ihre Befruchtungsrate überprüft; lag die Befruchtungsrate über 70 % wurden die Eier aller Laichpaare gemischt und den nachfolgenden Versuchen zugeführt. Zum Auszählen

der Eier wurden diese bereits in den entsprechend zu exponierenden Schadstoffkonzentrationen belastet.

Kombinationsversuch – Early Life Stage-Test mit angeschlossenen Embryolarval Test.

Eier und nachfolgende Jungfischstadien des Zebrafisch (*Danio rerio*) wurden dem 0,1-fachen, 1-fachen, 10-fachen, 100-fachen und 200-fachen PAH-Cocktail der mittleren Körskonzentration sowie einer Wasser- und Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO) exponiert. Die Exposition der Eier erfolgte in mit Flachbodengläsern bestückten Kunststoff 24-Well-Platten (Fa. Nunc, Wiesbaden). Der Einsatz der Flachbodengläser (40 x 16 x 1 mm) wurde gewählt, um (1) eine Adhäsion von lipophilen Schadstoffkomponenten an Gefäßwänden zu vermeiden und (2) ein Abdampfen von flüchtigen Schadstoffkomponenten zu unterbinden. Bei den im Doppelansatz durchgeführten Expositionen wurde jede 24 Well-Platte mit 20 Eiern (1 Ei / Flachbodenglas) bestückt, wobei jedes Flachbodenglas mit 2 ml Schadstofflösung befüllt war. Im Verlauf der Untersuchungen wurde täglich 1 ml der Schadstofflösung pro Well gewechselt; die Entwicklung der Embryonen und Jungfische erfolgte in Brutschränken bei 26° ± 1 C. Die Fischlarven wurden über einen Zeitraum von 96 h für den Early Life Stage-Test auf die in Tabelle 2.14.1 zusammengefassten Parameter unter dem Mikroskop untersucht.

Nach 120 Stunden wurden Jungfische eines jeden Ansatzes in Glasschalen (18 cm Ø), befüllt mit 200 ml Schadstoffgemisch, überführt und bis zum 12 Tag weiter exponiert. Alle 2 Tage wurde die Hälfte des Wassers (1/3 Kunstwasser (11,76 g CaCl₂ x H₂O ad 1 L a. bidest, 4,93 g Mg SO₄ x 7 H₂O ad 1 L a. bidest, 2,59 g NaHCO₃ ad 1 L a. bidest, 0,23 g KCl ad 1 L a. bidest; je Lösung 25 ml ad 1 L a. bidest.), 2/3 Aquarienwasser angereichert auf die entsprechende Schadstoffkonzentration) gewechselt.

Nach 120 Stunden wurden Jungfische eines jeden Ansatzes in Glasschalen (18 cm Ø), befüllt mit 200 ml Schadstoffgemisch, überführt und bis zum 12 Tag weiter exponiert. Alle 2 Tage wurde die Hälfte des Wassers (1/3 Kunstwasser , 2/3 Aquarienwasser mit entsprechenden Schadstoffkonzentration) gewechselt. Die Fütterung der Jungfische erfolgte mit frisch geschlüpften Artemien und dem Pulverfutter AZ 300 (Fa. Tetra, Melle).

Embryotoxizität. Jeweils 100 Eier wurden in Glasschalen (18 cm Ø), befüllt mit 200 ml Schadstoffgemisch, überführt und dem 0,1-fachen, 10-fachen, und 200-fachen PAH-Cocktail der mittleren Körskonzentration sowie einer Wasser- und Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO) bis zum 15. Entwicklungstag exponiert. Alle übrigen Parameter entsprechen den zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen. Erfasst wurden die Parameter Koagulation der Eier, Schlupfzeitpunkt, Behinderungen, Ödementwicklung und Tod.

2. Material und Methoden

Tab. 2.14.1 Erfasste Parameter zum Entwicklungsstand von Embryonen und Jungfischstadien des Zebrafisch (*Danio rerio*)

Endpunkt	24 h	48 h	72 h	96 h	bis 12 Tag
koagulierter Keim	+	--	--	--	--
Somitenanlage	+	+	--	--	--
Schwanzablösung	+	+	--	--	--
Herzschlag	+	+	--	--	--
Augenanlage	+	+	--	--	--
Blutkreislauf	+	+	+	--	--
Pigmentierung	--	+	+	--	--
Spontanbewegungen	--	+	+	+	--
Ödementwicklung	--	+	+	+	+
Schlupf	--	+	+	+	--
Missbildung	--	--	+	+	--
retardierte Entwicklung	--	+	+	+	+
Tod	--	+	+	+	+

3. Veränderungen in den Aktivitäten von Stoffwechsellzymen in Fischen unterschiedlich stark belasteter Gewässern nach Halbfreilandexposition zwischen 1995 und 1999

Biochemische Reaktionen in Leber und Gehirn von Bachforelle und Bachschmerle nach In vivo-Exposition im Bypass an Krähenbach und Körsch

Zusammenfassung: Über einen Zeitraum von 5 Jahren wurden Bachforellen und Bachschmerlen in unterschiedlichen Zeitintervallen unter Halbfreilandbedingungen an zwei unterschiedlich stark belasteten Modellgewässern und im Labor exponiert. Es wurden 13 ausgewählte Stoffwechsellzyme auf ihre Eignung als Biomarker überprüft. Aufgrund der Befunde zur Acetylcholinesterase im Gehirn der Testfische ist nicht von einer Kontamination mit Carbamaten und Organophosphaten der Gewässer auszugehen. Die Aktivitäten der Enzyme aus dem Energiestoffwechsel zeigten untereinander gute Korrelationen. Während sich Enzyme der Glykolyse und der Lipogenese mit einer ultrastrukturell nachgewiesenen Verschiebung der Energiespeicher von Glykogen zu Lipid korrelieren lassen, können erhöhte Aktivitäten in Enzymen des Citratzyklus aus einer Zunahme an Mitochondrien erklärt werden. Anhand der signifikanten Abweichungen relativ zur Laborreferenz können beide Gewässer klar auf den Grad ihrer Belastung differenziert werden, jedoch konnten Korrelationen zwischen den Biomarkerreaktionen und bestimmten Schadstoffklassen nicht aufgezeigt werden.

3.1 Einleitung

Eine der Hauptzielsetzungen der Ökotoxikologie ist es, Gefährdungspotentiale durch toxische Stoffe auf Ökosysteme, aber auch im zunehmenden Maß bei Nutzungsflächen oder Gewässern für uns Menschen, z. B. bei der Trinkwasserversorgung, aufzuzeigen. Zur Durchsetzung dieses Ziels wurden und werden immer wieder neue Biomarker untersucht, um

- die Sensitivität in der Detektion bereits etablierter Marker zu steigern und ggf. vorhandene Befunde zu bestätigen oder zu korrigieren,
- spezifische Marker für bestimmte Schadstoffbelastungen zu finden,
- kosten-, personal- und zeiteffiziente, aber dennoch aussagekräftige Marker zu erhalten.

Auf biochemischer Ebene waren es in den letzten Jahren v. a. Biotransformationsenzyme, die zur Erfassung von PAH- und PCB-Belastungen eingesetzt wurden (Behrens and Segner, 1999; Eggens *et al.*, 1995; Hektoen *et al.*, 1993; Klauning *et al.*, 1980; DiGiulio *et al.*, 1993; Lindström-Seppa *et al.*, 1989; Oost *et al.*, 1996; Otto, 1994; Stegemann *et al.*, 1987; Segner and Braunbeck, 1998; Soimasuo *et al.*, 1995). Eine zweite Gruppe bildeten die Cholinesterasen, um Belastungen durch Phosphorsäureester und Carbamate (Abiola *et al.*, 1991; Szabó *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 1997b; Sancho *et al.*, 2000; Sturm *et al.*, 2000a; Sturm *et al.*, 2000b) aufzuzeigen. Uneinheitliche Ansichten bestehen dagegen bereits in der Literatur hinsichtlich Markern zur Abschätzung und Erfassung von oxidativem Stress durch sauerstoffradikalbindende Enzymsysteme (Cajarville *et al.*, 1997; Mather-Mihaich and DiGiulio, 1991; Oost *et al.*, 1996; Regoli *et al.*, 1998; Winston, 1991; Winston and Giulio, 1991); klassische Stoffwechsellzyme wurden nur sporadisch in Biomarkeruntersuchungen aufgenommen.

In zahlreichen *In vivo* und *In vitro* Untersuchungen konnten unter Laborbedingungen bereits gute Erfahrungen bei der Erfassung von toxischen Wirkungen mit verschiedenen Stoffwechsellenzymen erzielt werden (Gill *et al.*, 1991; Braunbeck, 1994; Arnold *et al.*, 1995; Zahn *et al.*, 1996; Strmac and Braunbeck, 1999a). Unter Freilandbedingungen in Langzeituntersuchungen dagegen sind Erfahrungswerte und ist unser Wissen über das Verhalten und die Eignung vieler unspezifischer Stoffwechsellenzyme jedoch sehr begrenzt (Behrens and Segner, 1999; DiGiulio *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1991; Oost *et al.*, 1996; Strmac and Braunbeck, 1999; Vigano *et al.*, 1994; Zahn *et al.*, 1996).

In Kapitel 3.1 werden Befunde dargestellt, die im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes "Valimar" Veränderungen in den Aktivitäten ausgewählter Stoffwechsellenzyme in den einheimischen Fischarten Bachforelle und Bachschmerle untersucht wurden, wobei in erster Linie die Frage beantwortet werden soll: (1) inwieweit sich die ausgewählten Stoffwechsellenzyme als Biomarker zur Erfassung und Differenzierung von Schadstoffbelastungen in kleinen Fließgewässern eignen, und (2) inwieweit sich Befunde der Biochemie mit Befunden der ultrastrukturellen Untersuchungen korrelieren lassen. Die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden durch die Projektpartner der Universität Tübingen durchgeführt.

Untersucht wurde neben dem Gehirn v. a. die Leber, das zentrale Stoffwechselorgan für Auf- und Umbauprozesse (Arias *et al.*, 1988; Chambers and Yarbrough, 1976; Hinton, 1994; Personen *et al.*, 1987) physiologisch wichtiger Moleküle sowie die Entgiftung von Stoffwechselprodukten und Umweltgiften.

In einem 5-jährigen Untersuchungszeitraum wurden Bachforellen und Bachschmerlen über unterschiedliche Zeitintervalle an den Modellgewässern unter Halbfreilandbedingungen (Bypass-Systemen) und im Labor exponiert (vgl. Kap. 2.1) und insgesamt 13 verschiedene Stoffwechsellenzyme untersucht. Die Rohdaten der nachfolgend dargestellten Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Ergebnisse

Gehirn - Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase. Die Acetylcholinesterase im Gehirn von Bachforelle und Bachschmerle an der Körsch war im gesamten Untersuchungszeitraum überwiegend durch schwache bis mäßig verminderte Aktivitäten relativ zur Laborreferenz charakterisiert (Abb. 3.2.1). Tendenziell häuften sich signifikante Abweichungen bei beiden Fischarten v. a. während der Sommermonate Mai bis Juli. Am Krähenbach waren für die Bachschmerlen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bypass-exponierten Tieren und den Tieren des Labors festzustellen, dagegen konnten für die Bachforellen verminderte Aktivitäten ($p < 0,01$) im September '96 und Juli '97 beobachtet werden (Abb. 3.2.2). Zu induzierten Werten kam es bei den Bachforellen im Dezember '95 nach 21 Wochen Bypasshaltung sowie im November '97 und Mai '98 nach 24 bzw. 50 Wochen Exposition.

Analog zu den Acetylcholinesteraseaktivitäten erwiesen sich auch die Veränderungen der Aktivität der Cytochrom C Oxidase in den Bachschmerlen am Krähenbach gegenüber der

3. Ergebnisse und Diskussion

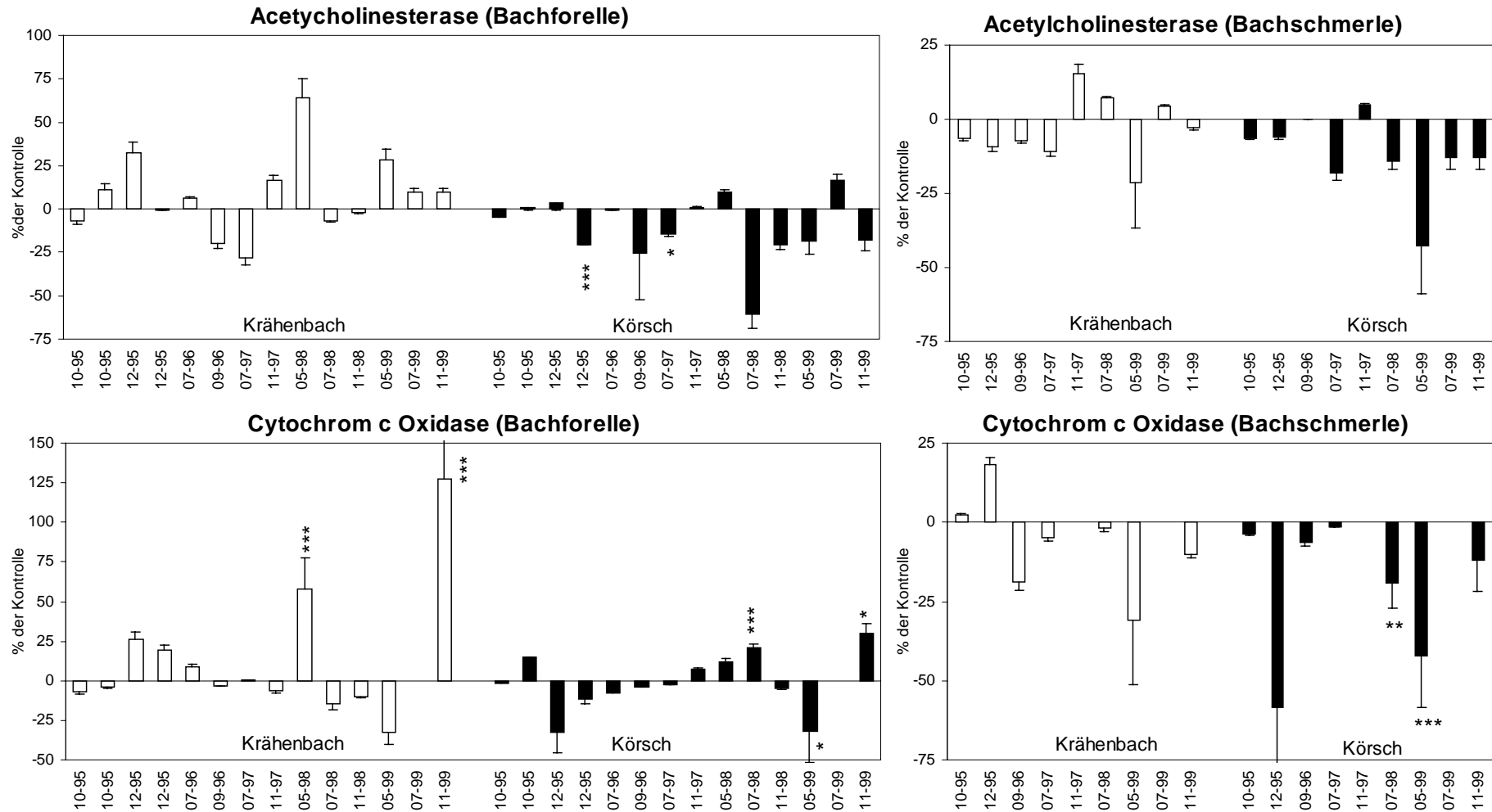


Abb. 3.2.1 Aktivitäten von Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase aus dem Gehirn von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse und Diskussion

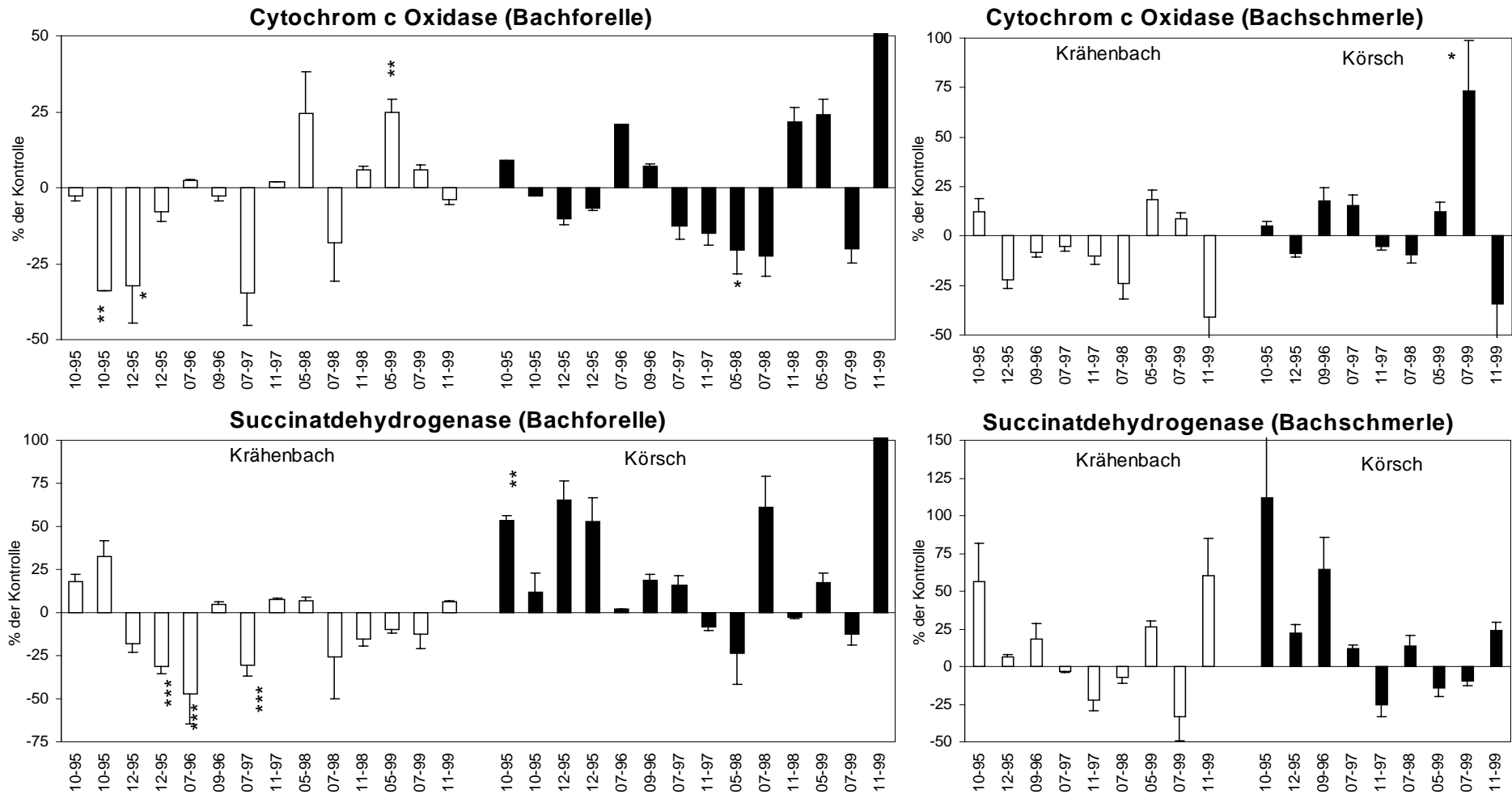


Abb. 3.2.2 Aktivitäten von Cytochrom C Oxidase und Succinatdehydrogenase aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse und Diskussion

Kontrolle als nicht signifikant; dagegen kam es v. a. im Dezember '95, Juli '98 und Mai '99 an der Körsch gegenüber dem Labor zu deutlich verminderten Aktivitäten von 30 - 60 %. Während durch die Bachforellen die reduzierten Aktivitäten an der Körsch im Dezember '95 und Mai '99 bestätigt wurden, ergab sich für den Juli-Wert '99 ein gegensätzlicher Trend (+ 25 %, $p < 0,05$). Als statistisch signifikant erwiesen sich die induzierten Aktivitäten im Dezember '95, Mai '98 und November '99 (+ 125 % Abb. 3.2.1).

Leber - Cytochrom C Oxidase, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase. An beiden Untersuchungsgewässern ergaben sich bei den Bachforellen auffallend gute Übereinstimmungen zwischen den Aktivitäten der mitochondrialen Citratsynthase (Citratzyklus) und dem Atmungskettenenzym Cytochrom C Oxidase (COX; Abb. 3.2.2; Abb. 3.2.3). Deutlich schwächer fielen dagegen Korrelationen zwischen der Citratsynthase und der ebenfalls im Citratzyklus lokalisierten Succinatdehydrogenase aus. Tendenzen bezüglich einer Korrelation zwischen Jahresgang bzw. jahreszeitlicher Gewässerbelastung und Enzymantwort konnten für die COX der Bachforellen nicht festgestellt werden. Auch in den Bachschmerlen zeigte die COX am Krähenbach tendenziell eher reduzierte Werte gegenüber der Laborkontrolle, ohne jedoch statistisch signifikant zu sein. Abweichungen an der Körsch erwiesen sich ebenfalls überwiegend nicht signifikant; lediglich im Juli '99 stieg die totale Aktivität auf 75 % ($p < 0,05$; Abb. 3.1.2).

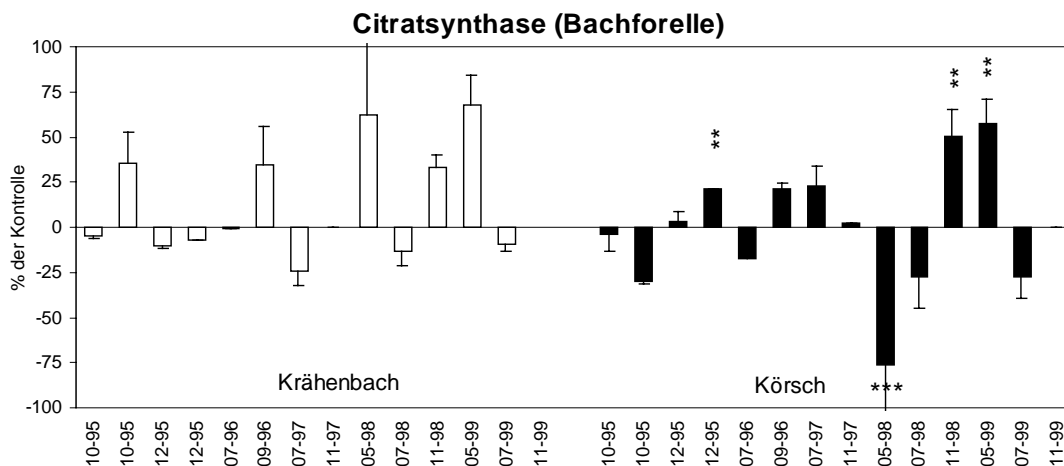


Abb. 3.2.3 Aktivitäten der Citratsynthase aus der Leber der Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Signifikant erhöhte Werte an Krähenbach und Körsch ergaben sich für die Citratsynthase. Im Mai '98 und Mai '99 stiegen am Krähenbach ebenso wie im November '98 und Mai '99 an der Körsch die Aktivitäten um mehr als 50 % an, dagegen sank die totale Aktivität an der Körsch im Mai '98 um 75 % unter den Referenzwert ab ($p < 0,001$; Abb. 3.2.3).

3. Ergebnisse und Diskussion

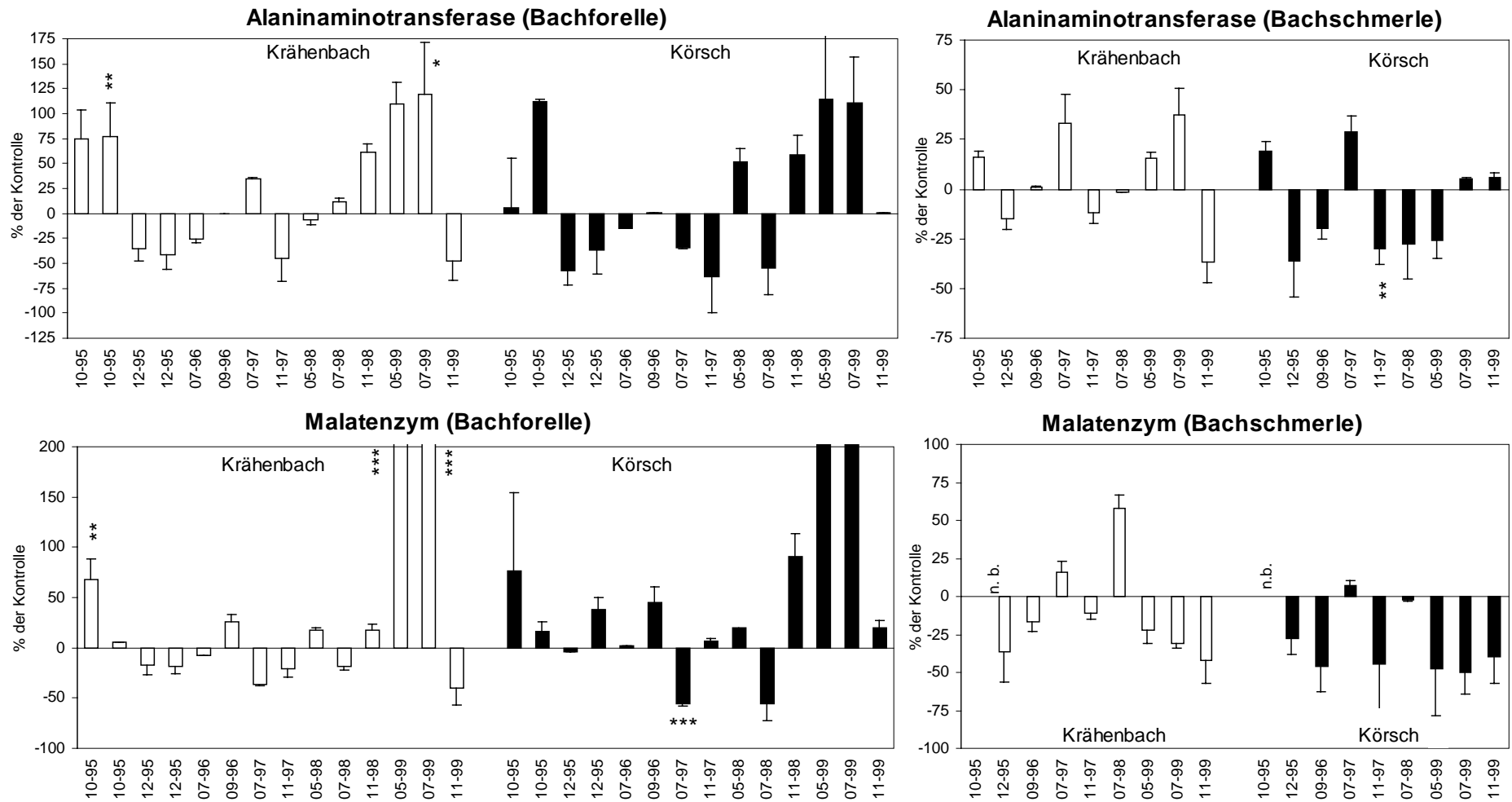


Abb. 3.2.4 Aktivitäten von Alaninaminotransferase und Malatenzym aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedlichen Skalierungen zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Succinatdehydrogenase zeigte keinen einheitlichen Trend: Während es am Krähenbach bei den Bachforellen überwiegend zu verminderten Aktivitäten gegenüber dem Labor kam, war die Aktivität an der Körsch überwiegend um 30 - 125 % erhöht (Abb. 3.2.3). Wenige Effekte zeigte die Succinatdehydrogenase der Bachschmerlen: Zu ausgeprägten Induktionen kam es am Krähenbach im November '99, an der Körsch im Oktober '95 und September '96 ($p < 0,05 - 0,001$).

Alaninaminotransferase und Malatenzym. Zahlreiche übereinstimmende Reaktionen waren für die Alaninaminotransferase und das Malatenzym zu beobachten: Beide Enzyme zeigten sich in den Bachforellen sehr variabel. Tendenziell waren Abweichungen von der Laborkontrolle an der Körsch stärker ausgeprägt. Dieser Befund wird auch bei den Bachschmerlen offenbar: Mehrheitlich kam es an der Körsch zu signifikant verminderten Aktivitäten sowohl gegenüber dem Krähenbach als auch gegenüber dem Labor (Abb. 3.2.4).

Erhöhte Enzymwerte v. a. an der Körsch zeichneten sich für das Malatenzym der Bachforellen ab, ohne jedoch eine Korrelation zur jahreszeitlichen Belastung erkennen zu lassen. Bei den Bachschmerlen zeigten sich die Werte des Malatenzyms an beiden Bypass-Standorten gegenüber dem Labor meist reduziert, wobei signifikante Abweichungen nur an der Körsch erreicht wurden (Abb. 3.2.4).

Esterase. Eine deutliche Unterscheidung der Modellgewässer erlaubten die Befunde der mikrosomalen unspezifischen Esterase. Bei den Bachforellen konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum an der Körsch ein durchgehender Aktivitätsrückgang von 30 - 80 % gegenüber dem Labor festgestellt werden. Auch am Krähenbach zeichnete sich ein Trend zu reduzierten Werten ab; nur im Juli '99 wurde der Laborwert um mehr als das 4,5-fache übertroffen (Abb. 3.2.5). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die Bachschmerlen aufgezeigt werden. Deutlich verringerte Aktivitäten an der Körsch standen nur leicht reduzierte Werte am Krähenbach gegenüber. Gegensätzliche Reaktionen zu den Bachforellen ergaben sich im Juli '97 und Juli '99, als die Esteraseaktivitäten am Krähenbach bei den Bachschmerlen stark erhöht (Juli '97) bzw. stark vermindert (Juli '99) waren (Abb. 3.2.5).

Phosphofruktokinase. Bei den Bachschmerlen ergaben sich an beiden Gewässern für die Phosphofruktokinase auffallend übereinstimmende Reaktionsmuster mit erhöhten Werten im September '96 und Juli '99 sowie verminderten Aktivitäten im Mai '99. Mehrheitlich erhöhte Werte erbrachte die Exposition der Bachforellen an der Körsch mit einem auffälligem Peak (+ 350 %) im Mai '99; im November '97 war die Aktivität dagegen deutlich reduziert ($p < 0,001$). Am Krähenbach konnten signifikant erhöhte Werte im Oktober '95, September '96 und Mai '99 beobachtet werden (Abb. 3.2.5).

Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase. Deutliche Übereinstimmungen traten auch bei beiden Fischarten in den Reaktionsmustern von Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase auf: Beide Enzyme zeigten im gesamten Untersuchungszeitraum an den Bypass-Standorten überwiegend erhöhte Aktivitäten, die v. a. in den Frühsommermonaten auffällig waren.

3. Ergebnisse und Diskussion

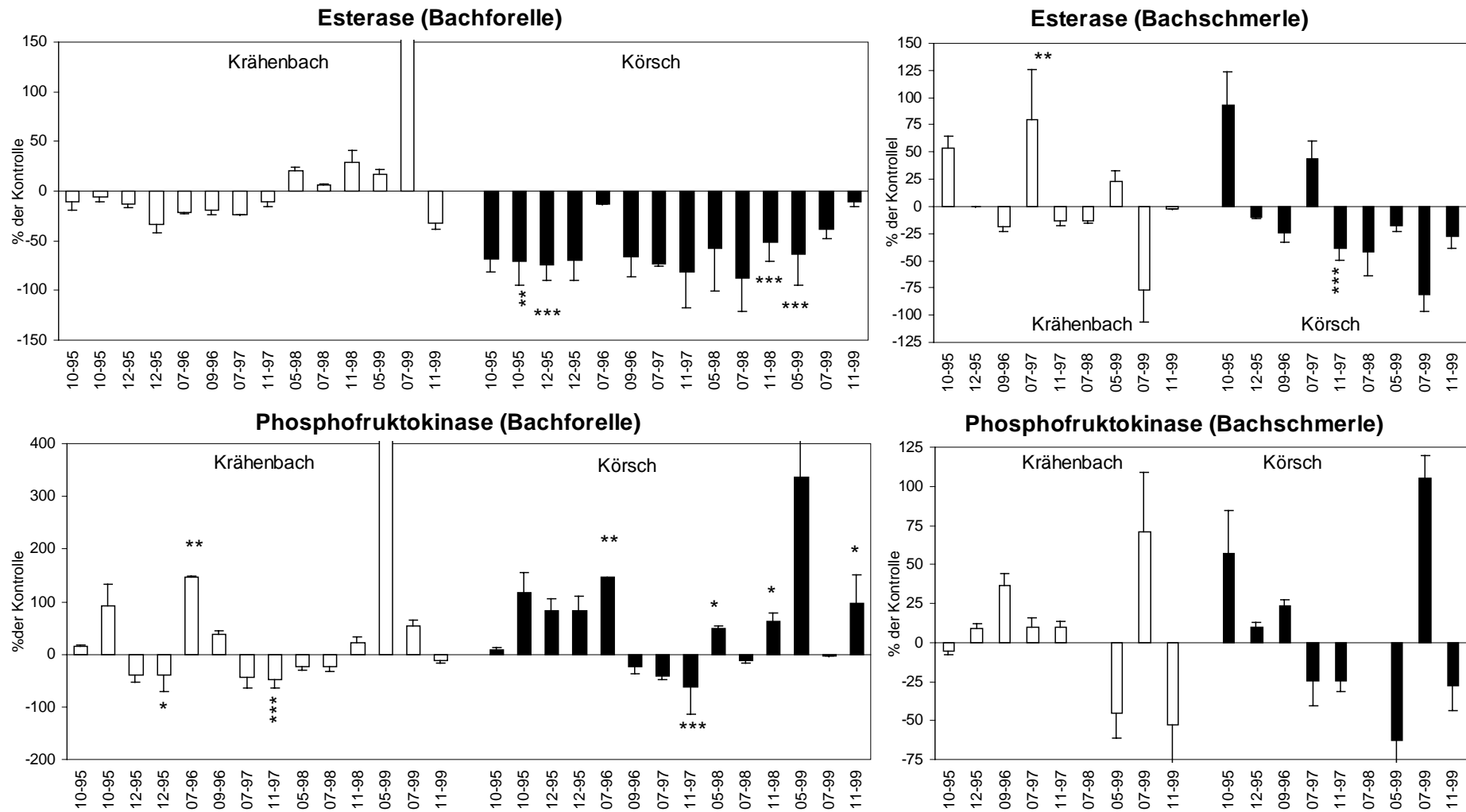


Abb. 3.2.5 Aktivitäten von Esterase und Phosphofruktokinase aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedlichen Skalierungen zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse und Diskussion

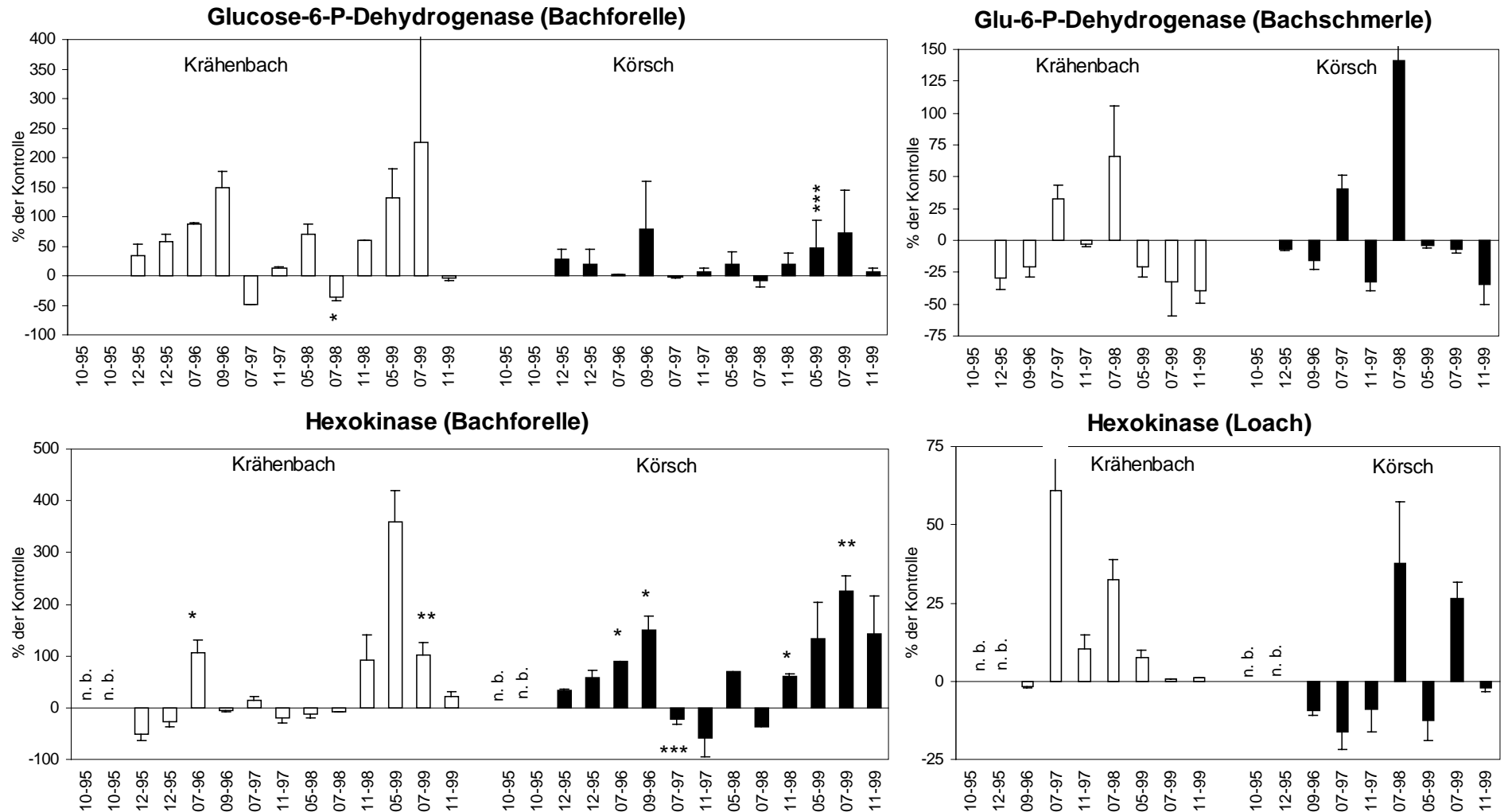


Abb. 3.2.6 Aktivitäten von Glucose-6-P-Dehydrogenase und Hexokinase aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse und Diskussion

Dennoch konnten in den Julimonaten '98, '99 gegenüber der Kontrolle an der Körsch verminderte Aktivitäten um ca. 50 % nachgewiesen werden (Abb. 3.1.6). Signifikant erhöhte Werte beschränkten sich am Krähenbach bei den Bachforellen auf Juli '96, November '98, Mai '99 und Juli '99, während bei der Glucose-6-P-Dehydrogenase deutliche Peaks im Mai und Juli '99 zu beobachten waren.

Uneinheitlich zeigten sich die Werte von Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase bei den Bachschmerlen. V. a. in den Julimonaten erreichte die Aktivität der Hexokinase signifikant höhere Werte (Abb. 3.2.6), während die Aktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase an Aich und Körsch mehrheitlich verringert war. Lediglich im Juli '98 war die Aktivität an beiden Bypass-Standorten signifikant erhöht (60 - 140 %).

Saure Phosphatase, Katalase und Superoxiddismutase. Deutliche Korrelationen ließen sich zwischen der Superoxiddismutase und der Katalase an der Körsch für Bachforelle und Bachschmerle erkennen. Die Unterschiede zwischen den Labortieren und Halbfreilandtieren fielen bis auf einen deutlichen Peak (+ 125 %) der Bachforellen im November '99 gering aus (Abb. 3.2.7).

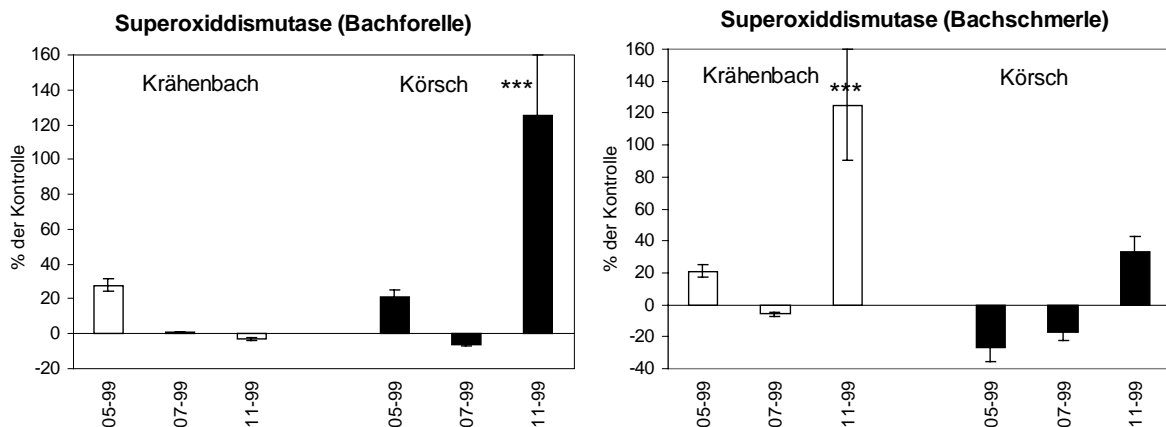


Abb. 3.2.7 Aktivitäten der Superoxiddismutase aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach bis mässig belasteten Krähenbach und der stark Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ein einheitlicher Trend konnte für die Katalaseaktivität der Bachforellen nicht festgestellt werden. Dennoch zeigte sich, dass v. a. in den Julimonaten die Aktivitätswerte an der Körsch signifikant vermindert waren. Deutlich erhöhte Werte konnten dagegen im November '99 und am Krähenbach im November '98 mit 125 % bzw. 40 % aufgezeigt werden (Abb. 3.2.8). Signifikante Abweichungen von der Laborkontrolle traten bei den Bachschmerlen (Krähenbach) nicht auf, während an der Körsch signifikante Werte nur in den Julimonaten '97 - '99 zu beobachten waren (Abb. 3.2.8).

3. Ergebnisse und Diskussion

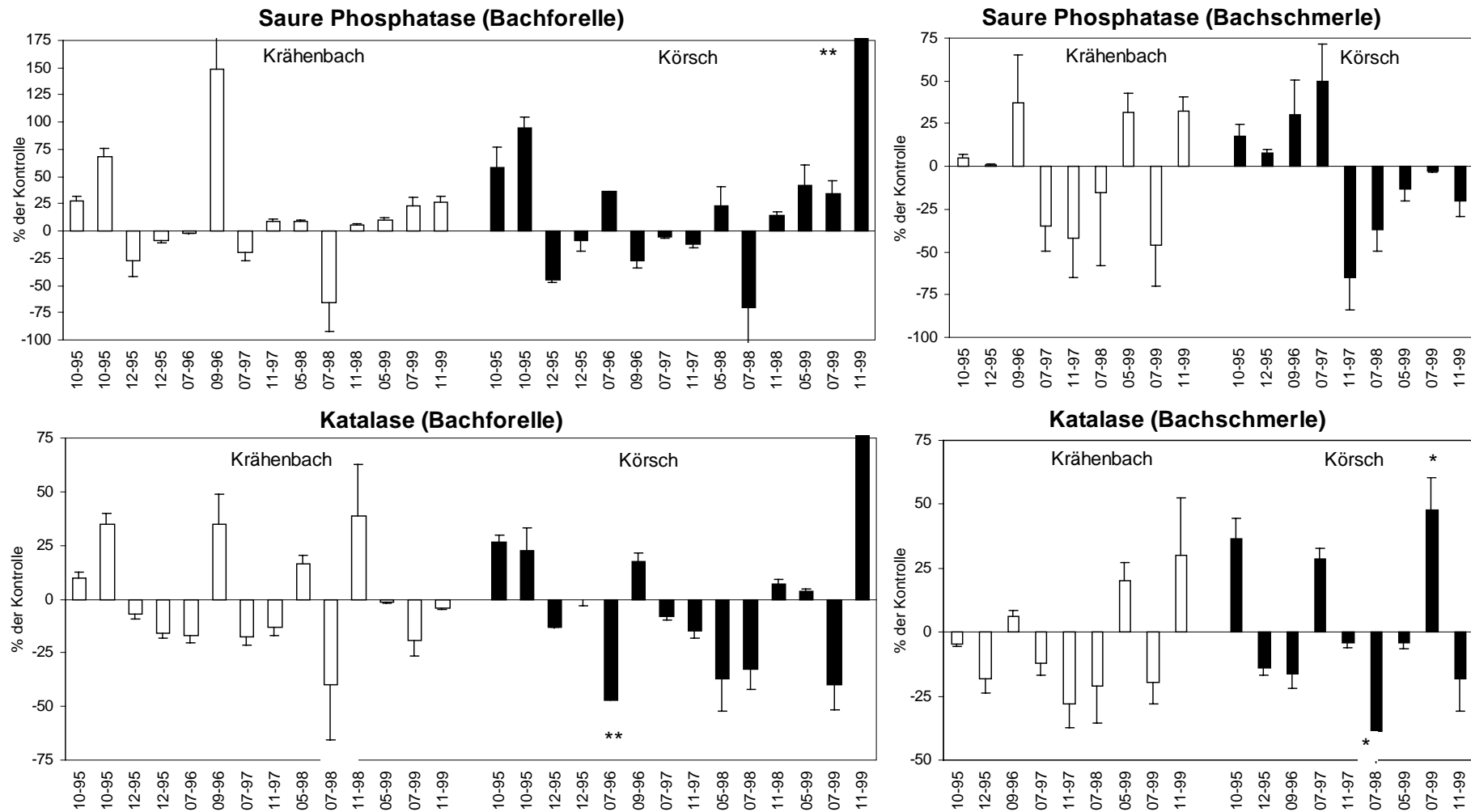


Abb. 3.2.8 Aktivitäten von Saurere Phosphatase und Katalase aus der Leber von Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem schwach belasteten Krähenbach und der stark belasteten Körsch im Vergleich zur Laborhaltung. Beachte die unterschiedlichen Skalierungen zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Uneinheitliche Befunde ergaben sich für die Saure Phosphatase sowohl im Vergleich zwischen beiden Fischarten als auch zwischen den Untersuchungsgewässern. Wiederum waren die stärkeren und häufigeren Abweichungen an der Körsch zu finden. Während bei den Bachforellen lediglich im Juli '98 am Krähenbach ein deutlicher Aktivitätsrückgang (-65 %) zu beobachten war, ergaben sich bei den Bachschmerlen als signifikante Unterschiede nur Abnahmen der Aktivitäten ($p < 0,05 - 0,01$; Abb. 3.2.8).

Differenzierung der Modellgewässer - formale Analyse. Zur weiteren Differenzierung zwischen den Modellgewässern auf Basis der biochemischen Veränderungen wurden die signifikanten Abweichungen von den Kontrollwerten in einer formalen Analyse ausgewertet: Im ersten Schritt wurden alle signifikanten Abweichungen unabhängig vom erreichten Signifikanzniveau summiert (numerisch); in einem zweiten Schritt wurden die erreichten Signifikanzwerte berücksichtigt mit: $p < 0,05 = 1$ Punkt, $p < 0,01 = 2$ Punkte und $p < 0,001 = 3$ Punkte (gewichtete Auswertung).

Die in Tabelle 3.1.1 zusammengefassten Daten zeigen, dass zwischen den Modellgewässern hinsichtlich ihres Belastungszustandes klar differenziert werden kann: Betrachtet man die Bewertung als Summenparameter für die Wasserqualität der Modellgewässer, so zeigt die Körsch ein deutlich höheres Potential, schwerwiegende Veränderungen auf biochemischer Ebene in den Organismen zu induzieren. Dennoch zeigt auch der Krähenbach ein gewisses Induktionspotential, physiologische Veränderungen hervorzurufen, obwohl die ausgelösten Reaktionen deutlich schwächer als an der Körsch ausfallen.

Unterschiede zwischen den Arten

Trotz Berücksichtigung der geringeren Beprobungszahlen der Bachschmerlen im Vergleich zu den Bachforellen, erwiesen sich die Bachforellen als sensitivere für die Gewässerbelastungen. Dennoch liegt die Brauchbarkeit der beiden Fischarten zur Differenzierung beider Modellgewässer bei beiden Arten eng beieinander, wie der Quotient aus den Abweichungen Krähenbach/Körsch mit Werten zwischen 0,51 - 0,65 erkennen lässt (Tab. 3.2.1).

3. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 3.2.1 Summe signifikanter Abweichungen von der Kontrolle in den Aktivitäten verschiedener Stoffwechselenzymen aus Bachforelle und Bachschmerle nach Exposition unter Halfreilandbedingungen an den unterschiedlich stark belasteten Fließgewässern Krähenbach und Körsch

	Krähenbach	Körsch	Quotient Krähenbach /Körsch
Bachforelle			
numerisch *	65	95	0,62
gewichtet **	119	181	0,65
Bachschmerle			
numerisch	16	29	0,64
gewichtet	25	49	0,51
Beide Arten			
numerisch	81	124	0,65
gewichtet	144	230	0,62

*numerische Anzahl der Abweichungen von der Kontrolle: Anzahl der Abweichungen ist unabhängig vom Signifikanzniveau ist. ** Gewichtete Anzahl von Abweichungen gegenüber der Kontrolle: $p < 0.05 = 1$ Punkt, $p < 0.01 = 2$ Punkte, $p < 0.001 = 3$ Punkte.

3.3 Diskussion

Die Akkumulation von Umweltchemikalien hat direkten Einfluss auf die Physiologie und den Metabolismus von Organismen. Hauptangriffspunkt von Xenobiotica stellt zunächst die einzelne Zelle als kleinste lebende Einheit dar, bevor auf höherer trophischer Ebene Organschädigungen eintreten (Braunbeck, 1994; Hinton, 1994) (vgl. Kap.1.0). Derartige Veränderungen lassen sich auf zellulärer und organspezifischer Ebene durch verschiedene Biotests nachweisen (Moore, 1985). Darüberhinaus geht die Exposition gegenüber Schadstoffen in Organismen mit einem erhöhtem Energiebedarf für die Aufrechterhaltung der Physiologie, der Reparatur von Schädigungen sowie Entgiftungsprozessen einher (Calow, 1991; Wilson *et al.*, 1994a; Wilson *et al.*, 1994b), so dass das Monitoring bestimmter Schlüsselenzyme im Stoffwechsel konkrete Hinweise auf die Effekte von Giftstoffen liefert.

Über einen Zeitraum von 5 Jahren wurden Bachforellen und Bachschmerlen unter Halfreilandbedingungen an den unterschiedlich belasteten Gewässern Krähenbach und Körsch exponiert und das Induktionsverhalten ausgewählter Stoffwechselenzyme auf die subletale Belastung untersucht. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit sich die hervorgerufenen Veränderungen im Stoffwechseln als Biomarker für die Gewässerbelastung eignen.

Die Aktivitäten der Acetylcholinesterase (ACHE) aus dem Gehirn der Versuchstiere in den Bypass-Systemen zeigte bei den Bachschmerlen lediglich an der Körsch im Mai '99 eine um 50 % reduzierte Aktivität gegenüber der Laborreferenz. Bei den Bachforellen konnten vereinzelt induzierte Aktivitäten am Krähenbach nachgewiesen werden, während signifikante Abweichungen an der Körsch ausschließlich verminderte Enzymaktivitäten betrafen. Die Hemmung von Cholinesterasen, darunter auch die der ACHE, um mehr als 50 - 80 % gilt als typi-

scher Indikator für die Toxizität von Organophosphaten und Carbamaten (Abiola *et al.*, 1991; Bocquené *et al.*, 1995; Fernandez-Vega *et al.*, 1999; George, 1995; Hughes *et al.*, 1997; Lundbye *et al.*, 1997; Pavlow *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 1997b; Sturm *et al.*, 2000b; Szabó *et al.*, 1992). Eine Kontamination der Modellgewässer mit Organophosphaten und Carbamaten wurde durch die chemische Analyse nicht bestätigt, so dass eine Hemmung der ACHE nicht zu erwarten war. Dennoch zeigen Screening-Tests der US-Umweltschutzbehörde, dass auch Schwermetallverbindungen wie z.B. AgNO₃, CdCl₂, CuCl₂ oder Organohalogen-Pestizide wie Dieldrin und andere zumindest in *In vitro*-Testsystemen zu deutlichen Hemmungen der ACHE im ng/L-Bereich führen (Christensen *et al.*, 1982). Schwermetalle, wie Cadmium- oder Kupfer-Verbindungen, könnten auch an der Körsch für reduzierte ACHE-Aktivitäten verantwortlich gemacht werden.

Die Reaktionen des mitochondrialen Atmungskettenenzym Cytochrom C Oxidase (COX) in Leber und Gehirnlassen organspezifische Unterschiede bei den Testfischen erkennen. Signifikante Veränderungen im Gehirn der Bachforellen zeigten sich am Krähenbach überwiegend in einer erhöhten Aktivität, während an der Körsch keine Tendenzen abzuleiten waren. Die Aktivitäten im Gehirn der Bachschmerlen wiesen eindeutig einen Trend zur Hemmung auf, der sich auch in der Leber der Bachforellen widerspiegelte. Untersuchungen von (Braunbeck and Völkl, 1991) ergaben für die COX nach Dinitro-*o*-Kresol (DNOC)-Belastung von Aalen mit Konzentrationen >5 µg/L eine signifikante Induktion der totalen Aktivität; die spezifische Aktivität blieb dagegen unverändert. Die Induktion der COX als Enzym der Atmungskette kann als Hinweis für einen erhöhten Energiebedarf in Form von ATP angesehen werden, da gerade die oxidative Phosphoylierung der Atmungskette den Hauptlieferanten von zellulärem ATP darstellt.

Abweichungen von den Kontrollwerten in der Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH), aber auch der Citratsynthase (CS), deuten auf Veränderungen im Metabolismus des mitochondrialen Citratzyklus hin. Die Exposition am Krähenbach führte bei beiden Fischarten zu überwiegend verringerten, an der Körsch jedoch überwiegend zu erhöhten Werten der SDH. Auch die Aktivität CS war an beiden Bypass-Standorten überwiegend erhöht, wobei die Reaktionen in den Maimonaten am deutlichsten ausfielen. Die SDH erwies sich dabei als das Enzym mit dem konstanteren Induktionsverhalten, so dass die erhöhten SDH-Aktivitäten mit der ultrastrukturell nachgewiesenen der Zunahme von Mitochondrien korreliert werden können (Schramm *et al.*, 1998; Schramm *et al.*, 1996; Triebkorn *et al.*, 1996a).

Die mikrosomale Esterase erwies sich von den ausgewählten Stoffwechsellenzymen als der Marker mit der besten Differenzierung zwischen den Untersuchungsgewässern. Der Anteil an den Gesamtabweichungen betrug bei den Bachforellen am Krähenbach 5 % während es an der Körsch sogar 15 % waren (Abb. 3.3.1). Signifikant verringerte Aktivitäten traten am Krähenbach nur sporadisch auf; dagegen kam es an der Körsch in beiden Fischarten über den Untersuchungszeitraum zu massiven Aktivitätsminderungen. Effekte traten bei der Bachforelle kontinuierlicher und auch ausgeprägter in Erscheinung als bei der Bachschmerle.

3. Ergebnisse und Diskussion

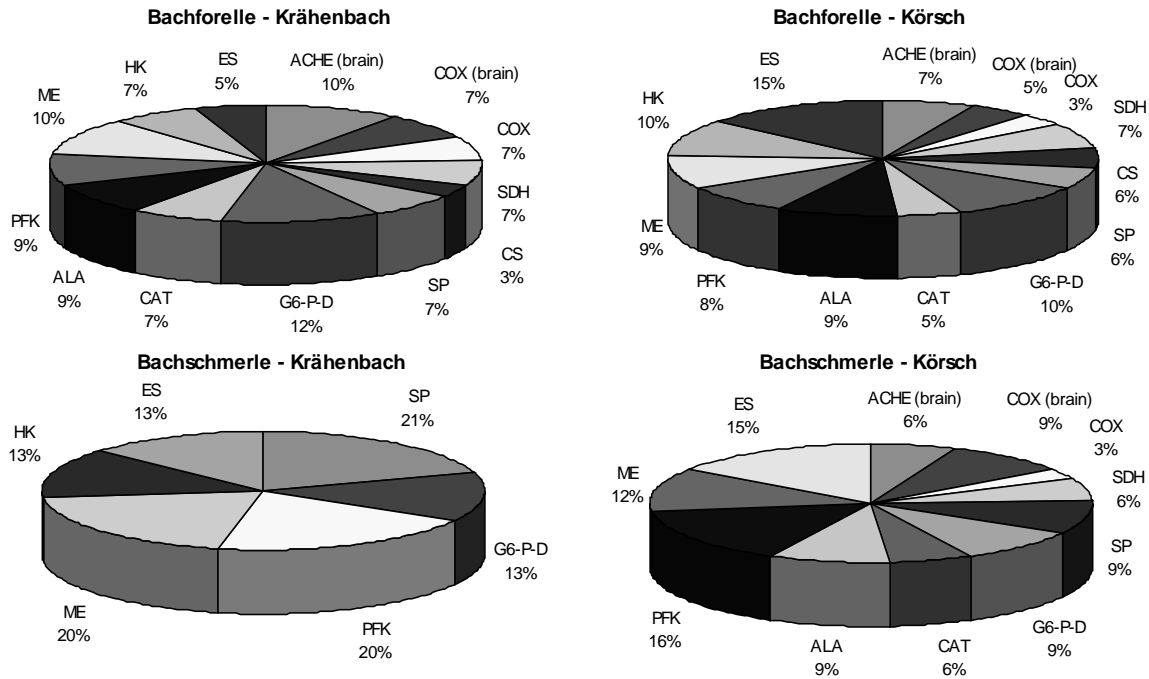


Abb. 3.3.1 Prozentualer Anteil der Enzyme an der Gesamtzahl der signifikanten Abweichungen an den jeweiligen Beprobungsstandorten gegenüber dem Laborreferenzwert.

Legende: AAT Alaninaminotransferase, ACHE Acetylcholinesterase, COX Cytochrom C Oxidase, CS Citratsynthese, Cat Katalase, ES Esterase, G6PD Glucose-6-P-Dehydrogenase, HK Hexokinase, ME Malatenzym, PFK Phosphofruktokinase, SDH Succinatdehydrogenase, SP Saure Phosphatase

Die Carboxylesterase gehört zur großen Gruppe der B-Esterasen, die dadurch charakterisiert sind, dass sie Carboxylester, Thioester oder Arylamide hydrolysieren und damit wichtige Funktionen im Metabolismus von Xenobiotika, der Carcinogenese, der Entgiftung und auch der Potenzierung toxischer Effekte innehaben (Aldrige *et al.*, 1953; Huang, *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Kaur *et al.*, 1983; Mentlein *et al.*, 1987; Mentlein *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu A-Esterasen werden sie selbst jedoch durch Organophosphorsäureester phosphoryliert und damit inaktiviert. Dennoch besteht eine Substanz- und Substratspezifität, wie folgende Beispiele verdeutlichen: Ohne Wirkung blieb die Verabreichung von Benzo(a)pyren und Methylcholanthren, zwei PAHs, die regelmäßig in der Körsch gefunden wurden, auf die Aktivität verschiedener Carboxylesterasen in der Leber von Ratten (Kaur and Ali, 1983), dagegen konnte eine gesteigert katalytische Aktivität sowohl durch Phenobarbital bei Ratten (Kaur and Ali, 1983) als auch durch DNOC (s.o) bei Aalen (Braunbeck and Völkl, 1991) nachgewiesen werden. Die nahezu dauerhafte Inhibierung dieses membrangebundenen Enzyms an der Körsch könnte im Zusammenhang mit ultrastrukturell beobachteten Membranschädigungen infolge einer erhöhten Lipidperoxidation (Triebskorn *et al.*, 1996a; Triebskorn *et al.*, 1997b) stehen. Eine erhöhte Lipidperoxidation konnte (Strmac, 2000; Strmac and Braunbeck, 1999b) an isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit verschiedenen Sedimentfraktionen der Körsch zeigen. Andererseits bestätigen *In vitro*-Untersuchungen von (Huang *et al.*, 1997), dass Schwermetalle wie Quecksilber, aber auch Cadmium und Blei, die an der Körsch tatsächlich nachgewiesen werden konnten, in Konzentrationen von $\mu\text{g/L}$ bis mg/L die Aktivitäten der Carboxylesterasen um 30 - 60 % hemmen können. Befunde der *In vitro*-Untersuchungen mit nativem Körschwasser, die

3. Ergebnisse und Diskussion

zu induzierten Werten führten, stehen im gewissem Widerspruch zu den *In vivo*-Daten, jedoch nahm die Zahl der Übereinstimmungen beim Vergleich mit Porenwasser bzw. acetonischem Sedimenteluaten aus der Körsch mit den *In vivo*-Daten deutlich zu (Strmac, 2000).

Keinen eindeutigen Trend ließ in den Bachforellen die Aktivität der Alaninaminotransferase (ALA) erkennen, während sich bei der Bachschmerle ein Trend zu verringerten Aktivitäten abzeichnete. Generell stellt die im Proteinabbau durch Transaminierung von Aminosäuren involvierte ALA ein Enzym des energiebereitstellenden Leberstoffwechsels dar (Begum and Vijayaraghavan, 1995; Oikari and Jiminez, 1992; Reddy *et al.*, 1991). Ein erhöhter Proteinabbau zugunsten der Bereitstellung von Stoffwechselenergie ließ sich aus den Daten der Halbfreilandexpositionen jedoch nicht ableiten. In isolierten Hepatocyten induzierten sowohl natives Körschwasser als auch Sedimenteluate die Aktivitäten der ALA, während Krähenbacheluete mehrfach auch zu reduzierten Aktivitäten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen führten (Strmac, 2000). Damit werden die *In vivo*-Daten der Bachschmerlen (Krähenbach) für die ALA durch die *In vitro*-Daten bestätigt.

In toxikologischen Untersuchungen spielten Enzyme des Energiestoffwechsels bisher eine eher untergeordnete Rolle; dennoch können sie als Ergänzung zu ultrastrukturellen Untersuchungen wichtige Informationen zum physiologischen Zustand von Organismen liefern. Insgesamt ergaben sich zwischen den am Kohlenhydrat-, Fettstoff- und Citratstoffwechselstoffwechsel beteiligten Enzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase, Glu-6-P-Dehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Malatenzym gute bis sehr gute Korrelationen. Während am Krähenbach nur vereinzelt eine erhöhte Glykolyseaktivität, indiziert durch die Phosphofruktokinase (PFK), einsetzte, zeichnete sich an der Körsch eine deutlich gesteigerte Glykolyseaktivierung ab, die über die Pyruvateinspeisung in den Citratzyklus eine erhöhte Lipogenese vermuten lässt. Tatsächlich zeigte auch die zum Citratzyklus gehörende Succinatdehydrogenase (SDH) eine positive Korrelation. Ferner waren die Aktivitäten der Glucose-6-P-Dehydrogenase (G6PDH) und das Malatenzym (ME) erhöht. Während die G6PDH über den Pentose-Phosphatweg für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH für die Lipidsynthese sorgt, katalysiert das ME in einem Nebenzyklus, der Acetyl-CoA aus den Mitochondrien für die Fettsynthese ausschleust, die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat, welches wieder ins Mitochondrium zurück diffundiert.

Die erhöhten Aktivitäten der PFK, SDH, G6PDH und ME korrelieren mit Befunden der Ultrastruktur, die eine Verschiebung der zellulären Energiespeicher von Glykogen zu Lipideinlagerungen beschreibt (Triebkorn *et al.*, 1996a) Unter der Voraussetzung, dass bei der Glykolyse vorwiegend auf Glykogenspeicher zurückgegriffen wird, muss auf der anderen Seite zur Aufrechterhaltung von Glykogenfeldern, wie sie ultrastrukturell neben den Lipideinlagerungen zu finden waren, auch eine erhöhte Glykogen-Neusynthese gesteuert sein, was mit der Steigerung der Hexokinaseaktivität bei den Bachforellen in Verbindung gebracht werden kann. Hexokinase phosphoryliert Glucose zu Glucose-6-Phosphat, welches überwiegend in die Glykoneogenese einfließt. In Ratten führte die wiederholte orale Verabreichung von Lindan, welches in der Körsch das am weitesten verbreitete Pflanzenschutzmittel darstellt, zu keinen Veränderungen der G6PDH (Junqueira *et al.*, 1986). Dagegen konnten (Arnold, 1995)

3. Ergebnisse und Diskussion

mit dem Pflanzenschutzmittel Disulfoton an Aalen (*Anguilla anguilla*) deutlich G6PDH- und SDH-Werte induzieren, während die Aktivitäten des ME nur schwach betroffen waren. Cadmium dagegen induzierte bereits nach 15 Tagen Exposition beim indischen Katzenwels (*Heteropneustes fossilis*) erhöhte Hexokinasewerte (Sastry and Subhadra, 1985).

Ultrastrukturell konnten nur geringfügige Veränderungen in den Lysosomen beider Fischarten zwischen den Expositionsgewässern und dem Labor gefunden werden (Triebskorn *et al.*, 1996a). Dieser Befund lässt sich bei den Bachforellen durch die Daten zu Veränderungen der lysosomalen Sauren Phosphatase weitgehend bestätigen. Reaktionen dieses Enzyms hatten am Krähenbach ebenso wie an der Körsch nur sporadischen Charakter. Bei den Bachschmerlen hingegen gab es einen uneinheitlichen Trend zu verminderten Aktivitäten. Unterstützung finden die Daten durch Untersuchungen von (Strmac, 2000), die in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit unterschiedlichen Sedimentfraktionen aus den Modellgewässern ebenfalls nur ein sehr uneinheitliches Bild zur Induktion der Sauren Phosphatase feststellen konnten.

In gewissem Widerspruch befinden sich die Befunde zur peroxisomalen Katalase und dem ultrastrukturell vermehrten Auftreten von Peroxisomen durch (Triebskorn *et al.*, 1997b) in Tieren von Krähenbach und Körsch. Während die Ergebnisse zwischen Superoxiddismutase und Katalase gut harmonieren, spiegelt sich die Zunahme an Peroxisomen nicht in einer gesteigerten katalytischen Aktivität der Katalase wider; im Gegenteil, die Aktivitäten waren tendenziell reduziert, was nicht auf eine Zunahme von intrazellulärem Stress hindeutet. Oxidativer Stress entsteht als Folge von Oxidationsprozessen, die zu einem Anstieg von O_2^- -Radikalen führen können. Durch das Enzym Superoxiddismutase werden diese Radikale in H_2O_2 überführt ($O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$), um durch Katalase weiter in H_2O und $\frac{1}{2} O_2$ abgebaut zu werden (Aknes and Njaa, 1981; Bairy *et al.*, 1996; Cajarville *et al.*, 1997; Gabryllak, 1983; Labrot *et al.*, 1996; Livingstone *et al.*, 1994; Mather-Mihaich, 1986; Mather-Mihaich and DiGiulio, 1991; Otto *et al.*, 1994; Regoli *et al.*, 1998; Scott and Harrington, 1990; Stephensen *et al.*, 2000; Winston, 1991; Winston and Giulio, 1991). Die *In vitro*-Untersuchungen von Sediment- und Wasserproben führten ebenfalls zu erhöhten Katalaseaktivitäten (Strmac, 2000).

Der Vergleich zwischen Ergebnissen der *In vivo*- und *In vitro*-Untersuchungen sollte jedoch mit Vorsicht geführt werden, da ein wesentlicher Unterschied neben dem Wesen der Systeme im Expositionszeitrahmen liegt. Während es sich bei den *In vitro*-Versuchen um Induktionsantworten nach kurzzeitigen Belastungen handelte, lag unter Halbfreilandbedingungen eine chronische Belastung vor, bei der Reaktionen auf die Belastung durch Adaptionsprozesse möglicherweise überlagert wurden (vgl. Kap. 5.3). Adaptionsprozesse können auch der Grund dafür sein, dass direkte Rückschlüsse aus ultrastrukturellen Befunden auf die Biochemie und die Physiologie der Tiere nicht immer gezogen werden können. Beispielsweise konnte auch (Braunbeck and Völkl, 1991) in der Belastungsstudie von Aalen mit Dinitro-*o*-Kresol eine Zunahme von Peroxisomen in der Leber beobachten, obwohl ein signifikanter Anstieg der Katalase in zwei von drei (darunter der höchsten) Konzentrationen ausblieb. Einen Schritt weiter geht (Oost *et al.*, 1996), der nach Freilanduntersuchungen von mit PAHs und PCBs belasteten Gewässern um Amsterdam in Aalen ebenfalls keine Induktion der Katalase nachweisen konnte und den Wert der Katalase als zuverlässigen Biomarker in Frage stellt. In eine

ähnliche Richtung weisen Befunde von Bucher, 1990; Bucher and Hofer, 1990, die eine Korrelation zwischen Enzymwerten und ultrastrukturellen bzw. histopathologischen Befunden nicht immer finden konnten (Casillas *et al.*, 1985a).

Die formale Analyse der Gesamtdaten unabhängig von der Richtung der signifikanten Abweichung eines jeden Biomarkers gegenüber dem Referenzwert gestattete eine klare Differenzierung der Gewässer mit einem eindeutig höheren Belastungspotential an der Körsch. Markerantworten traten an der Körsch im Vergleich zum Krähenbach/Aich-System häufiger und sehr viel stärker auf. Dennoch traten auch am Krähenbach Abweichungen auf, die Hinweise auf eine gewisse unregelmäßige Kontamination geben. Die Befunde zu den Stoffwechsellenzymen werden durch die chemischen Analysedaten der Modellgewässer bestätigt.

Artvergleich. Auf der einen Seite sollen Biomarker selbst geringe Giftwirkungen in den Gewässern anzeigen, auf der anderen Seite auch Auskunft über das Ausmaß der Reaktion geben. Dieses Ziel sollte durch die differenzierte Betrachtung der Daten aus gewichteten und numerischen Abweichungen erreicht werden. Beide Fischarten erreichten auf der Basis der **numerischen Differenzierung** der Gewässer ein vergleichbares Ergebnis, wie der Quotient aus den Gesamtabweichungen des Krähenbachs und der Körsch mit Werten von 0,62 und 0,64 belegt. Die Abb. 3.3.1 zeigt zudem, dass am Krähenbach bei den Bachschmerlen lediglich 6 Enzyme zur Detektierung der Gewässerbelastung beitrugen. Ähnliches gilt für die Körsch, bei der zwar für die meisten Enzyme vergleichbare Werte zwischen beiden Fischarten vorliegen, jedoch blieben bei den Bachschmerlen die Enzyme Hexokinase und Citratsynthase ohne Beitrag. Der prozentuale Anteil eines jeden Enzyms an der Differenzierung der Gewässer ist in Abb. 3.3.1 dargestellt. Bei einem rechnerisch durchschnittlichen Indikatorwert von ca. 7,7 % (100 %/Anzahl der Marker) erwiesen sich die Enzyme COX aus Gehirn und Leber, CS und Katalase als die schwächsten Indikatoren im Hinblick auf die Differenzierung zwischen Krähenbach und Körsch.

Bei der **gewichteten Differenzierung** erwiesen sich die Bachforellen als die sensitivere Art. Dies spiegelte sich in einer meist stärkeren Reaktion und nicht zuletzt auch in einer größeren statistischen Empfindlichkeit wider. Die höherer Empfindlichkeit floss bei der Gewichtung der Abweichungen ein, so dass der Quotient aus Gesamtabweichungen am Krähenbach und der Körsch mit 0,62 (Bachforelle) gegenüber 0,51 (Bachschmerle) eindeutig zugunsten der Bachforellen ausfiel.

Schlussfolgerungen.

- Im Gesamtkontext der Untersuchungen lieferten die Stoffwechsellenzyme Hinweise zur Aktivierung bzw. Hemmung bestimmter Stoffwechselwege, die zusammen mit ultrastrukturellen Ergebnissen eine elementare Säule in der ökotoxikologischen Bewertung und Differenzierung der Gewässer darstellt. Eine direkte Korrelation zwischen Schadstoffbelastung und Enzymaktivität kann nur in einzelnen Fällen aufgezeigt werden. Die Aktivitäten, v. a. die der Stoffwechsellenzyme, die in zusammenhängende Kreisläufe des Metabolismus eingebunden sind, wie HK, G6PDH, SDH, ME, ALA und PFK können nicht isoliert als Biomarker betrachtet werden, sondern müssen im Kontext des Gesamtmetabolismus der Tiere gesehen werden. So macht zum Beispiel eine Induktion der SDH aus dem Citrat-

3. Ergebnisse und Diskussion

zyklus keinen Sinn, wenn nicht einer der Stoffwechselwege die Vorläufermoleküle für den Citratzyklus liefern, ebenfalls einer Induktion unterliegt.

- Eine Korrelation zwischen ultrastrukturellen und biochemischen Befunden ist gegeben, wie die Beispiele der mitochondrialen und lysosomalen Enzyme sowie die Verschiebung der Energiespeicher von Glykogen zu Lipid und Lipogenese zeigen. Dennoch kann eine Korrelation nicht zwangsläufig abgeleitet werden, wie Befunde zur Peroxisomenproliferation und den Katalasewerten bestätigen.
- Die Bachforellen erwiesen sich im Artenvergleich mit der Bachschmerle als der empfindlichere Testorganismus: sie reagiert im allgemeinen stärker und häufiger. Die Befunde an Bachforelle und Bachschmerle lassen sich nicht gegenseitig aufeinander übertragen.
- Die insgesamt stärkere Belastung der Körsch kann auch anhand der biochemischen Befunde belegt werden
- Eine Korrelation der biochemischen Veränderungen in einzelnen Stoffwechselwegen mit der Jahreszeit kann nur in Ausnahmefällen belegt werden.
- Häufig wechselnde Tendenzen in den Abweichungen der Enzymaktivitäten sind mit der stark diskontinuierlichen Belastung der Untersuchungsgewässer, wie sie sich aus den chemisch-analytischen Daten ergeben, in Zusammenhang zu bringen.

4. Freilandexposition contra Exposition im Bypass-System - Ein Vergleich zweier Systeme

Biochemische Untersuchungen in Leber und Gehirn von Bachforelle und Bachschmerle in Freilandtieren und unter Halbfreilandbedingungen exponierten Zuchtfischen

Zusammenfassung: Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Veränderungen in den Aktivitäten ausgewählter Stoffwechsellzyme aufzudecken. Diese wurden als Biomarker zum Nachweis von Schadstoffbelastungen bei Bachforellen und Bachschmerlen an den zwei unterschiedlich belasteten Fließgewässern, Krähenbach und Körsch, eingesetzt, um Unterschiede in den Expositionsszenarien des aktiven und passiven Biomonitoring aufzuzeigen. Insgesamt erreichten bei beiden Fischarten die Übereinstimmungen in den Markerantworten zwischen Freiland und Bypass 63 bis 75 %. Im Folgenden werden mögliche Gründe für die Abweichungen zwischen den beiden Expositionswegen diskutiert.

4.1 Einleitung

Nach 3-jähriger Erfahrung mit der Exposition von Bachforelle und Bachschmerle unter Halbfreilandbedingungen am Krähenbach und Körsch, bei der sich eine Differenzierung der beiden Untersuchungsgewässer durch die im Projekt VALIMAR ausgewählten Biomarker immer deutlicher abzeichnete, galt es nun der Frage nachzugehen, inwieweit sich die Biomarkerantworten der Bypassiere mit Markerantworten von Freilandtieren aus den Modellgewässern korrelieren lassen.

Hierzu wurden über einen Zeitraum von zwei weiteren Jahren (1998 - 1999) die erprobten Biomarker (vgl. Kap. 3) zu den jeweiligen Probenahmen, zeitgleich in Tieren aus dem Freiland und aus den Bypass-Systemen, untersucht. Freilandtiere wurden durch Elektrofischung den Gewässern entnommen (passives Biomonitoring), während in den Bypassaquarien weiterhin Tiere aus Zuchtanlagen eingesetzt wurden (aktives Biomonitoring). Eine zusätzliche Fangstelle (Körsch E) im Oberlauf der Körsch sollte als interne Referenzstelle zum Beprobungsstandort Körsch A dienen, an dem auch die Bypassanlage installiert war. Analog wurde im Krähenbach/Aich-System eine Referenzstelle flussabwärts der Bypassanlage unterhalb des Zusammenflusses mit der Aich (Aich C) ausgewählt. Beschrieben werden im Folgenden die Veränderungen in den Stoffwechsellzymen.

Zur häufiger praktizierten Käfighaltung von Testorganismen des aktiven Biomonitoring stellt die Bypassexposition eine sinnvolle Ergänzung dar. Während die Käfighaltung v. a. in tiefen Gewässern wie Küstengewässern, Fjorden (Beyer *et al.*, 1996; Goksøyr *et al.*, 1994; Husøy *et al.*, 1996) oder Flüssen (Lindström-Seppa and Oikari, 1989; Oikari *et al.*, 1985; Soimasuo *et al.*, 1995; Vigano *et al.*, 1994) eingesetzt werden kann, bietet die Bypassexposition die Möglichkeit, aufgrund der hohen Kontrollierbarkeit des Systems auch kleinere, flache oder reißende Gewässer auf ihr ökologisches Gefährdungspotential hin zu charakterisieren.

Der wesentliche Unterschied zwischen aktiven und passiven Biomonitoring besteht darin, dass Freilandtiere zeitlebens Schadstoffe aus dem Wasser akkumuliert und sich daran (wahrscheinlich) physiologisch adaptieren. Beim aktiven Biomonitoring hingegen werden Testorganismen, bei Fischen meist Tiere aus Zuchtanlagen oder unbelasteteren Referenzgebieten, für definierte Zeitintervalle in Käfigen oder Bypass-Systemen den kontaminierten Untersuchungsstandorten exponiert, wobei man sich erhofft, dass die Testorganismen Schadstoffe akkumulieren und in ähnlicher Weise physiologische und metabolismusbedingte Antworten induzieren.

In der folgenden Untersuchung sollen die Expositionsszenarien Freiland und Bypass anhand ausgewählter biochemischer Parameter miteinander verglichen und chemischen Analysen der Gesamttiere gegenübergestellt werden, wobei v. a. folgende Fragen untersucht werden sollen, (1) inwieweit unterschiedliche Expositionsszenarien, d.h. die Exposition von Tieren unter natürlichen Freilandbedingungen in einem künstlichen System wie dem Bypass-System nachgestellt werden kann, und (2) ob die untersuchten Biomarker vergleichbare Antworten unter ähnliche Belastungssituationen widerspiegeln können.

4.2 Ergebnisse

Schadstoffanreicherung im Fettgewebe. Die chemischen Analysedaten (Honnen et al., 1999), exemplarisch für den Untersuchungszeitraum Mai bis November 1998 dargestellt, wiesen für beide Fischarten deutliche Unterschiede in der Schadstoffakkumulation zwischen Freiland und Bypass auf, wobei die Freilandwerte im Durchschnitt die Werte des Bypasses um das 3- bis 5-fache überschritten.

Bachforelle. Während im Bypass die Belastung der Tiere mit Pestiziden von Mai bis November 1998 in der Größenordnung von 200 - 300 µg/kg Fett schwankte, erreichten im Mai und Juli die Freilandtierwerte 500 - 600 µg/kg Fett. Erst im November nahm die Belastung auf das Bypassniveau ab. Im Mai übertrafen die PCBs in der Summe am Krähenbach (1800 µg/kg Fett) deutlich die PCB-Belastung an Aich C. Im Juli und November kehrten sich die Belastungswerte zugunsten der Krähenbachtiere (1350 bzw. 700 µg/kg Fett), als an der Aich Werte zwischen 2100 bzw. 1600 µg/kg Fett nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.2.1). Während bei der PAH-Belastung ähnliche Werte (200 - 300 µg/kg Fett) im Bypass und an der Aich C beobachtet werden konnten, wurden die Werte am Krähenbach um das 3-fache übertroffen, jedoch nahm die Belastung zum November hin erneut deutlich ab. Der Bypass-Wert im November ist vermutlich als Ausreißer anzusehen.

Bachscherle. Tiere der Probenstelle Körsch A zeigten im Vergleich zu Körsch E etwa die 4-fach höhere Pestizidbelastung (bis zu 5000 µg/kg Fett). Erst im November 1998 erreichten die Tiere beider Beprobungsstellen vergleichbare Wert; für Mai und November 1998 liegen keine Daten der Bypassexposition vor. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die PCB-Belastung: Erneut übertrafen an Körsch A die Werte (900 - 1200 µg/kg Fett) den Körsch E-Wert (400 - 700 µg/kg Fett) im Mai und Juli 1998 um mehr als das Doppelte (3.2.1). Im Ge-

4. Ergebnisse und Diskussion

gensatz dazu konnten bei den insgesamt höchsten PCB-Konzentrationen (5800 - 10500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett) im November die höheren Werte an Korsch E verzeichnet werden. Insgesamt war auch die PAH-Belastung an Korsch E (650 - 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett) gegenüber Korsch A erhöht; noch stärker war der Unterschied zum Bypass (< 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett) (Abb. 4.2.1).

4. Ergebnisse und Diskussion

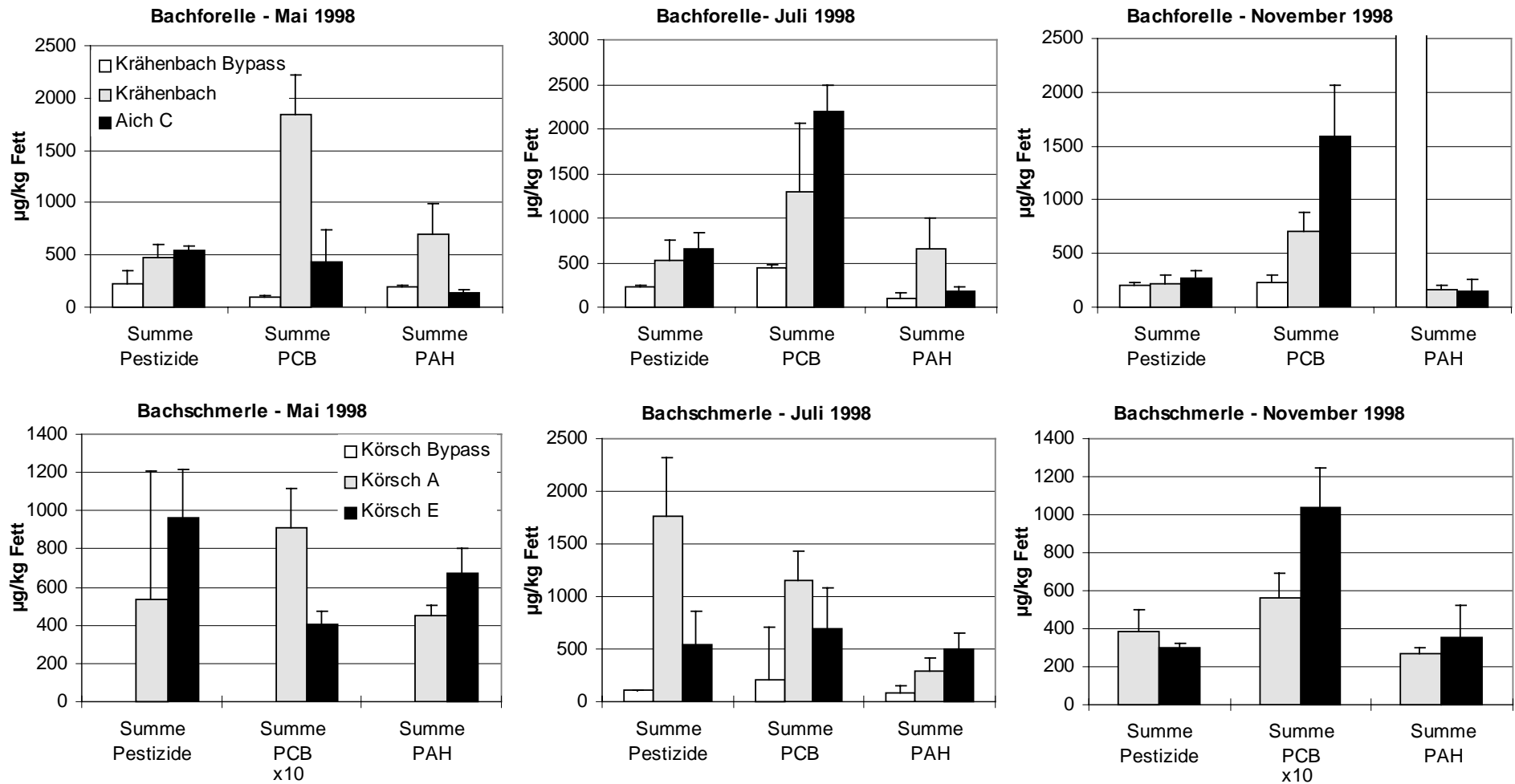


Abb. 4.2.1. Summen von PAHs, PCBs in Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) aus Freilandfängen und Tieren, die unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem mäßig belasteten Krähenbach/Aich (Bachforelle) und der stark belasteten Körsch (Bachschmerle) exponiert waren. n = 3 Pools bestehend aus 1 - 3 Individuen.

Bachscherle. Tiere, der Probenstelle Korsch A zeigten im Vergleich zu Korsch E etwa die 4-fach höhere Pestizidbelastung (bis zu 5000 µg/kg Fett), erst im November 1998 erreichten die Tiere beider Beprobungsstellen vergleichbare Wert; für Mai und November 1998 liegen keine Daten der Bypassexposition vor. Ein ähnliche Bild ergab sich auch für die PCB-Belastung: Erneut übertrafen an Korsch A die Werte (900 - 1200 µg/kg Fett) den Korsch E-Wert (400 - 700 µg/kg Fett) im Mai und Juli 1998 um mehr als das 2-Fache (3.2.1). Im Gegensatz dazu konnten bei den insgesamt höchsten PCB-Konzentrationen (5800 - 10500 µg/kg Fett) im November die höheren Werte an Korsch E verzeichnet werden. Insgesamt war auch die PAH-Belastung an Korsch E (650 - 350 µg/kg Fett) gegenüber Korsch A erhöht und gegenüber dem Bypass (< 100 µg/kg Fett) sogar deutlich erhöht (Abb. 4.2.1).

Konditionsfaktor und Leber-somatischer Index

Bachscherle: In der Regel lag der Konditionsfaktor der Bypasstiere deutlich unter den Werten der Freilandtiere ($p < 0,01$); lediglich im Juli '98 wurde der Bypasswert von den Tieren an

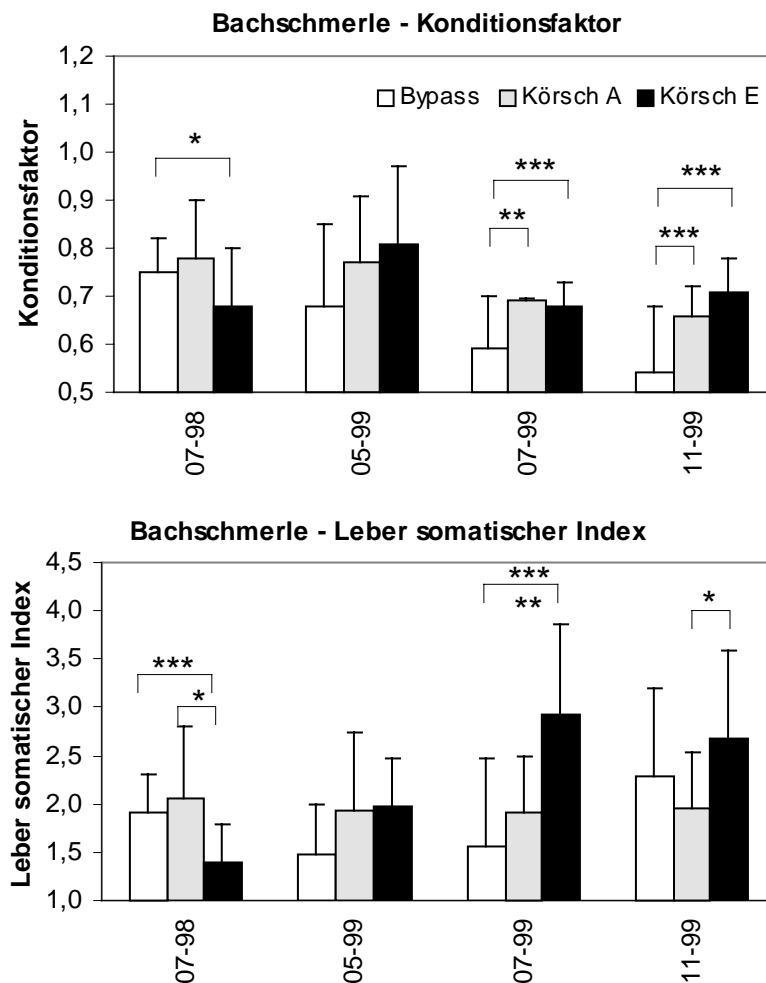


Abb. 4.2.2 Lebersomatischer Index und Konditionsfaktor von Bachscherlen (*Barbatula barbatula*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem Wasser der stark belasteten Korsch sowie in Freilandfängen der Beprobungsstellen Korsch A und Korsch E.

4. Ergebnisse und Diskussion

Körsch E unterschritten ($p < 0,01$) (Abb. 4.2.2). Die Werte an Körsch A und Körsch E bewegten sich dagegen in vergleichbaren Bereichen.

Der Leber-somatische Index (LSI) erwies sich in den Bachschmerlen als sehr uneinheitlich: Im Juli '98 unterschritt der LSI an der Beprobungsstelle Körsch E die Werte von Bypass und Körsch A, übertraf diese jedoch im Juli und November '99 ($p < 0,001$). Der Mai '99 ließ vergleichbare Werte im Freiland erkennen, die deutlich über dem Niveau des Bypasses lagen (Abb. 4.2.2).

Bachforelle: Bei den Bachforellen unterschieden sich Werte des Konditionsfaktors der Freilandtiere von denen des Bypasses nur unwesentlich, lediglich im November '98 und '99 übertraf der Wert des Bypasses die Freilandwerte. Im Juli '99 fiel der Krähenbachwert im Vergleich zum Bypass und zu Aich C sehr niedrig aus ($p < 0,01$, Abb. 4.2.3).

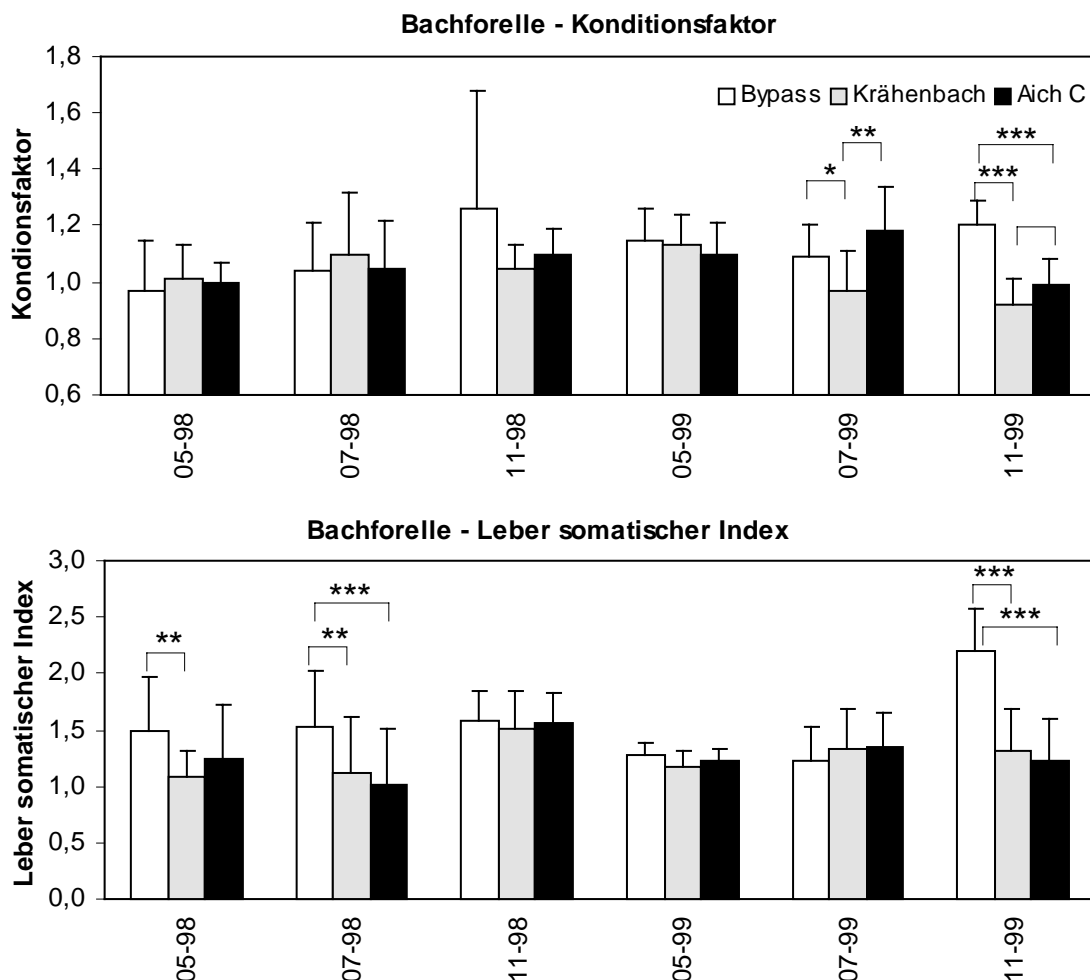


Abb. 4.2.3 Leber-somatischer Index und Konditionsfaktor von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) nach Exposition unter Halbfreilandbedingungen gegenüber dem Wasser des mäßig belasteten Krähenbachs sowie in Freilandfängen der Beprobungsstellen Krähenbach und Aich C.

In Relation zum Bypass ergaben sich am Krähenbach und der Aich für den Leber-somatischen Index reduzierte Werte im Mai und Juli '98 sowie im November '99 ($p < 0,001$).

Stoffwechsellenzyme in Gehirn und Leber

Gehirn - Acetylcholinesterase. Signifikante Unterschiede zwischen dem Bypass und dem Freiland ergaben sich lediglich im Juli '98: Während am Krähenbach die Aktivität pro g Organ um 40 % unter dem Bypass-Wert lag ($p < 0,001$), lag die Aktivität der Acetylcholinesterase an der Aich um 30 % niedriger ($p < 0,05$; Abb. 4.2.4).

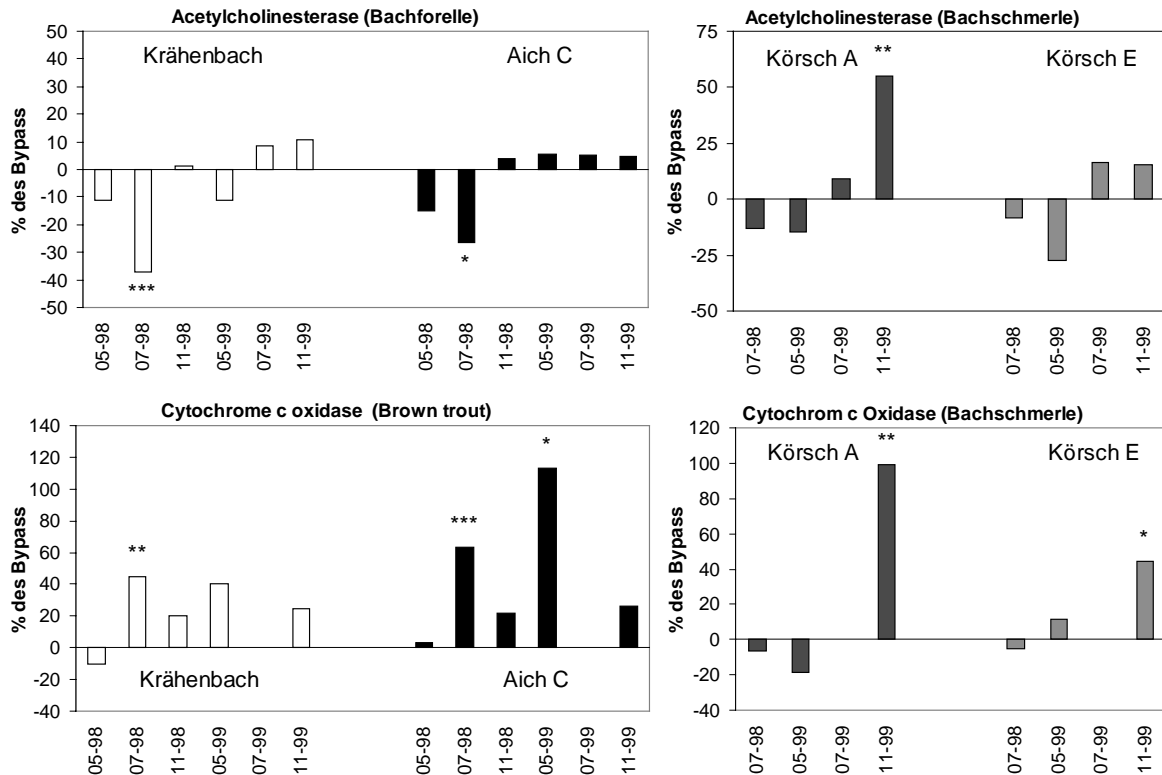


Abb. 4.2.4 Relative Enzymaktivitäten der Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase im Gehirn von im Freiland gefangenen Bachforellen und Bachschmerlen zu Bypass-exponierten Tieren nach Exposition gegenüber den mäßig belasteten Bächen Krähennbach/Aich und der stark belasteten Körtsch. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Bachschmerlen im Juli '98 und Mai '99, als die Acetylcholinesteraseaktivität um bis zu 30 % gegenüber dem Bypass reduziert war. Im Gegensatz dazu wurde an Körtsch A im November '99 ein Anstieg um 55 % ($p < 0,05$) relativ zum Bypass beobachtet.

Cytochrom C Oxidase. In den Bachforellen konnte ein Anstieg der Gesamtaktivität im Juli '98 um 45 % am Krähennbach bzw. 63 % an der Aich gegenüber dem Bypass nachgewiesen werden. Darüber hinaus übertrafen im Mai '99 die in der Aich gefangenen Tiere das Referenzniveau um 113 % ($p < 0,05$).

4. Ergebnisse und Diskussion

Für die Bachschmerlen ließen sich im November '99 an beiden Beprobungsstellen der Körsch signifikante Abweichungen gegenüber dem Bypass beobachten (Körsch A 99 %), während an der internen Vergleichsstelle Körsch E die Abweichung lediglich 44 % ($p < 0,05$) erreichte.

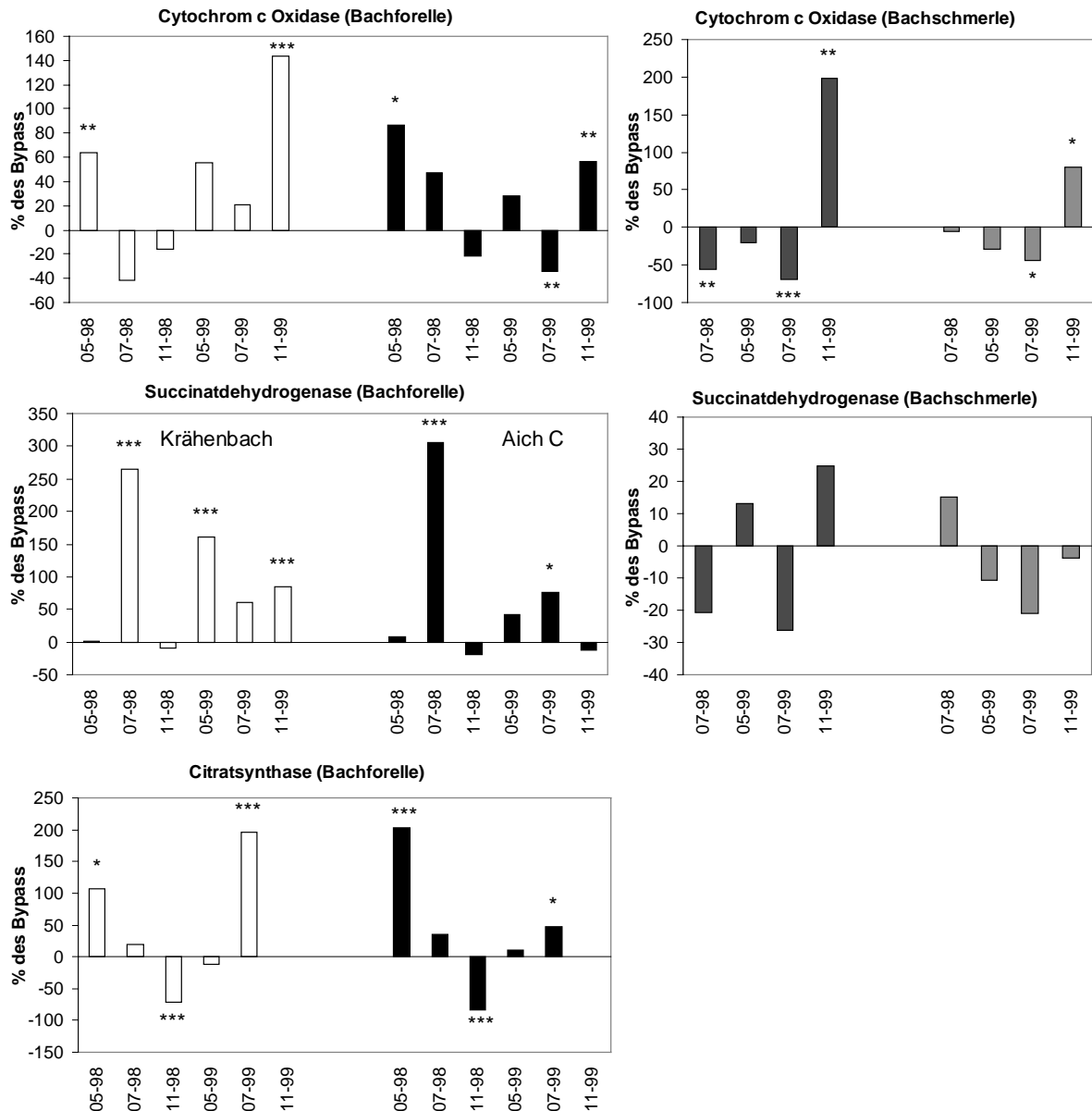


Abb. 4.2.5 Relative Enzymaktivitäten der Succinatdehydrogenase, Citratsynthase und Cytochrom c Oxidase in der Leber von im Freiland gefangenen Bachforellen und Bachschmerlen zu Bypass-exponierten Tieren nach Exposition gegenüber den mäßig belasteten Bächen Krähenbach/Aich und der stark belasteten Körsch. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Leber - Cytochrom C Oxidase. An beiden Beprobungsstandorten, Krähenbach und Aich, lagen Abweichungen vom Bypass eng beieinander. Kam es im Mai '98 und November '99 zu gesteigerten Aktivitäten von 63 % und 87 % bzw. 56 und 143 %, sank die Aktivität im Juli '99 um 36 % ($p < 0,01$). Größere Unterschiede ergaben sich für die Bachschmerlen beim Vergleich der Daten zwischen Körsch A und Bypass: Während im Sommer '98 und '99 die Akti-

vitäten um 55 - 68 % bzw. an Körsch E um 43 % zurückgingen, wurde die Cytochrom C Oxidase auf ein Niveau zwischen 80 und 200 % über dem des Bypass induziert.

Succinatdehydrogenase und Citratsynthase. Unterschiedliche Antworten konnten für die Succinatdehydrogenase und die Citratsynthase des mitochondrialen Citratzyklus bei den Bachforellen beobachtet werden. Während sich die Aktivität der Succinatdehydrogenase am Krähenbach durch erhöhte Werte von 264 %, 160 % und 84 % im Juli '98, Mai '99 bzw. November '99 abhob, überstiegen an der Aich die Werte das Niveau des Bypasses um 305 % und 76 % im Juli '98 und '99 ($p < 0,001$). Ein ähnliches Muster konnte in den Bachforellen für die Citratsynthase relativ zum Bypass aufgezeigt werden: Erhöhte Werte zwischen 48 und 196 % ergaben sich im Mai '98 und Juli '99, während im November das Referenzniveau deutlich unterschritten wurde ($p < 0,001$; Abb. 4.2.5). In den Bachschmerlen konnten keine Veränderungen für die Succinatdehydrogenase festgestellt werden.

Glucose-6-P-Dehydrogenase: Während für die Glucose-6-P-Dehydrogenase der Bachforellen keine Unterschiede zwischen dem Bypass und dem Krähenbach nachgewiesen werden konnten, waren die Unterschiede zwischen Aich und Bypass auffallend: Gerade in den Julimonaten der Jahre '98 und '99 sank das totale Aktivitätsniveau deutlich ab ($p < 0,001$); im November '98 war dagegen eine Zunahme ($p < 0,01$) zu verzeichnen. Bei den Bachschmerlen ergaben sich am Bypass der Körsch Abweichungen in Form erhöhter Werten an Körsch A und reduzierter Werte an Körsch E im Juli '98.

Phosphofruktokinase: Übereinstimmung Daten konnten bei den Bachschmerlen für Freiland und Bypass erhoben werden; dagegen traten die Werte am Krähenbach und an der Aich z. T. deutlich hinter die Bypasswerte in den Julimonaten '98 und '99 zurück, während es auch bei der Phosphofruktokinase im November '99 zu einem Anstieg an der Aich gegenüber dem Referenzniveau kam ($p < 0,05$).

Hexokinase: Sowohl bei den Bachforellen als auch bei den Bachschmerlen konnten zwischen den Standorten im Freiland und den Bypass-Systemen ähnliche Antworten auf die Expositionen beobachtet werden. Zeigte sich die totale Aktivität der Hexokinase bei den Bachforellen im Mai '98 und November '99 mit 78 - 95 % und 102 - 341 % erhöht, nahm die Aktivität im Juli '98 bei den Bachschmerlen um 38 - 67 % erniedrigt, übertraf im November '99 um den Bypasswert um 118 bis 434 % ($p < 0,001$).

Esterase, Malatenzym und Alaninaminotransferase. Der Vergleich der Daten bei der Esterase, dem Malatenzym als auch der Alaninaminotransferase zeigt, dass tendenziell an beiden Beprobungsstandorten eines jeden Gewässersystems beide Fischarten ähnliche Reaktionen zeigten. Reduzierte Aktivitäten ließen sich bei den Bachforellen am Krähenbach und an der Aich im Juli '98 bei Esterase, Malatenzym und Alaninaminotransferase und im November '98 und Juli '99 für die Esterase an der Aich nachweisen.

4. Ergebnisse und Diskussion

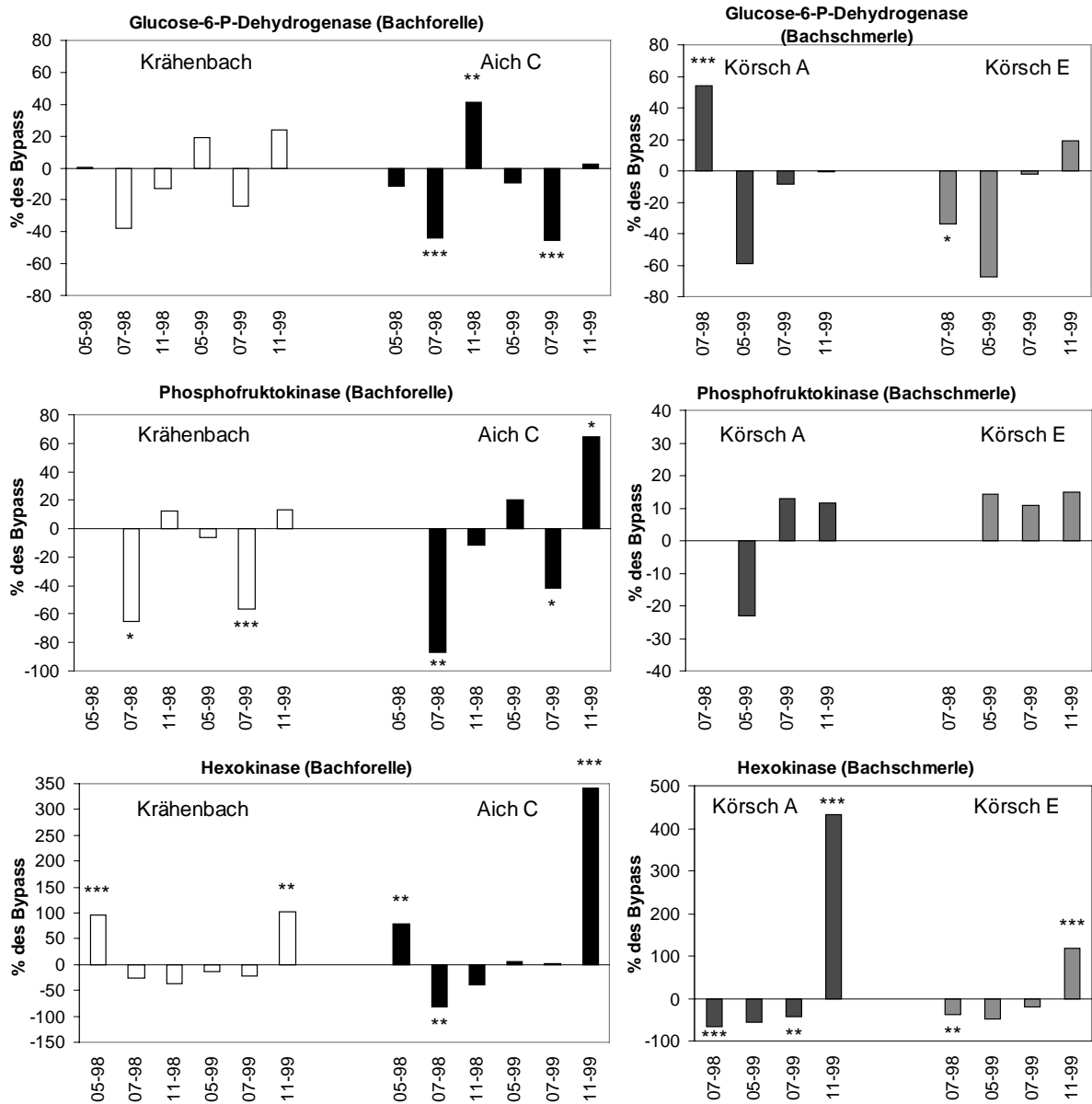


Abb. 4.2.6 Relative Enzymaktivitäten der Glucose-6-P-Dehydrogenase, Phosphofruktokinase und Hexokinase in der Leber im Freiland gefangenen Bachforellen und Bachschmerlen zu Bypass-exponierten Tieren nach Exposition gegenüber den mäßig belasteten Bächen Krähenbach/Aich und der stark belasteten Körsch. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Andererseits wurde das Bypassniveau im Mai '99 bei der Esterase (Krähenbach/Aich), der Alaninaminotransferase (Krähenbach) und dem Malatenzym (Aich) sowie im November '99 bei Esterase und Alaninaminotransferase (Krähenbach/Aich) und dem Malatenzym (Krähenbach) übertroffen.

Im Gegensatz zu den Bachforellen zeigten sowohl Esterase als auch Alaninaminotransferase bei den Bachschmerlen keine signifikanten Veränderungen zwischen Mai und November '99, dagegen wurde das Malatenzym an beiden Beprobungsstandorten an der Körsch im Mai '98, Mai '99, Juli '99 und November '99 um 40 - 80 % gehemmt ($p < 0,05 - 0,001$).

4. Ergebnisse und Diskussion

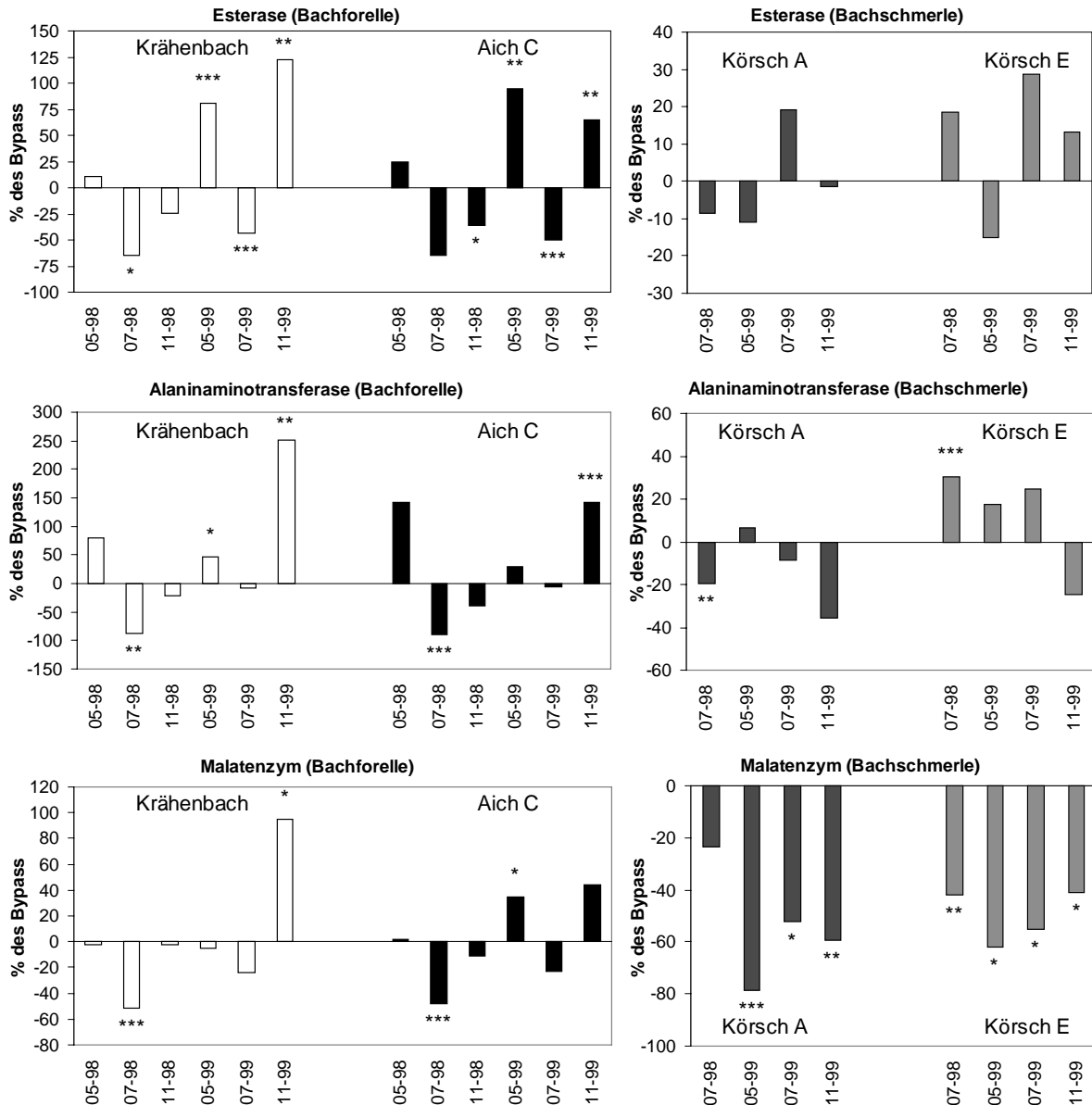


Abb. 4.2.7 Relative Enzymaktivitäten der Esterase, Alaninaminotransferase und Malatenzym in der Leber von im Freiland gefangenen Bachforellen und Bachschmerlen zu Bypass-exponierten Tieren (Abszisse) nach Exposition gegenüber den mäßig belasteten Bächen Krähenbach/Aich und der stark belasteten Körsch. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Katalase und Superoxiddismutase: Unterschiede in den Katalaseaktivitäten bei den Bachforellen zwischen Bypass und Freiland betrafen v. a. die Monate von Mai bis November '99, wobei die Unterschiede am Krähenbach mit 100 - 150 % im Vergleich zur Aich mit 40 - 50 % weitaus stärker ausfielen. Parallel zur Katalaseaktivität konnte am Krähenbach ein deutlicher Anstieg der Aktivität der Superoxiddismutase mit 135 - 145 % ($p < 0,05 - 0,001$) im Mai bzw. November '99 nachgewiesen werden, während an der Probennahmestelle Aich C erhöhte Werten von 40 - 50 % ($p < 0,001$) im Juli und November '99 zu beobachten waren.

Abweichungen vom Bypass betrafen bei den Bachschmerlen die Probennahmen im Mai '99 mit reduzierten Werten von 35 - 40 % an Körsch A und Körsch E; jedoch fanden sich verrin-

4. Ergebnisse und Diskussion

gerte Aktivitäten für die Superoxiddismutase im Juli und November '99 nur bei Körsch E ($p < 0,05$).

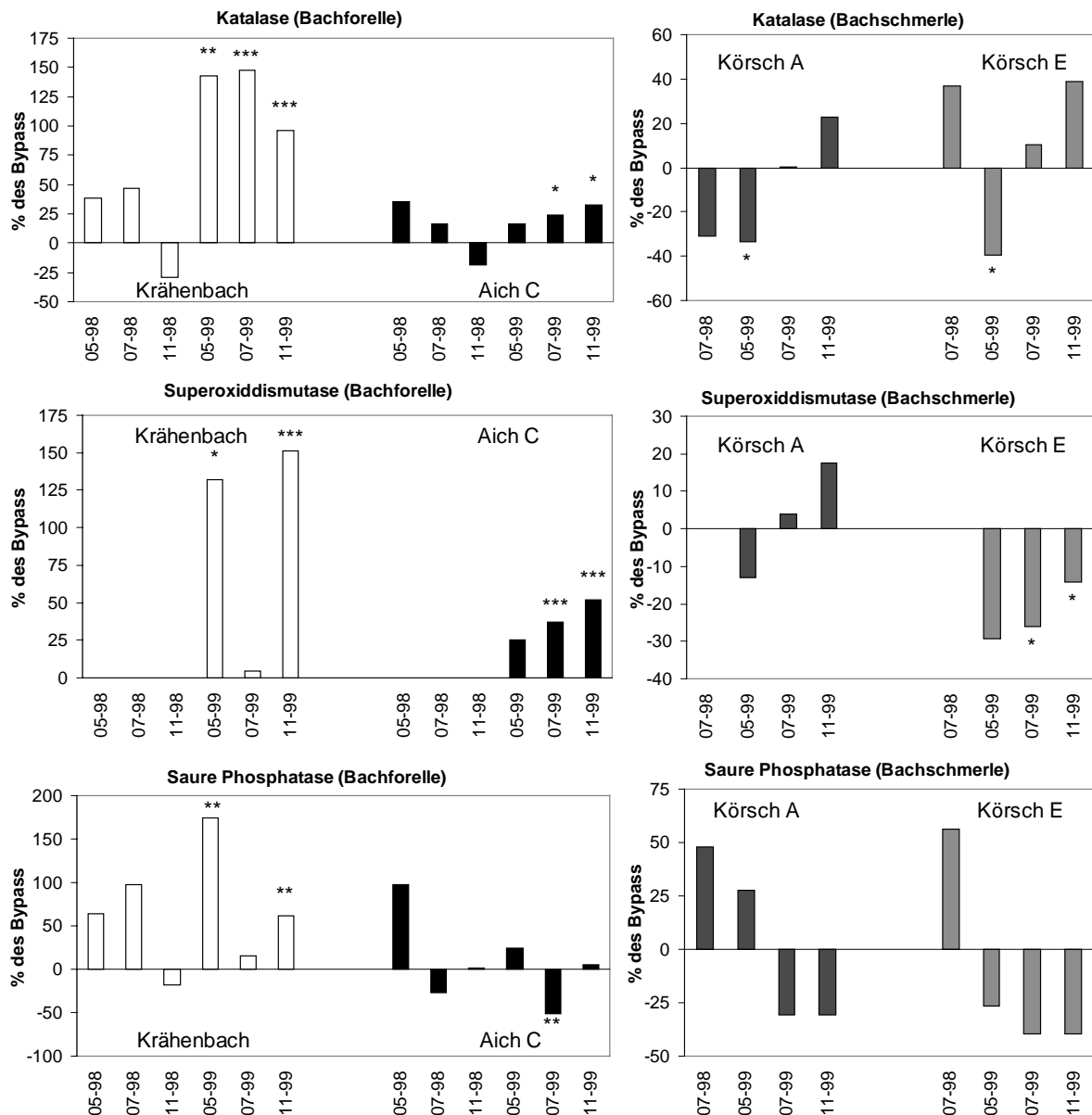


Abb. 4.2.8 Relative Enzymaktivitäten der Katalase, Superoxiddismutase und Sauren Phosphatase in der Leber von im Freiland gefangenen Bachforellen und Bachschmerlen zu Bypass-exponierten Tieren (Abszisse) nach Exposition gegenüber den mäßig belasteten Bächen Krähenbach/Aich und der stark belasteten Körsch. Beachte die unterschiedliche Skalierung zwischen Bachforelle und Bachschmerle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Saure Phosphatase: Statistisch bedeutsame Abweichungen ergaben sich bei den Bachforellen nur im Jahr 1999. Am Krähenbach erreichte die Aktivität der Sauren Phosphatase im Mai '99 Werte von 170 % und 62 % im November '99 relativ zum Bypass, wenngleich unveränderte Werte bzw. ein verringerter Wert unterhalb von 50 % an der Aich zu messen waren. Bedingt durch hohe Standardabweichungen konnten bei den Bachschmerlen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.3 Diskussion

Die zweijährigen Untersuchungen zum Vergleich des aktiven und passiven Biomonitorings konnten durch doch ein erhebliches Maß an Übereinstimmung von annähernd 63 - 75 % in den ausgewählten Biomarkerantworten zeigen, dass die Durchführung von Halbfreilandexpositionen in Bypass-Systemen für zukünftige Freilanduntersuchungen eine akzeptable Alternative zur Entnahme von Freilandfängen (passives Biomonitoring) bzw. zur Käfighaltung (aktives Biomonitoring) darstellt. Die Ergebnisse belegten jedoch auch, dass trotz langer Expositionsintervalle von bis zu 24 Wochen (vgl. Kap. 2.3.1) bisweilen starke Abweichungen in den Reaktionsmustern der ausgewählten Stoffwechsellenzyme zwischen Bypass-Tieren und Freilandfängen auftreten können.

Für die Bachforellen von Aich C und Krähenbach konnten bei 168 Aktivitätsbestimmungen in den Stoffwechsellenzymen 62 signifikante Abweichungen gegenüber dem Bypass aufgezeigt werden, woraus sich eine Übereinstimmung von 63 % in den Markerreaktionen ergab. Die Beschränkung des Vergleichs auf Krähenbach und Bypass ergab bei 84 erhobenen Messungen lediglich 30 signifikante Abweichungen, die das Maß an Übereinstimmungen auf 64,2 % hoben. Bei den Bachschmerlen waren Unterschiede zwischen dem Bypass und dem Freiland (Körsch A) sogar noch schwächer ausgeprägt: Von 52 Datensätzen wichen lediglich 14 signifikant ab, die Übereinstimmung betrug 73,1 %.

Trotz der hohen Zahl an Übereinstimmungen in den Aktivitätsmustern der ausgewählten Stoffwechsellenzyme bei Bachforelle und Bachschmerle zeigten die Ergebnisse jedoch auch, dass eine vollständige Übereinstimmung nicht zu erreichen ist. Die Gründe hierfür dürften in folgenden Gründen zu suchen sein: (1) eine unterschiedlichen Vorgeschichte der Test- und Freilandtiere, (2) eine abweichende Ernährung der Testfische sowie (3) Unterschiede in den Expositionsbedingungen.

Um den Einfluss der Gonadenreifung (Braunbeck *et al.*, 1990b; Braunbeck *et al.*, 1989) sowie altersbedingte Veränderungen (Braunbeck *et al.*, 1992) in der Physiologie der Testtiere auf die zu untersuchenden Parameter so gering wie möglich zu halten, wurden als Testfische in den Bypass-Systemen prinzipiell juvenile Tiere eingesetzt. Eine derartige Beschränkung konnte aus praktischen Gründen sowie aus Mangel an Tieren für die Elektrofischerei im Freiland nicht aufrechterhalten werden. Daraus resultierte generell bei den Freilandfängen, sowohl auf das Alter als auch auf die Größe bezogen, eine größere Inhomogenität. Da die untersuchten Fischarten innerhalb der Gewässer frei wandern können, kann über die Vorgeschichte der Freilandfänge keine Angabe gemacht werden. Dies mag insofern von Bedeutung sein, als Freilandtiere, die zeitlebens mit Schadstoffen in Berührung kommen, möglicherweise zur Präadaptation an eine erhöhte anthropogene Schadstoffbelastung neigen. Damit könnten Antworten der biochemischen Marker bei aktuellen Belastungen der Gewässer in Umfang und Richtung beeinflusst sein. Vielmehr wurden die in den Bypass-Systemen eingesetzten Fische aus unbelasteten Gewässern bezogen, was eine Präadaptation nicht erwarten ließ. Die Fähigkeit zur Präadaptation kann als ein natürlicher Selektionsvorteil angesehen werden, der "gegen anthropoge-

ne Einflüsse robusteren Tieren" eine erhöhte Überlebens- und Fortpflanzungschance gewährt. Neben einer natürlichen genetischen Variabilität, wie sie bei Tieren unterschiedlicher Herkunft auftreten kann, könnten sich aufgrund des Selektionsvorteils in einer Population bestimmte Allo- bzw. Isoenzyme manifestieren, die zu unterschiedlichen Markerantworten zwischen Freilandpopulationen und eingesetzten Bypass-Tieren führen können (Fore *et al.*, 1995a; Fore *et al.*, 1995b; Gillespie and Guttman, 1993). (Gillespie and Guttman, 1989) konnten bei Untersuchungen mit dem *Campostoma anomalum* tatsächlich Verschiebungen in der Häufigkeit von Allel- und Genotypen infolge Schadstoffbelastung beobachten. Auch (Martinez-Lara *et al.*, 1996) beschreiben bei der Seebrasse (*Sparus aurata*) verschiedene Iso-enzymmuster der Glutathion-S-Transferase, die zu unterschiedlichen Aktivitäten unter Schadstoffbelastungen führten.

Schadstoffe werden nicht nur durch direkte Exposition der Körperoberfläche, sondern auch über die Nahrungskette aufgenommen (Connell, 1998; Randall *et al.*, 1995). Bei Fischen stellen die Kiemen aufgrund geringster Diffusionsstrecken einen wichtigen Ort der Schadstoffaufnahme dar (Bath and Eddy, 1980; Lock *et al.*, 1994; Pawert *et al.*, 1998). Daneben stellt die Aufnahme von Xenobiotica über die Nahrung aufgrund von Akkumulations- und Biomagnifikationsprozessen einen weiteren wichtigen Expositionspfad dar (Connell, 1998; Livingstone *et al.*, 1994; White *et al.*, 1998). Über den Wasserzulauf der Bypass-Systeme wurden zwar Kleinorganismen in die Aquarien eingetragen, dennoch ist davon auszugehen, dass das natürliche Nahrungsangebot quantitativ nicht erreicht wurde, womit die Schadstoffaufnahme über die natürliche Nahrung im Bypass im Vergleich zum Freiland limitiert war. Tatsächlich mussten beide Fischarten im Bypass zusätzlich mit Kunstfutter gefüttert werden. Ein weiterer Aspekt, der zu den Abweichungen in den Enzymaktivitäten zwischen Bypass und Freiland beigetragen haben könnte, ist im unterschiedlichen Expositionsszenario zu suchen: Aufgrund der anhaltend diffusen Kontamination der Modellgewässer (Honnen *et al.*, 1997a; Honnen *et al.*, 1998; Honnen *et al.*, 1996; Honnen *et al.*, 1997b; Honnen *et al.*, 1999b; Pawert *et al.*, 1998; Tribskorn *et al.*, 1997a) kann davon ausgegangen werden, dass die Freilandtiere bereits zu Beginn der Untersuchungen erhöhte Schadstoffkonzentrationen akkumuliert hatten, während bei den Bypassfischen die Akkumulation sowie die Adaption an die Belastungszustände erst mit Beginn der Exposition einsetzte und somit zu abweichenden Antwortmustern der Biomarker führte. Hinzu kommt die Sedimentierung von schwebstoffgebundenen Schadstoffen. Während bereits kleinere und mittlere Hochwasserereignisse in kleineren Fließgewässern durchaus dafür sorgen können, dass Sedimente remobilisiert und quantitativ mit der Flut abtransportiert werden, kam es im Bypass zu kontinuierlicher Sedimentierung eingetragener Schwebstoffe und der an ihnen gebundenen Schadstoffe. Umweltgifte werden dadurch der Wasserphase entzogen und im Sediment gebunden (Ahlf *et al.*, 1991; Burton, 1991). Gerade benthisch lebende Organismen wie die in den Experimenten eingesetzten Bachschmerlen, erfahren hier eine vom Freiland abweichende Expositionssituation.

Die akkumulierten Schadstoffe (Honnen *et al.*, 1999a) in Bachforelle und Bachschmerle bestätigen die aufgeführten Überlegungen zu den unterschiedlichen Systemen des aktiven und

passiven Biomonitorings. Generell übertrafen sowohl bei den Bachforellen als auch bei den Bachschmerlen die im Freiland akkumulierten Schadstoffmengen (bezogen auf den Fettgehalt der exponierten Fische) deutlich die Werte der Bypassfische. Vor dem Hintergrund derart unterschiedlicher Schadstoffakkumulation erscheinen Abweichungen in den Reaktionen der Markerenzyme der Modellorganismen zwischen Freiland und Bypass verständlich.

Schlussfolgerung: Die in dieser Studie erhobenen biochemischen und chemischen Daten zeigten, dass trotz einer hohen Wasserzufuhr in die Aquarien der Bypass-Systeme eine völlig wirklichkeitsgetreue Abbildung einer diskontinuierlichen Schadstoffbelastung im Freiland nur annähernd erreicht werden kann. Dennoch konnten Übereinstimmungen zwischen Freiland und Bypass in den Aktivitäten der ausgewählten Markerenzyme von ca. 63 - 75 % erreicht werden, die die Bypassexposition als eine sinnvolle Alternative zum passiven Biomonitoring erscheinen lassen.

5. Exposition von Fischen gegenüber unterschiedlichen Körsch-Cocktailkonzentrationen

Biochemische Reaktionen in der Leber von Bachforelle und Bachschmerle auf unterschiedliche Schadstoffkonzentrationen der Körsch unter kontrollierten Laborbedingungen

Zusammenfassung: Bachforellen wurden 4 Wochen unter Laborbedingungen einem 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen Körsch-Cocktail exponiert. Untersucht wurden ausgewählte Stoffwechsellenzyme, die bereits unter Halbfreilandbedingungen als Biomarker zur Indikation von Gewässerbelastungen eingesetzt wurden. Für die meisten Stoffwechsellenzyme ließen sich Dosis-Wirkungsbeziehungen aufzeigen. Insgesamt konnten die deutlichen Markerantworten, wie sie unter Halbfreilandbedingungen gefunden wurden, bei ähnlich bzw. höher akkumulierten Schadstoffdosen im Labor, jedoch nur z.T. bestätigt werden.

5.1 Einleitung

Unter Freiland- bzw. Halbfreilandbedingungen wirken eine Fülle von Parametern auf Organismen, die in ihrer Gesamtheit die Physiologie der Organismen und damit auch die Biomarkerantworten beeinflussen. Für zahlreiche chemisch-physikalische Parameter liegen umfangreiche Untersuchungen vor, jedoch ist das Wissen um die Komplexität und das Zusammenspiel dieser einzelnen Parameter in Ökosystemen auf physiologische Reaktionen in Organismen sehr begrenzt. Um den Einfluß nicht zu kontrollierender Störfaktoren auf die Markerantworten der Testorganismen, die durch die anthropogene Schadstoffbelastung der Modellgewässer induziert werden, zu minimieren, wurden unter kontrollierten Laborbedingungen Bachforellen der 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen Dosis der mittleren Schadstoffkonzentrationen der Körsch ausgesetzt. Ziel war es: (1) durch eine höhere Dosierung die längerfristige Belastung mit Schadstoffen im Freiland zu kompensieren und (2) zu überprüfen, ob die unter Halbfreilandbedingungen gewonnen Erkenntnisse bezüglich der Biomarkerantworten trotz der Komplexität von potentiellen Störfaktoren einzig auf die Schadstoffbelastung zurückgeführt werden können.

5.2 Ergebnisse

Biochemische Befunde nach Belastung gegenüber steigenden Schadstoffkonzentrationen. Insgesamt konnte der Laborversuch das Ausmaß an Veränderungen in den ausgewählten Biomarkern, wie sie aus den vorangegangenen Halbfreilandexpositionen erwartet worden wären, nur z. T. bestätigen. Die deutlichsten Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle ergaben sich im Bezug auf die mitochondriale Succinatdehydrogenase, die peroxisomale Katalase sowie das im Fettstoffwechsel integrierte Malatenzym. Lediglich tendenziell konnten dosisabhängige Abweichungen bei Hexokinase, Saurer Phosphatase, Alaninaminotransferase und Esterase beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die im Verhältnis zum Freiland

statische Schadstoffbelastung im Labor nicht ausreichte, um die unter komplexen Freilandbedingungen erhobene Biomarkerdaten ausreichend zu erklären.

Leber-somatischer Index und Konditionsfaktor. Der Leber-somatische Index lag für die Expositionsgruppen zwischen 1,14 und 1,17, der Konditionsfaktor zwischen 2,96 und 3,26. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht ermittelt.

Tab 5.2.1. Konditionsfaktor (CF) und Leber-somatischer Index (LSI) von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) nach 4-wöchiger Exposition gegenüber einem 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen Körschcocktail

Konzentration	LSI	CF
EtOH-Kontrolle	1,15 ± 0,11	3,26 ± 0,89
1x-Cocktail	1,15 ± 0,1	3,01 ± 0,67
10x-Cocktail	1,17 ± 0,06	3,19 ± 0,64
50x-Cocktail	1,14 ± 0,08	2,96 ± 0,47

Gehirn -Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase. Nach 4-wöchiger Exposition der Bachforellen gegenüber drei verschiedenen Cocktailkonzentrationen konnten im Gehirn der Versuchstiere lediglich geringfügige Abweichungen für die Acetylcholinesterase gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Eine schwach signifikante Abnahme der totalen Cytochrom C Oxidaseaktivität bewirkte die höchste Cocktailkonzentration (Abb. 5.2.1), dagegen ließ der Bezug auf den Proteingehalt keine Veränderungen erkennen

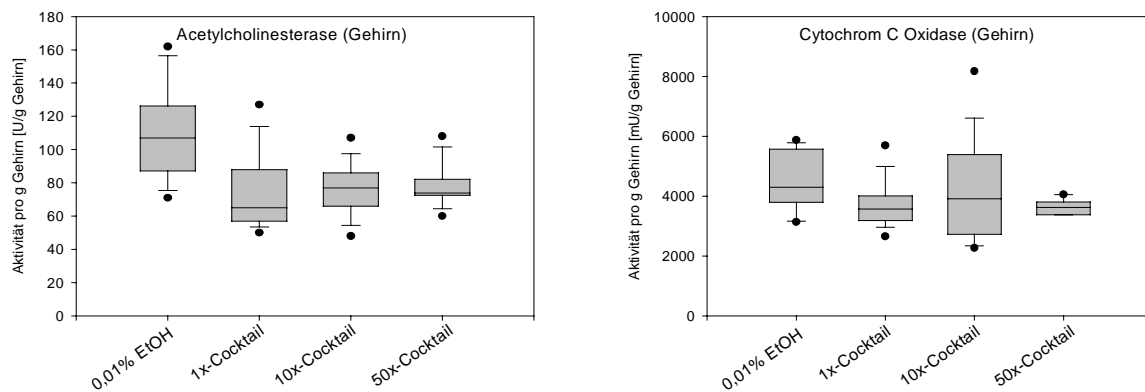


Abb. 5.2.1 Totale Aktivität der Acetylcholinesterase und der Cytochrom C Oxidase nach 4-wöchiger Exposition gegenüber der 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen mittleren Schadstoffkonzentration Körsch, n = 10; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 nach dem Rangsummentest nach Mann-Whitney.

Leber- Succinatdehydrogenase und Cytochrom C Oxidase. Eine dosisabhängige Reduktion der totalen Aktivität ließ sich für die Succinatdehydrogenase beobachten (Abb. 5.2.2), jedoch konnte bei Bezug auf die Proteinebene lediglich bei der höchsten Cocktailkonzentra-

5. Ergebnisse und Diskussion

tion eine deutliche Abnahme gegenüber dem Referenzwert festgestellt werden ($p < 0,05$). Signifikant reduzierte Aktivitäten zeigten sich auch bei der Cytochrom C Oxidase (Abb. 3.4.2) nach Exposition gegenüber der höchsten Cocktailkonzentration relativ zur Ethanolkontrolle ($p < 0,05$), während die 1-fache bzw. 10-fache Cocktailkonzentration zu keinen Veränderungen führten.

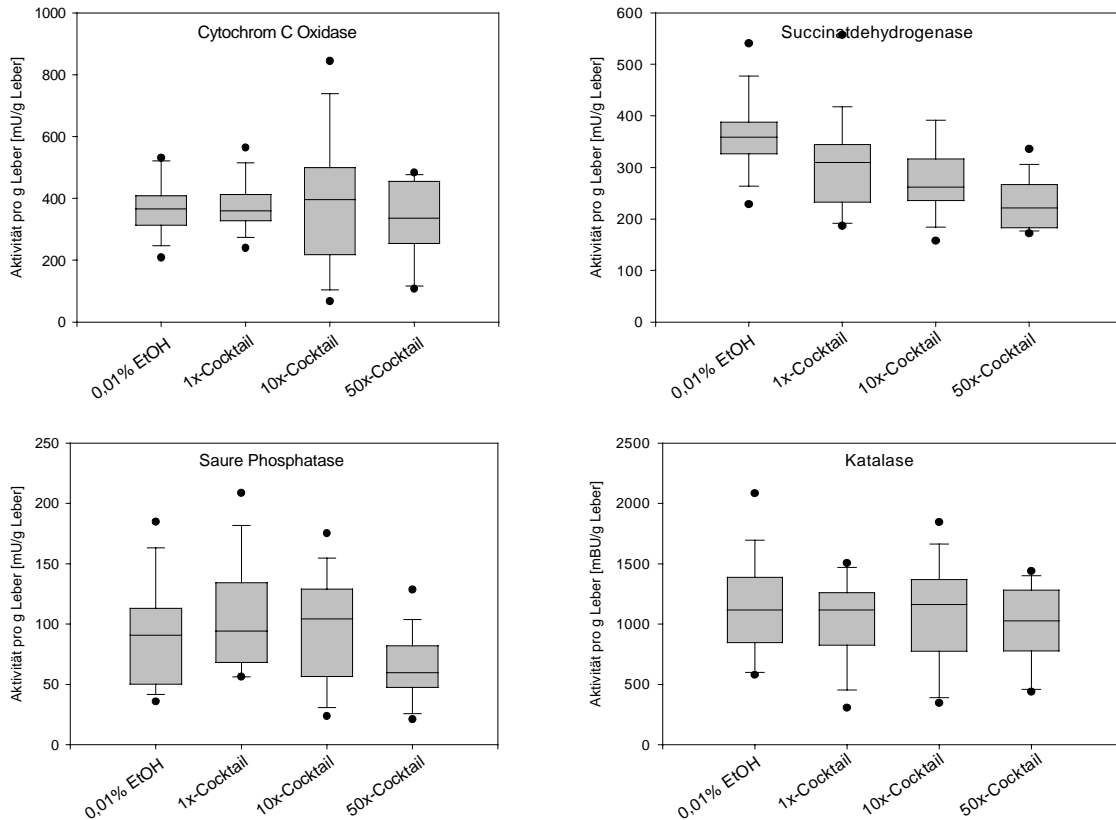


Abb. 5.2.2 Totale Aktivität von Succinatdehydrogenase, Cytochrom C Oxidase, Sauren Phosphatase und Katalase nach 4-wöchiger Exposition gegenüber der 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen mittleren Schadstoffkonzentration der Körsch, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Saure Phosphatase und Katalase. Tendenziell konnte im Cocktailexperiment bei der Sauren Phosphatase eine dosisabhängige Abnahme der Enzymaktivität nachgewiesen werden, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Eine deutlich induzierende Wirkung auf die peroxisomale Katalaseaktivität zeichnete sich nach der Exposition auf Proteinebene ab, als bei allen Cocktailkonzentrationen die Katalaseaktivität signifikant erhöht war; allerdings ergab der Bezug auf Aktivität pro g Leber keinen Hinweis auf eine veränderte Enzymaktivität relativ zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 5.2.2).

Malatenzym und Alaninaminotransferase. Auch für die dem Energiestoffwechsel zuzurechnenden Enzyme Malatenzym und Alaninaminotransferase konnte eine dosisabhängige Wirkung beobachtet werden. Die niedrigste Cocktailkonzentration bewirkte bei der spezifischen Aktivität gegenüber der Kontrolle eine verminderte Aktivität (Malatenzym $p < 0,001$),

5. Ergebnisse und Diskussion

jedoch führte die steigende Schadstoffdosis zu einen signifikanten Anstieg der Aktivität über das Kontrollniveau (Abb. 5.2.3.).

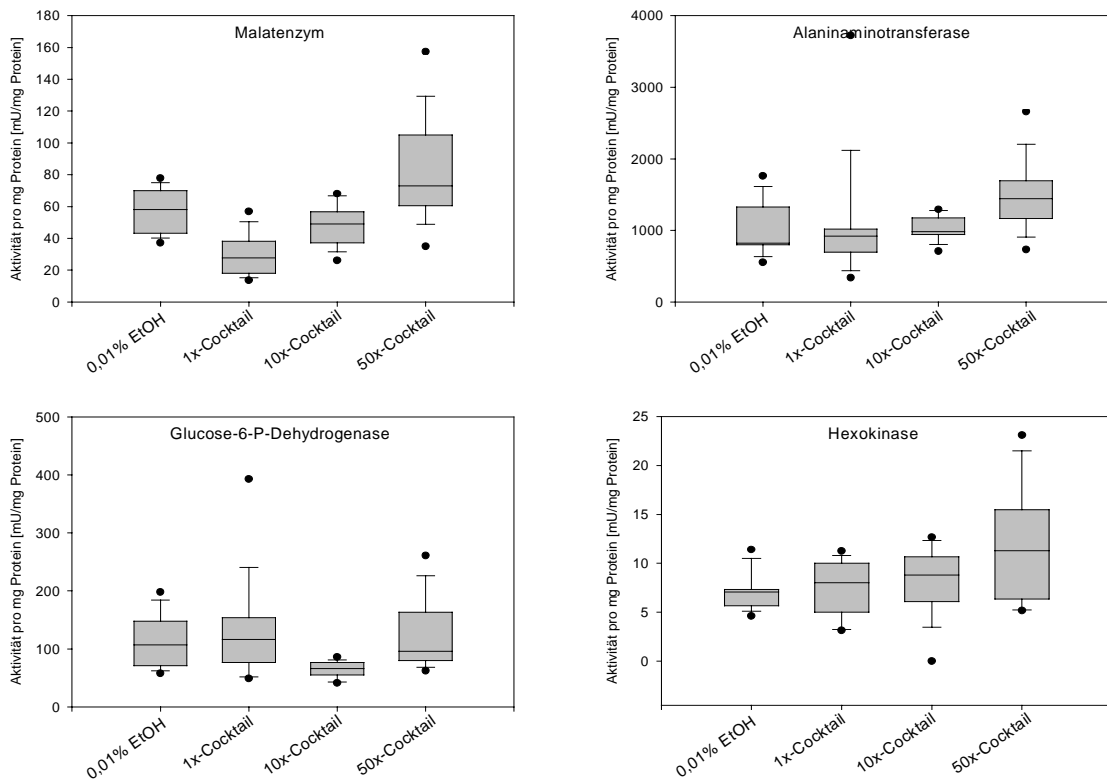


Abb. 5.2.3 Spezifische Aktivität von Alaninaminotransferase, Hexokinase, Glucose-6-P-Dehydrogenase und Malatenzym nach 4-wöchiger Exposition gegenüber der 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen mittleren Schadstoffkonzentration der Körsch, n = 10; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Glucose-6-P-Dehydrogenase und Hexokinase. Die 10-fache Schadstoffdosis bewirkte bei der Glucose-6-P-Dehydrogenase einen deutlichen Einbruch sowohl in der totalen als auch der spezifischen Aktivität auf unter 60 % der Referenz (p < 0,01), der jedoch weder durch die höchste noch durch die niedrigste Dosis bestätigt wurde (Abb. 5.2.3). Die Hexokinase lies dagegen nur eine tendenzielle, dosisabhängige Steigerung der spezifischen Aktivität erkennen.

Esterase. Im Gegensatz zu den Halbfreilandexpositionen, bei denen die Aktivität an der Körsch überwiegend stark gehemmt war, zeigte sich die mikrosomale Esterase durch die Exposition gegenüber den verschiedenen Schadstoffcocktails im Labor unbeeinflusst (Tab. 5.2.2).

5. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 5.2.2 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 4-wöchiger Exposition im Labor. Bezug: mU/mg Protein; (Saure Phosphatase: U/mg Protein)

Mai '97	EtOH 0,01%	1x-Cocktail	10x-Cocktail	50x-Cocktail
Gehirn:				
Acetylcholinesterase	140 ± 63,2	108 ± 29,7	132 ± 41,1	126 ± 35,8
Cytochrom C-Oxidase	18,4 ± 6,72	19,4 ± 5,50	14,4 ± 6,62	14,5 ± 5,24
Leber:				
Cytochrom C Oxidase	7,60 ± 5,71	5,93 ± 2,10	7,13 ± 3,11	6,16 ± 1,23*
Succinatdehydrogenase	17,1 ± 5,01	22,01 ± 3,52	18,4 ± 4,33	8,33 ± 5,79*
Saure Phosphatase	3,55 ± 1,49	4,43 ± 1,44	2,92 ± 0,77	2,79 ± 0,68
Katalase	30,6 ± 12,8	49,0 ± 18,1***	46,4 ± 13,1**	47,8 ± 16,0***
Alaninaminotransferase	1044 ± 387	1080 ± 877	1029 ± 177	1482 ± 508*
Glucose-6-P-Dehydrogenase	115 ± 47	133 ± 92	65 ± 14**	123 ± 63
Malatenzym	58,1 ± 14,2	29,8 ± 13,6***	47,8 ± 13,1	82,8 ± 33,3*
Hexokinase	7,16 ± 1,97	7,46 ± 2,90	8,20 ± 3,60*	11,68 ± 6,26
Esterase	612 ± 209	690 ± 261	688 ± 281	760 ± 285

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n < 9 Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Ethanolkontrolle und den Cocktails wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 5.2.3 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 4-wöchiger Exposition im Labor. Bezug mU/g Organ; (Saure Phosphatase: U/g Organ).

	EtOH 0,01%	1x-Cocktail	10x- Cocktail	50x- Cocktail
Gehirn:				
Acetylcholinesterase	109594 ± 29871	75581 ± 24591	77161 ± 16388	78455 ± 13938
Cytochrom C Oxidase	4555 ± 1009	3719 ± 824	4214 ± 1745	3642 ± 266 *
Leber:				
Cytochrom C Oxidase	372 ± 95,5	374 ± 87,7	390 ± 229	329 ± 133*
Succinatdehydrogenase	363 ± 78,8	306 ± 98,8*	276 ± 79,0*	231 ± 51,9***
Saure Phosphatase	92,7 ± 45,1	106 ± 47,5	94,9 ± 47,7	62,6 ± 30,1
Katalase	1152 ± 426	1021 ± 361	1081 ± 456	991 ± 338
Alaninaminotransferase	31113 ± 10307	22254 ± 10138	31898 ± 17901	35717 ± 16481
Glucose-6-P-Dehydrogenase	3571 ± 1796	3071 ± 1012	2083 ± 1474**	2855 ± 1280
Malatenzym	1818 ± 697	1697 ± 1128	1428 ± 744	2230 ± 1042
Hexokinase	232 ± 104	205 ± 68	289 ± 121	254 ± 105
Esterase	18201 ± 6732	16519 ± 4068	20424 ± 10702	16278 ± 5178

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/g Organ ± Standardabweichung in n < 9 Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Ethanolkontrolle und den Cocktails wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

5.3 Diskussion

Um unter den vielfältigen Einflüssen zahlreicher nicht bestimmbarer bzw. nicht zu kontrollierender Parameter die Wirkung der in der Körsch vorgefundenen Schadstoffbelastung auf die Aktivitäten der ausgewählten Biomarker zu untersuchen, wurden Bachforellen für 4 Wochen einem Körschcocktail der 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen durchschnittlichen Körschkonzentration unter Laborbedingungen exponiert. Für die ausgewählten Stoffwechsellenzyme konnte in der Mehrzahl eine Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl auf der Bezugsebene Aktivität /mg Protein als auch bezogen auf Aktivität/g Organ gefunden werden. Statistisch signifikante Dosis-Wirkungsbeziehungen fanden sich bei Succinatdehydrogenase, Katalase, Alaninaminotransferase; Dosis-Wirkungsbeziehungen tendenzieller Art ergaben sich bei Cytochrom C Oxidase (Leber und Gehirn), Saure Phosphatase, Hexokinase, Phosphofruktokinase, Malatenzym, Glucose-6-P-Dehydrogenase und Esterase. Die Eignung der ausgewählten Stoffwechsellenzyme sowie Vergleiche mit in der Literatur beschriebenen Effekten wurde bereits im Zusammenhang mit den Bypassexpositionen von Bachschmerle und Bachforelle in Kapitel 3.1 ausführlich diskutiert.

Unabhängig davon, ob die katalytische Aktivität der Enzyme induziert oder inhibiert wurde, musste für eine ganze Reihe von Enzymen offensichtlich ein Belastungsschwellenwert überschritten werden, um signifikante Aktivitätsveränderungen gegenüber der Lösungsmittelreferenz hervorzurufen. So zeigten Esterase, Hexokinase, Malatenzym, Alaninaminotransferase und Succinatdehydrogenase in ihrer spezifischen Aktivität erst bei der 50-fachen Cocktailkonzentration eine deutliche Aktivitätsänderung.

Von der Exposition unbeeinflusst blieb grundsätzlich die Acetylcholinesterase aus dem Gehirn der Versuchstiere. Dies entsprach weitgehend den Erwartungen, da die Aktivität Acetylcholinesterase v. a. auf Kontaminationen mit Carbamaten und Organophosphaten anspricht (Abiola *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1997; Lundebye *et al.*, 1997; Sancho *et al.*, 1997a; Sancho *et al.*, 1997b; Sancho *et al.*, 1998; Vandekar, 1980), die in den Cocktails ebenso wie in der Körsch nicht enthalten waren.

Ein weiterer Aspekt betrifft den Zusammenhang zwischen den erzielten Markerantworten und dem Akkumulationsverhalten der Schadstoffe einerseits und den Markerantworten unter Halbfreilandbedingungen der exponierten Bachforellen andererseits.

Zunächst ist auffallend, dass ein Großteil der akkumulierten Pestizide auf Lindan zurückging, welches das Bild der Pestizide stark verzerrte (Abb. 5.3.1.c). Nimmt man Lindan aus der Gesamtsumme der Pestizide heraus, so rücken die übrigen Pestizide sehr viel näher an die unter Halbfreilandbedingungen akkumulierten Chemikaliemengen heran (Abb. 5.3.1.c). Dabei zeigte sich, dass bereits die 1-fache Cocktailkonzentration bis auf den PCB-Wert ausreichte, die exemplarisch für Juli '98 dargestellten Freilandwerte (Abb. 5.3.1.a) für PAHs und Pestizide am Krähenbach und der Aich zu übertreffen. Der Vergleich zu den Bachforellen des Körschbypasses (Abb. 5.3.1.b) zeigt, dass die Pestizidwerte ebenfalls bereits durch den 1-fachen Cocktailansatz erreicht wurden. Vergleichbare PCB- und PAH-Belastungen wurden dagegen

5. Ergebnisse und Diskussion

erst durch den 10-fachen bzw. 50-fachen Cocktailansatz erreicht, bzw. dann sogar überschritten. Interessanterweise konnten vergleichbare Pestizid-, PCB- und PAH-Werte zur Bachschmerle erst mit dem 50-fachen Cocktailansatz erreicht werden. Derartige Unterschiede im Akkumulationsverhalten sind möglicherweise auf die benthische Lebensweise der Bachschmerlen und den direkten Kontakt zum im Vergleich zur Wasserphase höher belasteten Sediment zurückzuführen.

Es stellt sich daher die Frage, warum bei einer vergleichbaren oder überschrittenen Belastung der Bachforellen im Laborexperiment die biochemischen Veränderungen insgesamt deutlich hinter den Halfreilandergebnissen zurückblieben. Interessanterweise konnten auch bei den histopathologischen Untersuchungen (Schwaiger *et al.*, 1998) sowie den Untersuchungen zur Biotransformation (Behrens and Segner, 1998) keine oder nur geringfügige Veränderungen bzw. Induktionsantworten nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass ein Großteil der Chemikalien im Fettgewebe angereichert, dort deponiert und so dem allgemeinen Metabolismus zunächst entzogen wurde. Die geringe Induktionswirkung der Biotransformationsenzyme sowie der an Entgiftungsprozessen beteiligte Esterase (Arnold, 1995; Funari *et al.*, 1987; Kaur *et al.*, 1983; Soldano *et al.*, 1992) und der Katalase, einem Indikator für oxidativen Stress (Bai-

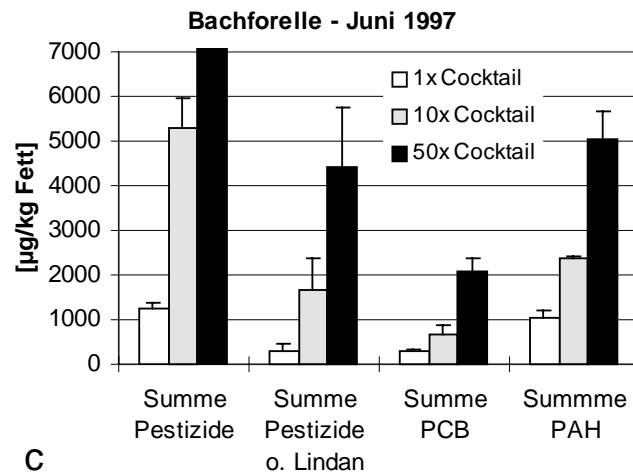
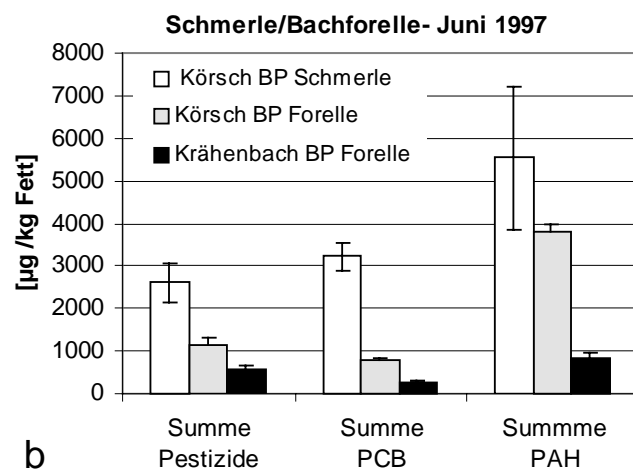
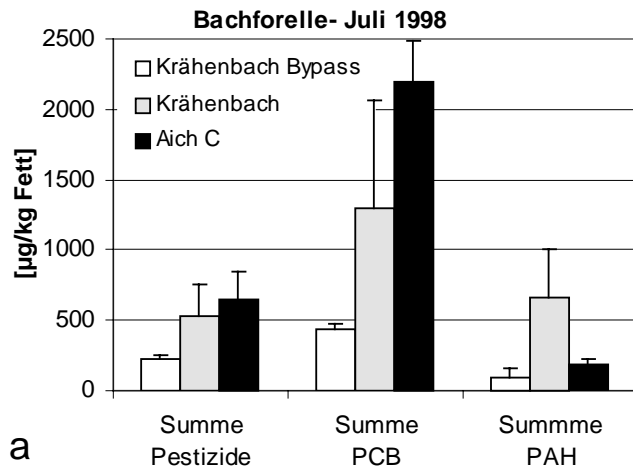


Abb. 5.3.1 a) Akkumulierte Chemikalien in Bachforellen aus dem Freiland und dem Bypass b) Bypasswerte der akkumulierten Chemikalien in Bachschmerle (Körsch) und Bachforelle (Körsch u. Krähenbach) c) Akkumulationswerte der Chemikalien (mit/ohne Lindan) in Bachforellen nach 4-wöchiger Laborexposition gegenüber einem 1-fachen, 10-fachen und 50-fachen Körschcocktail (Daten: Honnen *et al.*, 1998)

ny *et al.*, 1996; DiGiulio *et al.*, 1993; Mather-Mihaich *et al.*, 1991; Mather-Mihaich *et al.*, 1986; Winston *et al.*, 1991; Winston *et al.*, 1991) untermauern die These.

Eine andere mögliche Erklärung könnte in der geringen Dosierung der Schadstoffe liegen. So erreicht die Dosierung vieler Einzelsubstanzen im 50-fach dotierten Cocktail vielfach erst Werte von 0,05 - max. 5 µg/L. Für Expositionversuche mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) und polychlorierte Biphenyle (PCBs) dürfte hiermit gerade die untere Belastungsgrenze für die Induktion einer Reaktion erreicht worden sein. Zahlreiche chronisch ausgerichtete Belastungsstudien operieren mit Konzentrationen von durchschnittlich 0,5 µg - 25 mg/L. Bei chronisch toxischen Untersuchungen mit Dinitro-*o*-Kresol (DNOC), Lindan (Braunbeck *et al.*, 1990b; Braunbeck and Völkl, 1991), Bis-(tris-*n*-butylzinn)oxid (TBTO) (Schwaiger *et al.*, 1992), Atrazin (Egaas *et al.*, 1993; Neskovic *et al.*, 1993) lagen die eingesetzten Einzelstoffkonzentrationen bei 1 µg/L bis 6 mg/L. Vielfach setzten in diesen Studien erst in Konzentrationen jenseits von 1 µg/L signifikante Veränderungen der untersuchten Marker (Braunbeck *et al.*, 1990b; Braunbeck and Völkl, 1991) ein. Dies steht im Einklang mit eigenen Befunden: So traten bei den untersuchten Stoffwechsellenzymen deutliche Antworten vielfach erst bei Belastung mit dem 50-fachen Cocktail auf, wie die Beispiele Succinatdehydrogenase, Alaninamino-transferase oder Phosphofruktokinase für die spezifische Aktivität belegen.

Eine weiterer Aspekt ist, dass bei subletal-chronischer Belastung Enzymaktivitäten zunächst wie bei akut toxischen Belastungsszenarien ansteigen bzw. inhibiert werden, um bei fortschreitender Belastung auf das Kontrollniveau zurückfallen (Bucher and Hofer, 1990; Neskovic *et al.*, 1993). Dafür spricht auch die Beobachtung, dass bei chronischer Belastung einige Fischarten noch durchaus normale Blutenzymwerte aufweisen, während sensible Arten bereits verdrängt wurden bzw. auf ultrastruktureller Ebene deutliche Schädigungen in Leber und Niere aufwiesen (Bucher and Hofer, 1990). Möglicherweise werden aufgrund von Adaptionsprozessen bestimmte Enzyme/Enzymsysteme nur bei Bedarf, z. B. einer erhöhten Belastungsphase, kompensatorisch induziert (Calow, 1991). Im Gegensatz zu den biochemischen *In vivo*-Befunden der Bachforelle konnte (Strmac and Braunbeck, 1999b) in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle signifikante Veränderungen in den entsprechenden Stoffwechsellenzymen der *In vivo*-Untersuchungen nach Belastung mit nativem Körschwasser aufzeigen. Dieser scheinbar widersprüchliche Befund zu den *In vivo*-Ergebnissen könnte neben der höheren Empfindlichkeit der Hepatocyten v. a. auf die kurze Belastungszeit von max. 5 Tagen, in denen die Enzymreaktionen ausgebildet werden, zurückgeführt werden. Eine Belastung über mehrere Wochen ist aufgrund der begrenzten Lebensdauer des *In vitro*-Testsystems nicht durchführbar. Zudem liegt im Freiland eine diffuse inhomogene Belastung vor, in der Belastungs- und Entspannungsphasen miteinander abwechseln. Eine erneute Belastung nach einer Entspannungsphase könnte somit von Neuem Induktionswirkung auf die Enzymsysteme bzw. -aktivitäten haben. Diese neuerliche Induktionswirkung ist bei chronischen Belastungsszenarien nicht gegeben, so dass selbst eine geringere Schadstoffbelastung im Freiland deutli-

5. Ergebnisse und Diskussion

chere Reaktionen in den Enzymaktivitäten hervorrufen kann, die im Laborexperiment bei chronischer Belastung nur mit sehr viel höheren Schadstoffdosen zu erreichen ist.

6. Schadstoffbelastung von Bachforellen bei steigenden Ammoniakkonzentrationen

In vivo-Belastungsexperimente mit Bachforellen

Zusammenfassung: Im vorliegenden Experiment wurde der Einfluss von Ammoniak in zwei Expositionsansätzen auf die als Biomarker ausgewählten Stoffwechsellzyme in Bachforellen untersucht. Forellengruppe 1 wurde nur Ammoniak (10 - 50 mg/L, zu Versuchsende ansteigend) exponiert. Gruppe 2 wurde zusätzlich zum Ammoniak, einem 10-fachen Körschcocktail exponiert. Als Referenz diente eine Lösungsmittelgruppe. Insgesamt hatte der Ammoniak eine schwach induzierende Wirkung auf die Stoffwechsellzyme. Während die Cocktailexposition in den durchgeführten Schadstoffkonzentrationen meist nur geringfügige Veränderungen in den Markern hervorrief, waren die Aktivitäten der Succinatdehydrogenase, Cytochrom C Oxidase und Malatenzym um ca. 50 - 150 % erhöht. Die Kombinationsexposition führte bei Superoxiddismutase und Katalase zu einer deutlich herabgesetzten Aktivität, dagegen erhöhten sich Esterase- und Cytochrom C Oxidase-Werte signifikant. Generelle synergistische oder antagonistische Effekte auf die Schadstoffexposition konnten durch den zusätzlichen Ammoniakeintrag nicht abgeleitet werden.

6.1 Einleitung

Bedingt durch den hohen Anteil an Abwasser aus Kläranlagenausläufen aus der Körsch (vgl. Kap. 2.1), der in Trockenperioden bis zu 80 % des gesamten Bachwassers ausmachen kann, ergaben sich im Vergleich zum Krähenbach und dem Labor über den gesamten Untersuchungszeitraum (1995 - 1999) deutlich erhöhte Ammonium-, Nitrat- und Nitritwerte in der Körsch. Nitrit entsteht als Zwischenprodukt der bakteriellen Nitrifikation und aus Denitrifikationsprozessen (Jensen, 1995). Gerade hohe Nitritwerte ($> 0,1$ mg/L) sind als kritisch zu betrachten, da sie über ein erhebliches Toxizitätspotential verfügen (Vedel *et al.*, 1998). Besonders bei Vertebraten, aber auch einigen Invertebraten, deren Sauerstofftransport über Hämoglobin gesteuert wird, kann Hämoglobin unter Nitriteinfluss zu Methämoglobin oxidiert werden (Jensen *et al.*, 1987; Vedel *et al.*, 1998), wodurch die Bindungsaffinität gegenüber Sauerstoff stark verringert und der O_2 -Transport im Körper unterbunden wird; im Extremfall kann Anämie auftreten. Als sehr fischtoxisch gilt auch Ammoniak, der anteilig ebenfalls in Kläranlagenausläufen vorkommt. Bereits bei Konzentrationen unter 0,01 mg/L Ammoniak werden bei sensiblen Arten toxische Effekte beobachtet (Linton *et al.*, 1998b). Neben einer speziesspezifischen Abhängigkeit wird die Toleranz gegenüber Nitrit, Ammonium und Ammoniak aber auch von Alter, pH-Wert und der Temperatur beeinflusst (Knoph, 1992; Person-LeRuyet *et al.*, 1997a).

Zahlreiche Untersuchungen belegen den (toxischen) Einfluss der genannten Stickstoffverbindungen auf Krebse und Fische. Während jedoch pathologische Effekte durch ultrastrukturelle Untersuchungen mehrfach gezeigt werden konnten (Schmidt *et al.*, 1999; Soderberg, 1985; Thurston *et al.*, 1984), ist das Wissen zum Verhalten von Stoffwechsellzyme ausgesprochen gering (Bucher and Hofer, 1990; Linton *et al.*, 1998a; Linton *et al.*, 1998b). Die im folgenden

beschriebene Versuchsreihe wurde so konzipiert, unter kontrollierten Laborbedingungen nachteilige und toxische Effekte der Stickstoffverbindungen im Zusammenspiel mit der vorhandenen Schadstoffbelastung der Körsch auf die ausgewählten Biomarker aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden juvenile Bachforellen in der Versuchsanlage Wielenbach des Bayerischen Landesamts für Wasserforschung einem 10-fach dosiertem Schadstoffcocktail, der sich an den Inhaltsstoffen der Körsch orientierte sowie über den Versuchszeitraum steigenden Ammoniakkonzentrationen exponiert. Die Zusammensetzung des Körsch-Cocktails entspricht der in Kap. 2.3 beschriebenen Cocktailkonzentrationen.

6.2 Ergebnisse

Der Leber-somatische Index und der Konditionsfaktor der Bachforellen zeigten keine signifikanten Unterschiede nach 4-wöchiger Exposition (Tab. 6.2.1).

Tab. 6.2.1 Konditionsfaktor (CF) und Leber-somatischer Index (LSI) von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) nach Belastung gegenüber dem Körsch-Cocktail und einer gesteigerten Ammoniakbelastung sowie der Kombinationsbelastung aus Cocktail und Ammoniak.

Exposition	LSI	CF
Lösungsmittel	1,45 ± 0,38	0,92 ± 0,06
Ammoniak	1,28 ± 0,33	0,91 ± 0,07
Cocktail	1,52 ± 0,47	0,94 ± 0,04
Cocktail + Ammoniak	1,31 ± 0,24	0,90 ± 0,06

Gehirn - Acetylcholinesterase und Cytochrom c Oxidase. Im Gehirn der Bachforellen konnte für die Enzyme Acetylcholinesterase und die Cytochrom C Oxidase eine erhöhte Gesamtaktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden, wobei der Unterschied bei den Ammoniak-exponierten Tieren höher ausfiel ($p < 0,05$; Tab. 6.2.1). Für die spezifische Aktivität konnten keine Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle aufge-

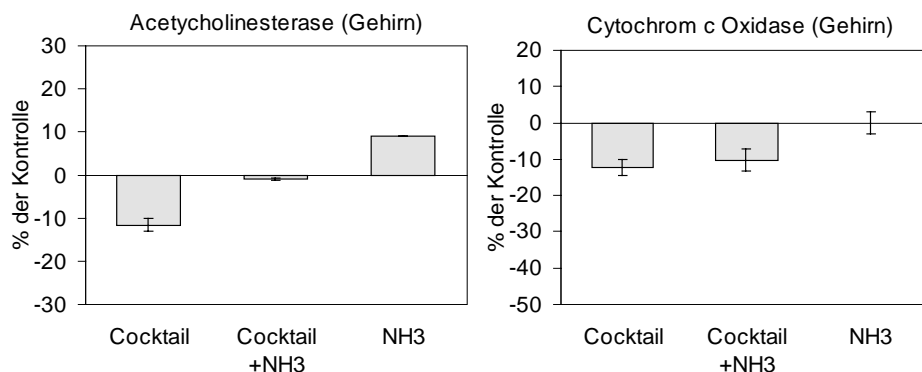


Abb. 6.2.1 Spezifische Aktivitäten der Acetylcholinesterase und der Cytochrom C Oxidase aus dem Gehirn von Bachforellen nach 4-wöchiger Schadstoffexposition gegenüber einem 10-fach konzentriertem Körsch-Cocktail sowie einer über die Expositionszeit ansteigenden Ammoniakkonzentration, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

zeigt werden (Abb. 6.2.1). Die Kombination Ammoniak und Schadstoffcocktail führte zu keiner signifikanten Aktivitätsveränderung.

Leber - Cytochrom C Oxidase, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase. Eine Zunahme sowohl der spezifischen als auch der totalen Aktivität ließ sich auch für die in den Mitochondrien lokalisierte Cytochrom C Oxidase der Leber nach Belastung mit dem Schadstoffcocktail und der Kombination Cocktail / Ammoniak beobachten ($p < 0,01 - 0,001$; Abb. 6.2.2). Citratsynthase und Succinatdehydrogenase des Citratzyklus zeigten dagegen z. T. gegenläufige Reaktionen: Während bei beiden Enzymen die spezifische Aktivität bei der Cocktail-Ammoniakbelastung signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zurückging ($p < 0,01$), nahm die Citratsynthaseaktivität bei den Tieren des Cocktails um 146 % zu, bei der Succinatdehydrogenase jedoch leicht ab. Eine Auswirkung des reinen Ammoniakansatzes auf die drei mitochondrialen Enzyme konnte dagegen nicht beobachtet werden (Abb. 6.2.2).

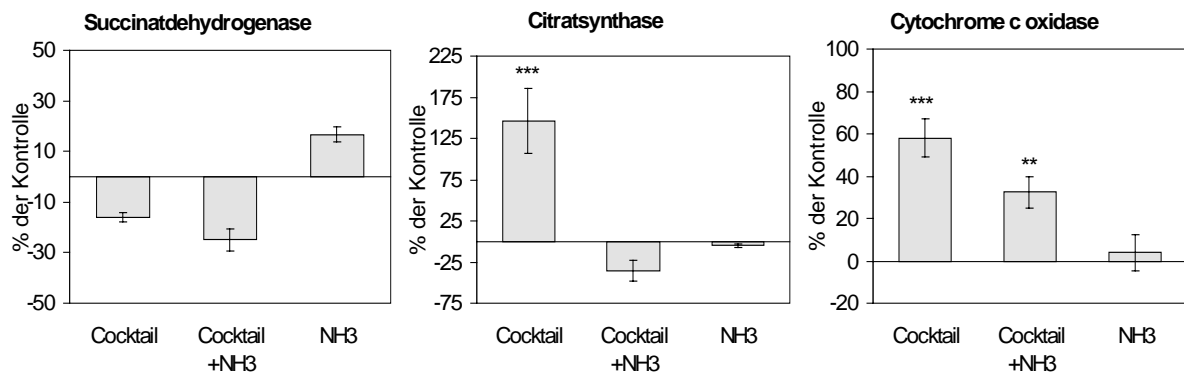


Abb. 6.2.2 Spezifische Aktivitäten von Succinatdehydrogenase, Citratsynthase und Cytochrom C Oxidase aus der Leber von Bachforellen nach 4-wöchiger Schadstoffexposition gegenüber einem 10-fach konzentriertem Korsch-Cocktail sowie einer über die Expositionszeit ansteigenden Ammoniakkonzentration, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Katalase, Superoxiddismutase und Saure Phosphatase: Eine gute Übereinstimmung konnte zwischen den dem oxidativen Stress entgegen wirkenden Enzymen Superoxiddismutase und Katalase beobachtet werden: Die Cocktailexposition ergab unveränderte bzw. leicht reduzierte Werte bei beiden Enzymen gegenüber der DMSO-Referenz. Während Ammoniak allein für eine erhöhte spezifische als auch Gesamtaktivität verantwortlich war ($p < 0,05$; Tab 6.2.3.), führte der Kombinationsversuch mit Ammoniak und Schadstoffcocktail zu einem Aktivitätseinbruch auf beiden Bezugsebenen ($p < 0,001$; Abb. 6.2.3). Ähnliche Veränderungen der Aktivität konnten auch für die Saure Phosphatase nachgewiesen werden: Erneut bewirkte Ammoniak deutlich stärkere Abweichungen von der Referenz, während der Kombinationsversuch zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität führte (Abb. 6.2.3).

6. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 6.2.2 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 4-wöchiger Belastung gegenüber einem Körsch-Schadstoffcocktail, Ammoniak sowie einer Kombination Schadstoffcocktail/Ammoniak im Labor. Bezug: mU/mg Protein (Saure Phosphatase: U/mg Protein)

	DMSO	Cocktail	Cocktail + Ammoniak	Ammoniak
Acetylcholinesterase	112 ± 25	99 ± 13	111 ± 36	122 ± 36
Cytochrom C Oxidase	2,54 ± 0,84	2,23 ± 0,4	2,28 ± 0,68	2,53 ± 0,98
Leber:				
Cytochrom C Oxidase	4,85 ± 1,14	7,66 ± 1,21***	6,42 ± 1,46*	5,04 ± 1,73
Succinatdehydrogenase	7,44 ± 1,29	6,24 ± 0,66*	5,58 ± 0,96**	8,68 ± 1,61
Citratsynthase	5,84 ± 1,49	14,38 ± 3,89***	3,75 ± 1,37**	5,55 ± 2,15
Saure Phosphatase	6,31 ± 1,52	6,29 ± 1,43	4,89 ± 0,91*	8,41 ± 1,85*
Katalase	48,57 ± 4,72	43,1 ± 3,57*	37,9 ± 5,1***	57,15 ± 8,44*
Alaninaminotransferase	11166 ± 6603	10513 ± 5515	14877 ± 7051	13987 ± 5806
Glucose-6- Phosphatdehydrogenase	1660 ± 1049	1975 ± 883	1895 ± 927	2203 ± 1762
Phosphofruktokinase	106 ± 47,2	100 ± 50,8	112 ± 78,9	133 ± 111
Malatenzym	551 ± 296	803 ± 376 *	784 ± 342	1002 ± 756
Hexokinase	984 ± 421	887 ± 407	1055 ± 386	1230 ± 797
Esterase	2866 ± 1182	3438 ± 1303	4270 ± 1485	4779 ± 3418
Superoxiddismutase	23,2 ± 4,1	24,19 ± 2,93	11,46 ± 3,46***	28,6 ± 7,35*

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung, n = 10 - 12 Proben. Die Statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Lösungsmittelkontrolle und den Expositionsszenarien wurde mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 6.2.3 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 4-wöchiger Belastung gegenüber einem Körsch-Schadstoffcocktail, Ammoniak sowie einer Kombination Schadstoffcocktail/Ammoniak im Labor. Bezug: mU/g Organ (Saure Phosphatase: U/g Organ)

	DMSO	Cocktail	Cocktail + Ammoniak	Ammoniak
Acetylcholinesterase	14078 ± 5215	20599 ± 5441*	16176 ± 6620	30098 ± 13274***
Cytochrom C Oxidase	297 ± 96,0	467 ± 193	290 ± 94,0	537 ± 255*
Leber:				
Cytochrom C Oxidase	857 ± 242	1525 ± 284***	1645 ± 566***	939 ± 276
Succinatdehydrogenase	1306 ± 280	1247 ± 221	1420 ± 343	1674 ± 474
Citratsynthase	1048 ± 358	3194 ± 1205***	933 ± 311	1083 ± 386
Saure Phosphatase	1147 ± 346	1312 ± 480	1247 ± 328	1655 ± 617
Katalase	7718 ± 3218	8658 ± 1585	9724 ± 2468	11020 ± 2703*
Alaninaminotransferase	166368 ± 86355	137807 ± 64925	215389 ± 81455	234843 ± 121886
Glucose-6- Phosphatdehydrogenase	23908 ± 9603	26958 ± 12660	28081 ± 11083	33087 ± 15002
Phosphofruktokinase	1641 ± 881	1403 ± 789	1639 ± 1083	1488 ± 1023
Malatenzym	8299 ± 3606	10623 ± 4546**	11411 ± 3864 *	15391 ± 7556 *
Hexokinase	419 ± 114	513 ± 142	496 ± 160	881 ± 514*
Esterase	42511 ± 10873	46843 ± 20658	64890 ± 23054**	62209 ± 31156
Superoxiddismutase	4093 ± 1138	4895 ± 1157*	2680 ± 1206**	5510 ± 1734*

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Leber bzw. Gehirn ± Standardabweichung, n = 10 - 12 Proben. Die Statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Lösungsmittelkontrolle und den Expositionsszenarien wurde mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

6. Ergebnisse und Diskussion

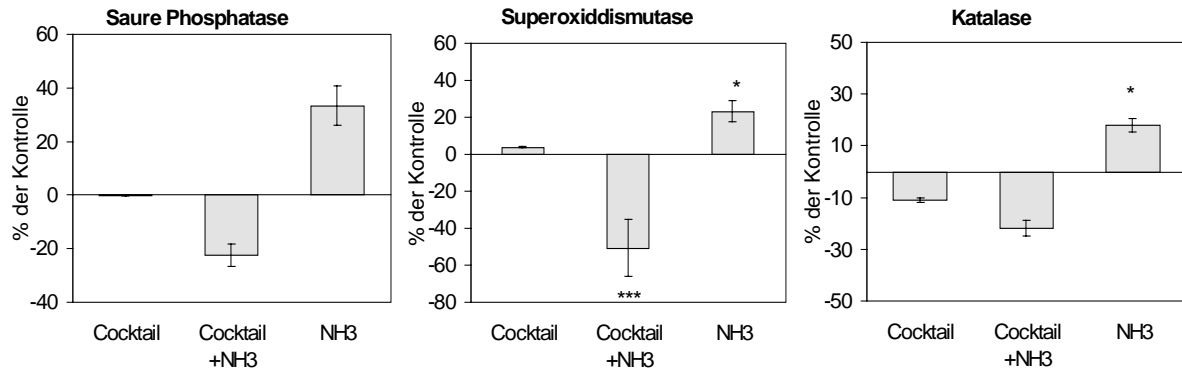


Abb. 6.2.3 Spezifische Aktivitäten von Sauren Phosphatase, Superoxiddismutase und Katalase aus der Leber von Bachforellen nach 4-wöchiger Schadstoffexposition gegenüber einem 10-fach konzentriertem Körsch-Cocktail sowie einer über die Expositionszeit ansteigenden Ammoniakkonzentration, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Alaninaminotransferase, Malatenzym und Phosphofruktokinase. Signifikante Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle konnten für die Alaninaminotransferase und die Phosphofruktokinase nicht nachgewiesen werden, jedoch neigten die Cocktail-exponierten Tiere zu verringerten Aktivitäten, während Tiere des Kombinations- und Ammoniakansatzes mehr zu einer Induktion relativ tendierten.

Auf Proteinebene wies das Malatenzym lediglich bei der Cocktailexposition eine signifikante Steigerung der Aktivität auf ($p < 0,05$, Abb. 6.2.4), während der Bezug auf die Gesamtaktivität sowohl bei der Kombination als auch bei der reinen Ammoniakexposition deutlich erhöhte Werte erkennen ließ ($p < 0,05 - 0,01$).

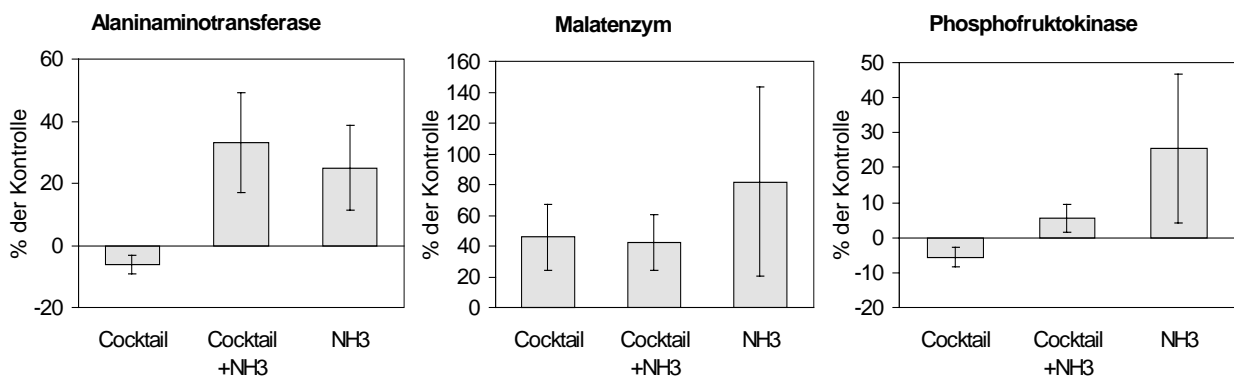


Abb. 6.2.4 Spezifische Aktivitäten der Alaninaminotransferase, Phosphofruktokinase und des Malatenzyms aus der Leber von Bachforellen nach 4-wöchiger Schadstoffexposition gegenüber einem 10-fach konzentriertem Körsch-Cocktail sowie einer über die Expositionszeit ansteigenden Ammoniakkonzentration, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney

Esterase, Hexokinase und Glucose 6-P-Dehydrogenase. Tendenziell konnte auch bei diesen drei Enzymen eine erhöhte Induktionswirkung des Ammoniak beobachtet werden. Bei der

6. Ergebnisse und Diskussion

Hexokinase überstieg der Ammoniakwert um mehr als das 2-fache den Wert der DMSO-Kontrolle (bezogen auf die Gesamtaktivität; Abb. 6.2.5), und auch bei der Glucose-6-P-Dehydrogenase konnte eine ausgeprägte, wenn auch nicht signifikante Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Halbfreilandexpositionen, bei denen meist eine deutlich verringerte Aktivität an der stärker belasteten Körsch nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. 3.1.2), wurde für die Esterase unter Laborbedingungen eine deutliche Induktionswirkung der Kombination Ammoniak/Schadstoffcocktail ($p < 0,01$) sowie des Ammoniaks beobachtet (bezogen auf die Gesamtaktivität; Abb. 6.2.5). Die alleinige Cocktailexposition der Bachforellen ergab für die Esterase, Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase keine signifikanten Aktivitätsveränderungen relativ zur Kontrolle.

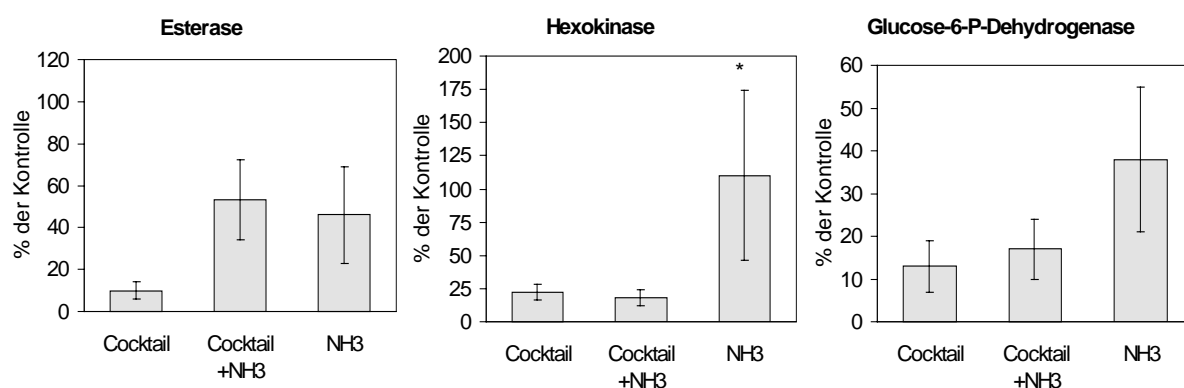


Abb. 6.2.5 Gesamtaktivitäten der Esterase, Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase aus der Leber von Bachforellen nach 4-wöchiger Schadstoffexposition gegenüber einem 10-fach konzentriertem Körsch-Cocktail sowie einer über die Expositionszeit ansteigenden Ammoniakkonzentration, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney

6.3 Diskussion

Die hohen Werte an toxischen anorganischen Stickstoffverbindungen der Körsch (Nitrit, Ammonium, Ammoniak) infolge des hohen Zustroms an Wasser aus Kläranlagenausläufen waren Anlass, den Einfluss auf diese neben den Chemikalien vorhandene anthropogene Gewässerbelastung aus Siedlung und Industrie auf Bachforellen zu untersuchen. Durchschnittswerte der Stickstoffverbindungen sind in Tab. 6.3.1 zusammengestellt, wobei deutlich wird, dass die Werte an der Körsch meist um eine Zehnerpotenz über den Werten des Krähenbach liegen.

Tab.6.3.1 Durchschnittliche Stickstoffbelastung der Untersuchungsgewässer zwischen 1995 - 1999

	NH ₃ [mg/L]	NH ₄ ⁺ [mg/L]	NO ₂ ⁻ [mg/L]
Körsch	0,013 ± 0,03	0,45 ± 0,5	0,35 ± 0,5
Krähenbach	< 0,001 ± 0,001	0,035 ± 0,06	0,03 ± 0,3
Labor	< 0,001 ± 0,001	0,035 ± 0,07	0,07 ± 0,03

Der experimentelle Ammoniak eintrag (0,01 - 0,05 mg/L) ergab, von Expositionsbeginn bis Expositonsende ansteigend, in den Aquarien Ammonium-Konzentrationen von 1,1- 4,2 mg/L. Damit lagen die Werte deutlich unterhalb der bei 10 ± 1 ° C Wassertemperatur für Regenbogenforellen akut toxischen Grenze von 0,9 mg/L für Ammoniak bzw. 31,7 mg/L für Ammonium (Albaster and LLoyd, 1980; Linton *et al.*, 1998a; Linton *et al.*, 1998b); Tab. 6.3.2), jedoch in Bereichen, in denen Effekte für Teleosteer bereits beschrieben wurden (Tab. 6.3.3).

Keine erhöhte katalytische Aktivität zeigten im Gehirn die Acetylcholinesterase (ACHE) und die Cytochrom C Oxidase (COX) sowie in der Leber die mitochondrialen Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklus, COX bzw. Succinatdehydrogenase (SDH) und Citratsynthase (CS). Stoffwechsellenzyme, die im Zusammenhang mit erhöhten $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen gemessen wurden, umfassen v. a. die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Es handelt sich um Enzyme, die in der Stickstoffregulierung über den Aminosäureabbau involviert sind und deren Zwischenprodukte Pyruvat, Ketoglutarat, Fumarat, Succinyl-CoA, Oxalacetat entweder zum Aufbau von Glucose genutzt oder im Citratzyklus oxidiert werden. Unterschiedliche Befunde liegen jedoch zum Induktionsverhalten vor: Regenbogenforellen zeigten unter 1,26 mg/L Ammonium in Kombination mit einer um 2° C erhöhten Wassertemperatur einen drastischen Rückgang der Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase und der GOT (Linton *et al.*, 1998b). Reduzierte GOT- und GPT-Werte werden auch für Seebrassen, Steinbutt und Regenbogenforelle durch Le Ruyet *et al.* 1998 und Vedel *et al.* 1998 beschrieben (vgl. Tab. 4.5.3), während Bucher und Hofer 1990 unterhalb von Kläranlagenausläufen in Bachforellen keine veränderten GOT bzw. GPT- Aktivitäten feststellen konnten. Die reduzierten bzw. unveränderten GOT bzw. GPT- Aktivitäten lassen keine erhöhte Aktivität des Citratzyklus erwarten und decken sich mit den eigenen Befunden der SDH zur Ammoniak-Exposition der Bachforellen.

Die erhöhten Werte von Superoxiddismutase und Katalase des Ammoniak- und Cocktailansatzes (bezogen auf die totale Aktivität) sprechen für eine Zunahme von oxidativem Stress infolge von Entgiftungsprozessen, die zu einem Anstieg von O_2^- -Radikalen führen können. Dem schädigenden Einfluß von O_2^- -Radikalen wirken Katalase und Superoxiddismutase entgegen (vgl. Diskussion Kap. 3.3), indem sie O_2^- -Radikale letztlich zu Wasser und Sauerstoff abbauen. Während auf Proteinebene im Kombinationsansatz Ammoniak/Cocktail eine signifikante verringerte Aktivität der Superoxiddismutase und Katalase festzustellen war, nahm die Zahl der Peroxisomen (Gernhöfer und Triebskorn, unveröffentlichte Daten) sowie die totale Aktivität der Katalase zu. Möglicherweise ist dieser scheinbar widersprüchliche Effekt im Sinne einer Kompensationsreaktion für den Aktivitätsverlust der Katalase auf Proteinebene zu interpretieren.

Die erhöhte Aktivität der Sauren Phosphatase kann einer auf Ultrastruktureller Ebene beobachteten Proliferation von Lysosomen (Gernhöfer und Triebskorn, unveröffentlichte Daten) gewertet werden. Die Proliferation von Lysosomen stellt wahrscheinlich eine allgemeine adaptive Reaktion an einen erhöhten Umsatz zellulärer Komponenten unter toxisch bedingten Stressbedingungen dar (Braunbeck, 1994; Hinton *et al.*, 1978; Strmac and Braunbeck, 1999b).

6. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 6.3.2 LC₅₀ -Daten gegenüber Ammoniak (NH₃) und Nitrit (NO₂⁻) einiger Süß- und Meerwasserfische

NH ₃ [mg/L]	NO ₂ ⁻ [mg/L]	Fischart	Referenz
24 h LC ₅₀ : 1,32	24 h LC ₅₀ : > 2,0	Senegalseezunge (<i>Solea senegalensis</i>)	(Para and Yufera, 1999)
24 h LC ₅₀ : 0,24	24 h LC ₅₀ : 1,997	Seebarbe (<i>Sparus aurata</i>)	(Para and Yufera, 1999)
96 h LC ₅₀ : 1,7		Seebrasse	(Coedacier and Dutto, 1999)
27 d LC ₅₀ : 0,95		Steinbutt (<i>Psetta maxima</i>)	(Person-LeRuyet and Boeuf, 1998)
96 h LC ₅₀ : 0,031 - 0,146 (2 - 17° C Wassertemperatur)		Lachs (<i>Salmo salar</i>)	(Knoph, 1992)
96 h LC ₅₀ : 1 - 3		Steinbutt, Seebarbe, Seebrasse	(Coedacier and Dutto, 1999)
24 h LC ₅₀ : 0,5		Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	review: (Albaster and LLoyd, 1980)
96 h LC ₅₀ : 0,75 - 2,35		<i>Paratya curvirostris</i> < <i>Galaxias fasciatus</i> < <i>Gobiomorphus cotidianus</i> < <i>Retropinna retropinna</i> < <i>Gobiomorphus huttoni</i> < <i>Galaxias maculatus</i> < <i>Anguilla dieffenbachii</i> < <i>Anguilla australis</i>	(Richardson, 1997)

Eine erhöhte Hexokinaseaktivität kennzeichnet eine erhöhte Glucoseaufnahme aus dem Blut. Nach Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat entscheidet sich, ob der Weg zur Glykoneogenese (bevorzugt) oder zur Verstoffwechslung eingeschlagen wird. Dafür könnten die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle tendenziell erhöhten Aktivitäten der Phosphofruktokinase sowie der Fettsäuresynthese zuarbeitenden Glucose-6-P-Dehydrogenase (*Bereitstellung von NADPH-Reduktionsäquivalenten*) und des Malatenzyms sprechen.

Die Verknüpfung Lipidsynthese zu den Stoffwechselwegen Glykolyse und Aminosäureabbau ist an der Basis des Acetyl-CoA zu suchen. Acetyl-CoA entsteht u. a. aus dem Katabolismus von Kohlenhydraten (Glykolyse) aus Pyruvat bzw. den Aminosäureabbau (Alaninaminotransferase) aus den ketogenen Aminosäuren Leucin und Lysin. Die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA erfolgt über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex gemäß der Reaktionsgleichung,



Interessanterweise entsteht das hierfür erforderliche NAD^+ , wenn NADH in der Atmungskette in den Mitochondrien seine Elektronen schließlich auf O_2 überträgt. Dies ist insofern von Bedeutung als eine gesteigerte Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA auch zu einer erhöhten Aktivität in der Atmungskette führen sollte. In der Tat kann eine Aktivitätszunahme der Atmungskette durch die erhöhte Aktivität der Cytochrom C Oxidase (Schlüsselenzym der Atmungskette) im Cocktail- und Ammoniak/Cocktailansatz bestätigt werden.

Acetyl-CoA kann jetzt entweder im Citratzyklus zu CO_2 verstoffwechselt werden, was aufgrund der unveränderten Aktivität der Succinatdehydrogenase unwahrscheinlich erscheint, oder zu Synthesezwecken, wie beispielsweise der Fettsäuresynthese zugeführt werden. Dieser Weg erscheint aufgrund der erhöhten Enzymaktivitäten der Citratsynthase und des Malatenzyms wahrscheinlich.

Die Fettsäuresynthese erfolgt im Cytosol, die Mitochondrienmembran ist jedoch für Acetyl-CoA so gut wie impermeabel. Ein (und wahrscheinlich der hauptsächliche) Weg Acetyl-CoA durch die Mitochondrienmembran auszuschleusen ist der Citratweg. Hierzu verbindet sich Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat (katalysiert durch die Citratsynthase). Citrat kann die Mitochondrienmembran Richtung Cytosol passieren, wo es zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten wird. Während Acetyl-CoA in die Lipidsynthese eintreten kann, wird Oxalacetat, da es die Mitochondrienmembran nicht passieren kann, im Citratweg über Malat schließlich durch das Malatenzym zu Pyruvat decarboxyliert. Pyruvat tritt wieder in das Mitochondrium ein, um den Kreislauf über Oxalacetat zu schließen. Eine Aktivitätszunahme des Citratweges kann somit die erhöhten Aktivitäten der Citratsynthase und des Malatenzyms erklären.

In Hinblick auf eine langfristige Hemmung der Esterase an der Körsch scheint die Induktion der Esterase im Ammoniak/Cocktailansatz überraschend. Andererseits kann die Hydrolyse von Estern ein wirkungsvolles Instrument beim Abbau von Xenobiotica darstellen (Aldrige *et al.*, 1953; Huang, *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Kaur *et al.*, 1983;

Mentlein *et al.*, 1987; Mentlein *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1994), so dass davon auszugehen ist, dass unter Freilandbedingungen das Zusammenspiel weiterer Faktoren die Hemmung an der Körsch bewirken.

Während die Ammoniakbelastung der Bachforellen überwiegend zu einer tendenziellen Induktion der untersuchten Enzymaktivitäten führte, kann ein synergistischer oder antagonistischer Einfluss des Ammoniak auf die eingesetzte Cocktailbelastung aus den vorliegenden Daten nicht generell abgeleitet werden. Insgesamt waren Abweichungen in den Enzymwerten zwischen Lösungsmittelreferenz und Belastungsszenario relativ niedrig. Eine mögliche Erklärung könnten Bucher und Hofer, 1990 liefern, die zumindest den Einsatz von Blutenzymen als Indikator chronischer Schadstoffbelastungen anzweifeln: Zu Beginn einer subletalen Schadstoffbelastung steigen Enzymwerte im gleichen Maße wie bei einer akuten Belastung, um bei andauernder Belastung auf das Niveau der Kontrollen zu fallen (Szabó *et al.*, 1992). Tatsächlich wurden in Fischen aus belasteter Flüssen normale Blutenzymwerte festgestellt, während empfindlichere Arten längst verschwunden waren und histopathologische Effekte an Leber und Niere nachgewiesen werden konnten (Casillas *et al.*, 1985b).

Im Vergleich zum Freiland könnte die chronische Belastung der Schlüssel zur Aufklärung der insgesamt niedrigen biochemischen Antworten sein. Aufgrund der aus chemischen Analysen zurückgerechneten Schadstoffkonzentrationen (Projektpartner: AG Schürmann) im Körschwasser, erreichten die im 10-fach dotierten Körschcocktail eingesetzten Einzelstoffkonzentrationen Nominalwerte zwischen 10^{-1} - 10^{-4} $\mu\text{g/L}$ (vgl. Diskussion 5.3). In derart geringen, jedoch umweltrelevanten Schadstoffkonzentrationen könnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen Adaptionsprozesse der Versuchstiere möglicherweise größere Aktivitätsunterschiede zwischen den Kontrollen und den Belastungsszenarien verhindert haben.

6. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 6.3.3 Konzentrationen von Stickstoffverbindungen und ihre toxische Wirkung bei Teleosteer und Crustaceen - Literaturwerte

NH ₃ [mg/L]	NH ₄ ⁺ [mg/L]	NO ₂ ⁻ [mg/L]	Fischart	Effekte	Referenz
<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 - 0,41 • < 0,8 - 1,0 			Steinbutt (<i>Psetta maxima</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstumsstörung • Chronisch tödlich, stady state zwischen Außenkonz. und Blut, wird der NH₄⁺ Grenzwert des Blutes überschritten kommt es zu physiologischen Störungen 	(Person-LeRuyet and Boeuf, 1998; Person-LeRuyet <i>et al.</i> , 1997a)
<ul style="list-style-type: none"> • 0,01 • 0,9 • 0,005 - 0,013 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,29 • 31,7 		Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • senkt die letale Temperaturtoleranz um 3 - 7 °C • letale Konzentration • bei +2 °C gegenüber Umwelttemperatur: Verringerung in Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Glutaminsynthetase 	(Linton <i>et al.</i> , 1998a; Linton <i>et al.</i> , 1998b; Reid <i>et al.</i> , 1998)
<ul style="list-style-type: none"> • • 0,032 	<ul style="list-style-type: none"> • 9 	<ul style="list-style-type: none"> • 26,4 	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Mortalität, starker Na⁺-Rückgang im Muskel (4d), Methämoglobin durch NO₂⁻, • 	(Vedel <i>et al.</i> , 1998)
			Kleiner Katzenwels (<i>Ictalurus punctatus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • keine Effekte auf Glutamat, Glutamin 	(Mitz and Giesy, 1985)
	<ul style="list-style-type: none"> • < 0,33 • 0,73 		Steinbutt (<i>Psetta maxima</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • keine Mortalität, • sig. Anstieg in Urea-N-Exkretion, Toleranz ist größenabhängig 52 d LC₅₀ bei 73 g-Tieren, 77 d LC₅₀ bei 53 g-Tieren 	(Person-LeRuyet <i>et al.</i> , 1997b)
<ul style="list-style-type: none"> • 0,204 - 0,34 			Seebrasse	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhte IG -Werte nach 62 d Belastung und 54 d Erholung 	(Coedacier and Dutto, 1999)
<ul style="list-style-type: none"> • • 	<ul style="list-style-type: none"> • 106 		<i>Oligocottus maculosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Zusammen mit Silberexposition erhöhte Toxizität 	(Shaw <i>et al.</i> , 1998)
			<i>Peneaus setiferus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NO₂⁻ senkt Temperaturtoleranz, NH₃ hat keinen Effekt 	(Alcaraz <i>et al.</i> , 1997)

7. Regenerationsversuche nach Freilandexposition von Fischen: Bachforelle - *In vivo*

Zusammenfassung: Um die Reversibilität von Biomarkerantworten zu untersuchen, wurden Bachforellen nach mehrmonatiger Belastung im Anschluss an Halbfreilandexpositionen 12 Wochen schadstofffrei im Labor gehältert und den Untersuchungen zugeführt. Die Markerantworten der ausgewählten Stoffwechsellenzyme aus Leber und Gehirn, wurden in Beziehung zu den Werten der vorangegangenen Halbfreilandbeprobung und entsprechenden Kontrollen gesetzt. Nahezu alle biochemischen Veränderungen erwiesen sich als reversibel und erreichten nach der Regenerationsphase Kontrollniveau; lediglich bei der Cytochrom C Oxidase (Körsch), Phosphofruktokinase und Malatenzym ergaben sich signifikante Abweichungen zur entsprechenden Kontrolle.

7.1 Einleitung

In den vorangegangenen Untersuchungen (vgl. Kap. 3.1) konnte gezeigt werden, dass in Bachforelle und Bachschmerle die komplexe Schadstoffbelastung der Untersuchungsgewässer Krähenbach und v. a. Körsch zu deutlichen Veränderungen der Aktivität der Markerenzyme gegenüber den Kontrollen führte. Dabei kam es in den verschiedenen Expositionszeiträumen immer wieder zu Induktionen und Hemmungen, die den heterogenen und komplexen Verlauf der Schadstoffbelastung (Honnen et al., 1996 - 99) in den Untersuchungsgewässern widerspiegeln und als mögliche Folge additiver, synergistischer oder antagonistischer Effekte zu betrachten sind.

Sich verändernde Schadstoffkonzentrationen fordern eine ständige Adaption von Organismen an ihre Umwelt, womit ein erhöhter physiologischer Energiebedarf einhergeht (Calow, 1991). Dagegen können Phasen geringerer Gewässerbelastung, z..B. infolge von Verdünnungseffekten bei höheren Wasserständen oder dem zeitlich begrenzten Eintrag von Pflanzenschutzmitteln, zur Regeneration von Veränderungen an cytologischen und biochemischen Parametern als den primären Angriffspunkten von Xenobiotica (Hinton, 1994), genutzt werden.

Das Regenerationsverhalten von Organismen und biologischen Strukturen nach Beendigung von Schadstoffexpositionen ist vielfach beschrieben worden, wie z. B für Wachstum (Whale et al., 1994), zelluläre Strukturen der Leber (Burkhard-Holm et al., 1999; Paris-Palacios et al., 1998), immunologische Parameter (Coedacier and Dutto, 1999) sowie biochemische Parametern (Hughes et al., 1997; Sancho et al., 1997a; Sancho et al., 1997b).

Dennoch blieb die Frage offen, ob und in welchen Zeiträumen die als Biomarker ausgewählten Stoffwechsellenzyme nach chronischer subletaler Belastung der Versuchstiere mit Umweltschadstoffen regeneriert werden können. Im Anschluss an die Freilanduntersuchungen 1997 bot sich die Gelegenheit, die Reversibilität der Veränderungen der ausgewählten Biomarker in Leber und Gehirn von Bachforellen zu untersuchen. Bachforellen, die seit Frühjahr '97 am Krähenbach und der Körsch unter Halbfreilandbedingungen exponierte worden waren, wurden für 12 Wochen im Labor schadstofffrei gehältert und den Untersuchungen zugeführt. Für Expositionsbedingungen und Aufarbeitung der Proben vgl. Kapitel 2.4.

7.2 Ergebnisse

Leber-somatischer Index und Konditionsfaktor. Konditionsfaktor als auch Leber-somatischer Index der Labortiere lag zwischen den Werten von Krähenbach und Körsch, wobei am Krähenbach jeweils der höchste Werte auftrat. Signifikante Unterschiede waren zwischen Versuchstieren jedoch nicht zu messen (Tab. 7.2.1)

Tab.7.2.1 Leber-somatischer Index (LSI) und Konditionsfaktor (CF) von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) nach Halfreilandexposition und anschließender 12 wöchiger Regeneration im Labor.

	LSI	CF
Labor	2,27 ± 0,57	1,18 ± 0,12
Krähenbach	2,57 ± 0,67	1,22 ± 0,09
Körsch	2,11 ± 0,57	1,13 ± 0,25

Biochemische Befunde

Gehirn - Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase. Im November '97 war die spezifische Aktivität an der Körsch signifikant gehemmt und die totale Aktivität am Krähenbach leicht erhöht ($p < 0,05$), jedoch konnte nach 12 Wochen schadstofffreier Hälterung kein Unterschied mehr sowohl in der totalen als auch in der spezifischen Aktivität der Acetylcholinesterase (Gehirn) zwischen den Krähenbach- und Körsch-exponierten Bachforellen relativ zur Kontrolle gefunden werden.

Eine um ca. 30 % geringere Aktivität (mU/mg Protein) ließ die Cytochrom C Oxidase im Gehirn im Spätherbst '97 am Krähenbach erkennen, die auch nach der Erholungsphase nachweisbar war. Abweichung von der Referenz bei Bezug auf die Gesamtaktivität waren nicht zu beobachten (Abb. 7.2.1).

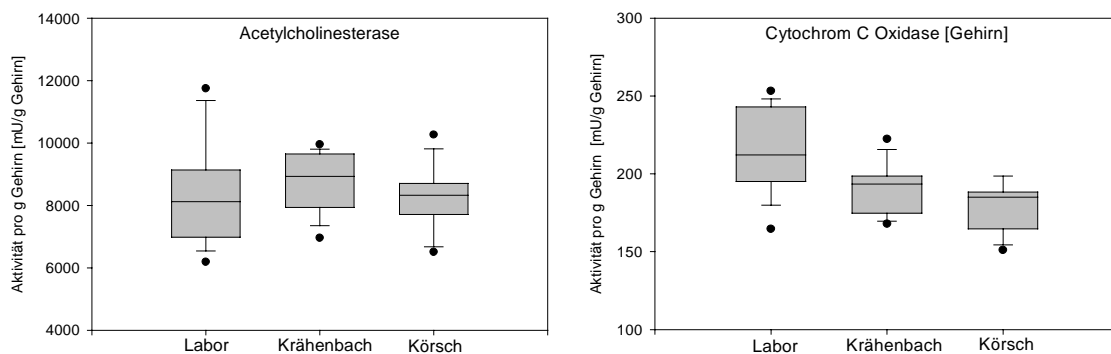


Abb. 7.2.1 Gesamtaktivitäten der Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase aus dem Gehirn der Bachforelle. Die Tiere wurden von März bis November '97 unter Halfreilandbedingungen gegenüber dem Krähenbach und der Körsch exponiert. Im Anschluss folgte eine 12 wöchige Regenerationsphase unter kontrollierten Laborbedingungen ($n \geq 7$). Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurden nach dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Cytochrom C Oxidase, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase. Die mitochondrialen Enzyme des Citratzyklus, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase, zeigten sowohl im

Spätherbst als auch nach der Regenerationsphase keine Abweichungen relativ zur Laborkontrolle. Lediglich das Atmungskettenenzym Cytochrom C Oxidase wies bei den Körschtieren nach der Regeneration eine leicht erhöhte totale Aktivität auf ($p < 0,01$), die unmittelbar nach der Halfreilandexposition nicht zu beobachten war.

Saure Phosphatase und Katalase. Von der Halfreilandexposition unbeeinflusst zeigte sich die lysosomale Saure Phosphatase. Im Gegensatz dazu konnte für die peroxisomale Katalase im November '97 noch eine schwach verminderte spezifische Aktivität am Krähenbach festgestellt werden. Beide Enzyme ließen jedoch nach der Regenerationsphase keine Veränderungen im Vergleich zur Referenz mehr erkennen.

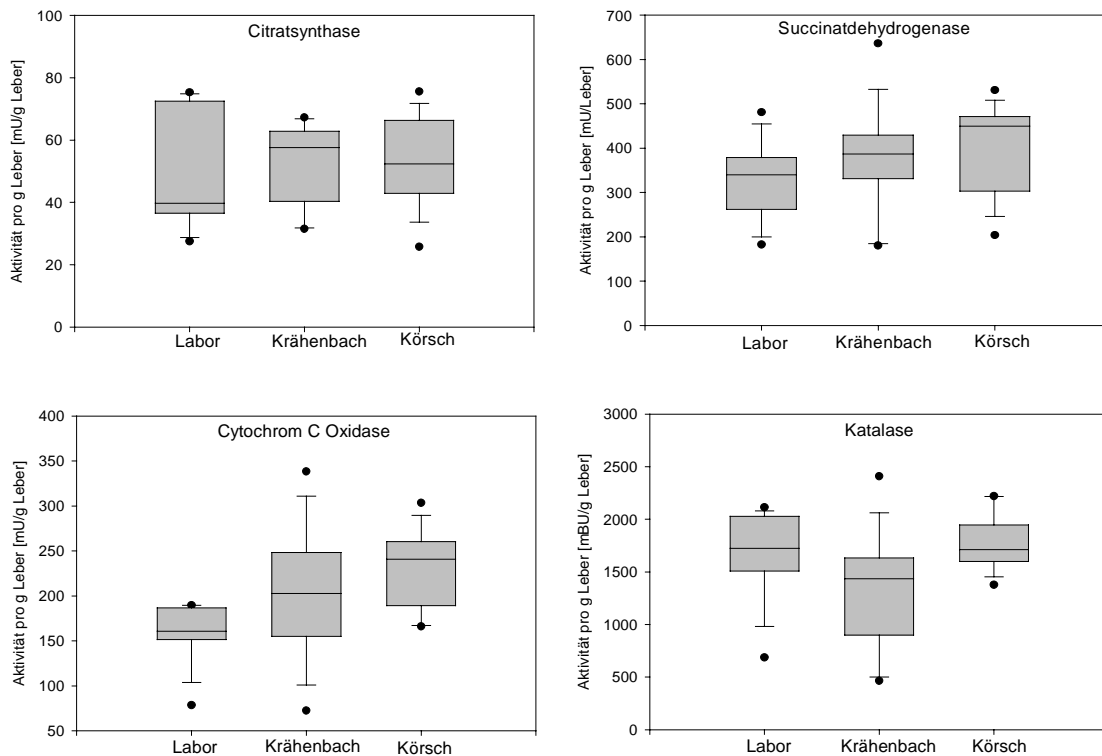


Abb. 7.2.2 Gesamtaktivitäten von Citratsynthase, Succinatdehydrogenase, Cytochrom C Oxidase und Katalase aus der Leber von Bachforellen. Die Tiere wurden von März bis November '97 unter Halfreilandbedingungen gegenüber dem Krähenbach und der Körsch exponiert. Im Anschluss folgte eine 12 wöchige Regenerationsphase unter kontrollierten Laborbedingungen ($n \geq 7$). Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurden nach dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: ** $p < 0,01$

Alaninaminotransferase, Hexokinase und Phosphofruktokinase. Diese dem Energiestoffwechsel zuzurechnenden Enzyme wiesen im November '97 sowohl auf Proteinebene als auch bezogen auf die Gesamtaktivität stark verringerte Werte am Krähenbach und Körsch relativ zum Labor auf. Im Anschluss an die Regenerationsphase zeigten sich die Aktivitäten bei der Alaninaminotransferase und der Hexokinase erholt; dagegen verblieb die Aktivität der Phosphofruktokinase an Krähenbach ($p < 0,05$) und Körsch ($p < 0,001$) exponierten Bachforellen auf konstant niedrigem Niveau im Vergleich zur Probennahme im November '97 (Abb.3.3.3).

7. Ergebnisse und Diskussion

Glucose-6-P-Dehydrogenase und Malatenzym. Während die Glucose-6-P-Dehydrogenase am Ende der Halfreilandexposition Kontrollwerte zeigte, war die Aktivität des Malatenzyms in der spezifischen Aktivität der Krähenbachgruppe deutlich gegenüber dem Laborwert reduziert ($p < 0,01$). Dieser Trend verstärkte sich über die Regenerationsphase, als die Unterschiede sowohl in der spezifischen als auch in der totalen Aktivität für beide freilandexponierten Forellengruppen gegenüber den unbelasteten Labortieren zunahm (Abb. 7.2.3).

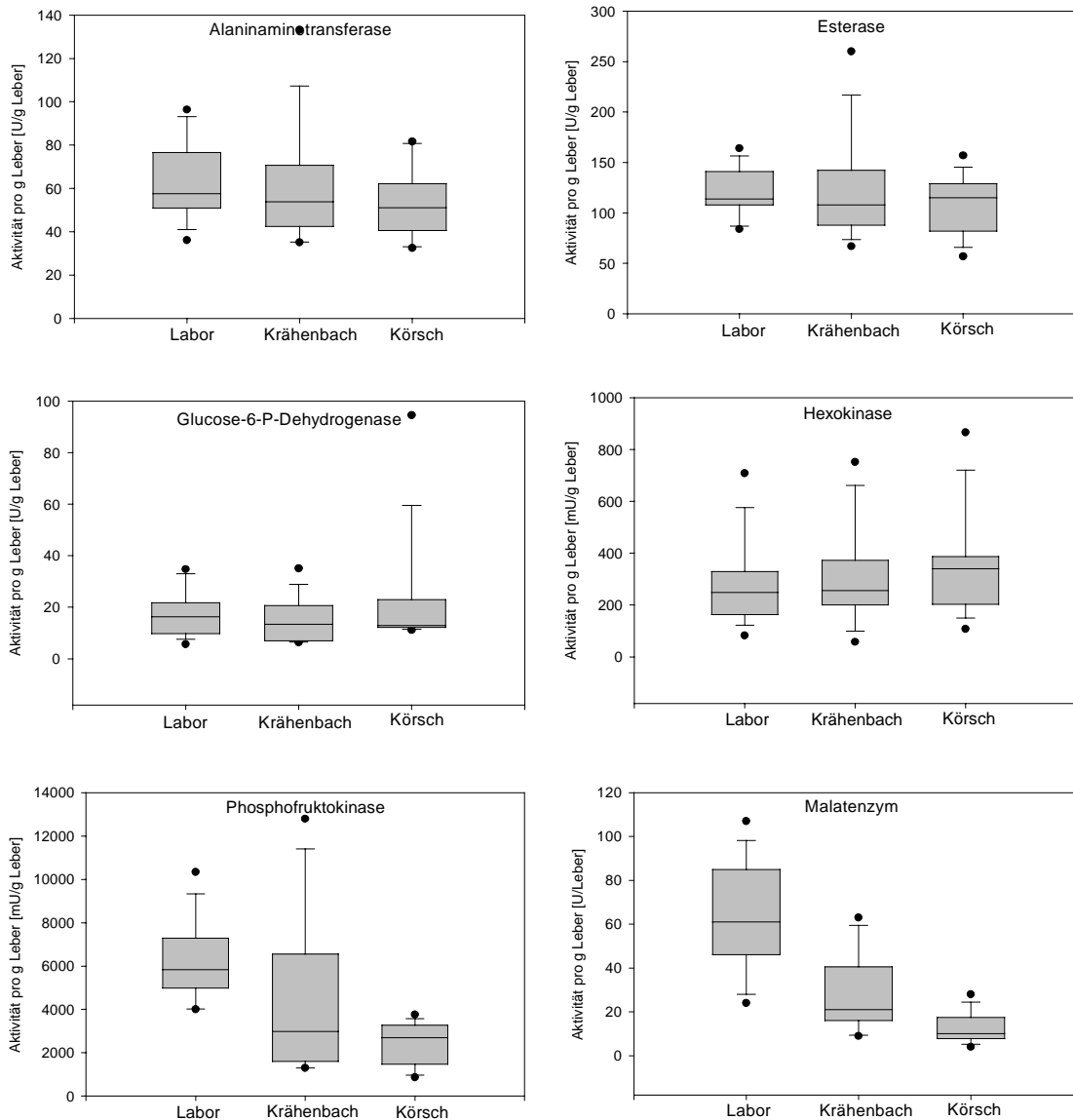


Abb. 7.2.3 Gesamtaktivitäten von Alaninaminotransferase, Esterase, Glu-6-P-Dehydrogenase, Hexokinase, Phosphofruktokinase und Malatenzym aus der Leber von Bachforellen. Die Tiere wurden von März bis November '97 unter Halfreilandbedingungen gegenüber dem Krähenbach und der Körsch exponiert. Im Anschluss folgte eine 12 wöchige Regenerationsphase unter kontrollierten Laborbedingungen. ($n \geq 7$). Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurden nach dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Esterase. Konnte bei der Körschgruppe im Spätherbst noch eine deutlich reduzierte spezifische und totale Aktivität gemessen werden, so zeigten sich auch die Esterasewerte am Ende der Regeneration erholt (Abb. 7.2.3).

7.3 Diskussion

Das Regenerationsexperiment mit den unter Halfreilandbedingungen vorbelasteten Bachforellen belegt die Reversibilität der untersuchten Markerantworten und damit die Regenerationsfähigkeit der Testfische nach Überführung in unbelastetes Wasser. Im November 1997 konnten für die Aktivitäten der Alaninaminotransferase, Phosphofruktokinase, Hexokinase und Esterase überwiegend hoch signifikante Abweichungen an Krähenbach und Körsch gegenüber dem Laborwert festgestellt werden, die an der Körsch jeweils wesentlich stärker ausgeprägt waren. Am Ende der Regenerationsphase erreichten die Aktivitäten der Enzyme der an Krähenbach und Körsch exponierten Tiere wieder das Niveau der Kontrolle. Lediglich bei der Phosphofruktokinase konnte eine unverminderte Hemmung ihrer Aktivität (bezogen auf die Gesamtaktivität) festgestellt werden. Interessanterweise fielen nach der Regenerationsphase nun auch beim Malatenzym (ME) und bei der Cytochrom C Oxidase (Körsch) vorher nicht signifikante Unterschiede zur Wasserkontrolle auf. Phosphofruktokinase (PFK) und Malatenzym (ME) lassen sich über den Citratweg miteinander verknüpfen (vgl. auch Diskussion 6.3). Die niedrigen Aktivitäten beider Enzyme im Vergleich zur Kontrolle können als Hinweis auf eine Einstellung bzw. starke Verringerung der Fettsäuresynthese bzw. Lipogenese in der Leber gewertet werden. Acetyl-Einheiten für die Fettsäuresynthese werden v.a. über Pyruvat aus der Glykolyse bzw. in Hungerzuständen über die ketogene Aminosäuren Lysin und Leucin aus dem Proteinabbau bereitgestellt. Während die Aktivität der PFK für eine Hemmung der Glykolyse spricht, kann eine Bereitstellung von Acetyl-Einheiten aus einem möglichen Proteinabbau aufgrund einer unveränderten Aktivität der Alaninaminotransferase ebenfalls ausgeschlossen werden. Die signifikant erhöhte Aktivität der Cytochrom C Oxidase (Schlüsselenzym der Atmungskette) könnte auf einen erhöhten zellulären ATP-Bedarf hindeuten, der möglicherweise im Zusammenhang mit der Hemmung der Glykolyse zu suchen ist.

Schlussfolgerung:

Die Regenerationsexperimente belegen, dass

- die physiologischen Beeinträchtigungen bzw. Schädigungen in den Enzymaktivitäten auch nach subletal-chronischer Belastung nach relativ kurzer Zeit in schadstofffreier Umwelt reversibel sind,
- durch das Erreichen normaler Aktivitäten (Kontrollniveau) der Stoffwechsellenzyme innerhalb kurzer Zeitspannen sich die Tiere vor (übermäßigen) Energieverlusten schützen können, was gerade bei diskontinuierlichen Belastungen wie sie am Krähenbach und insbesondere an der Körsch auftreten, von enormer Bedeutung sein kann. Einerseits entstehen dadurch Regenerationsphasen, zum anderen können potentielle Energieverluste eines erhöhten Stoffwechsels z.B. zur Abwehr von Krankheiten oder Parasiten eingesetzt werden.

8. Biochemische und ultrastrukturelle Reaktionen in der Leber von Bachforelle und Bachschmerle nach einem Expositionspuls nach 2-wöchiger Grundbelastung gegenüber einem ausgewählten Schadstoffcocktail

8.1 Biochemische Reaktionen

Zusammenfassung: Bachforellen und Bachschmerlen wurden nach 26 Tagen Exposition gegenüber einer subletalen Konzentration eines 50-fachen Körsch-PAH-Cocktails in Kombination mit einem 48 stündigem Belastungspeak der 200-fachen Körschkonzentration am 15. Tag auf biochemische Veränderungen in der Leber untersucht. Als Referenz diente ein 50-facher Grundbelastungsansatz ohne Belastungspeak sowie eine Lösungsmittelkontrolle. Die Beprobung erfolgte jeweils am 18. und 26. Tag der Belastung. Insgesamt wurden die Aktivitäten von 13 Stoffwechselenzymen in Leber und Gehirn bestimmt. Der Belastungspeak hatte bei den meisten Enzymen eine zwar deutliche, jedoch oft nicht signifikante Induktion der Aktivitäten zur Folge, die sich am 26. Tag wieder den Referenzwerten annäherte. Unbeeinflusst zeigte sich lediglich die Aktivität der Acetylcholinesterase.

8.1.1 Einleitung

Die vorangegangenen Belastungsexperimente hatten gezeigt, dass die relativ statischen Laborbedingungen nur bedingt geeignet waren, die Dynamik der Schadstoffbelastung im Freiland nachzustellen. In den mehrjährigen Freilanduntersuchungen wurde dagegen immer wieder bestätigt, dass die Belastungssituationen an den Modellgewässern sehr heterogen und diffus waren. Für Organismen dieser Gewässer bedeutet dies, sich im Gegensatz zu statischen Laborbedingungen ständig an wechselnde Umweltbedingungen anpassen müssen. Derartige Adaptionsprozesse sind energieintensiv, führen zu physiologischen Veränderungen. Diese sollten von daher über Biomarker erfassbar sein. Der Blick in die Literatur zeigt, dass das Wissen über die Dynamik und das Induktionsverhalten von Enzymen bei ökologischen Fragestellungen nur begrenzt ist: Frühere Untersuchungen zu Stoffwechsel- und Biotransformationsenzymen beschäftigten sich meist mit der Induzierbarkeit bzw. der Veränderung von Enzymaktivitäten gegenüber Schadstoffen unbelasteter Versuchstiere. In welchen Zeiträumen werden jedoch Stoffwechselenzyme und -kreisläufe bei erhöhter Schadstoffexposition in Organismen induziert, die an eine Grundbelastung adaptiert sind? Wie lange hält eine derartige Induktion an, und wann wird das Ausgangsniveau wieder erreicht? Gerade im Hinblick auf vorbelastete Tiere, die sich in einem ständigen Adaptionsprozess gegenüber einem Schadstoff bzw. Schadstoffgemischen befinden, ist das Wissen bezüglich der Enzymdynamik sehr begrenzt.

Die nachfolgend beschriebenen Belastungsexperimente mit Bachforelle und Bachschmerle sollen der Frage nachgehen, in welchen Zeitabständen vorbelastete Fische a) wechselnde

Schadstoffbelastungen physiologisch kompensieren können und b) wie lange Kompensationsreaktionen aufrecht erhalten werden.

Hierzu wurden Bachforellen und Bachschmerlen 26 Tage einer Schadstoffgrundbelastung ausgesetzt, die von einem 48-stündigem Belastungspeak der 4-fachen Grundbelastung am 15. und 16. Tag unterbrochen wurde (vgl. Kap. 2.7). Untersucht wurden die Reaktionen von 12 Stoffwechselenzymen sowie als strukturelles Korrelat zu den biochemischen Reaktionen die Ultrastruktur der Leber der Versuchstiere.

8.1.2 Ergebnisse - Bachforelle

Konditionsfaktor und Leber-somatischer Index. Sowohl Konditionsfaktor als auch Leber-somatischer Index erreichten bei den Bachforellen der verschiedenen Expositionsansätze mit nur einer Ausnahme Werte vergleichbarer Größenordnungen, so dass größen- bzw. gewichtsbedingte Einflüsse auf die Enzymaktivitäten vernachlässigt werden können. Lediglich bei den Tieren der Grundbelastung bestand am Tag 26 ein signifikanter Unterschied im Leber-somatischen Index relativ zur DMSO-Kontrolle (Tab. 8.1.2.1).

Tab. 8.1.2.1 Konditionsfaktor (CF) und Leber-somatischer Index (LSI) von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Korschkonzentration und einer 48-stündigen Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Korschkonzentration am Tag 15 und Tag 16.

Bachforelle	Tag 18		Tag 26	
	LSI	CF	LSI	CF
DMSO	2,33 ± 0,39	1,17 ± 0,08	2,51 ± 0,30	1,19 ± 0,07
50x Grundbelastung	2,49 ± 0,32	1,10 ± 0,08	2,08 ± 0,22*	1,24 ± 0,19
200x Expositionspeak	2,25 ± 0,33	1,09 ± 0,05	2,17 ± 0,47	1,18 ± 0,11

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Belastungsansätzen und der DMSO-Kontrolle wurden nach dem Rangsummen-Test nach Mann-Whitney ermittelt, mit: * $p < 0,05$, $n = 8$.

Gehirn - Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase. Die Exposition der Bachforellen gegenüber der 50-fache Grundbelastung sowie 50-fache Grundbelastung plus 200-facher Belastungspeak am 15. und 16. Expositionstag führte bei den im Gehirn gemessenen Aktivitäten der Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase nur zu geringfügigen, nicht signifikanten Abweichungen von den Kontrollwerten (Abb. 8.1.2.1).

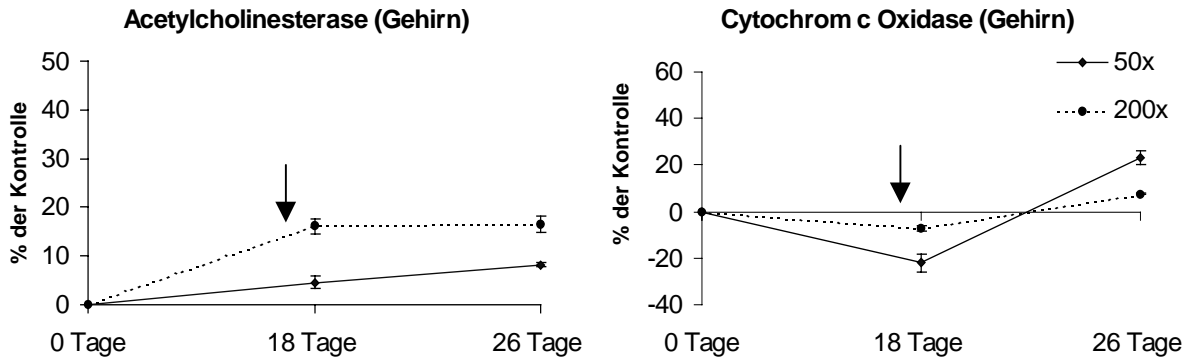


Abb. 8.1.2.1 Totale Aktivität der Acetylcholinesterase und der Cytochrom C Oxidase aus dem Gehirn von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag, (♣), n = 8.

Leber - Cytochrom C Oxidase, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase. Alle drei mitochondrialen Enzyme der Leber zeigten bei der 50-fachen Grundbelastung eine kontinuierliche leichte Abnahme in den Aktivitäten bezogen auf 1 g Leber, während bei den Bachforellen, die der 200-fachen Körschgrundbelastung ausgesetzt waren, nach 48 Stunden sowohl die totale als auch die spezifische Aktivitäten der Cytochrom C Oxidase und der Succinatdehydrogenase zunächst um ca. 30 % anstiegen, jedoch bis Expositionsende leicht unter den Kontrollwert (Abb. 8.1.2.2, Abb. 8.1.2.3) nachgaben. Im Gegensatz zur Succinatdehydrogenase kam es bei Citratsynthase auch nach der erhöhten Belastung zu einer kontinuierlichen Inhibition der Aktivität, die am Tag 26 ca. 35 % unter dem Referenzwert lag.

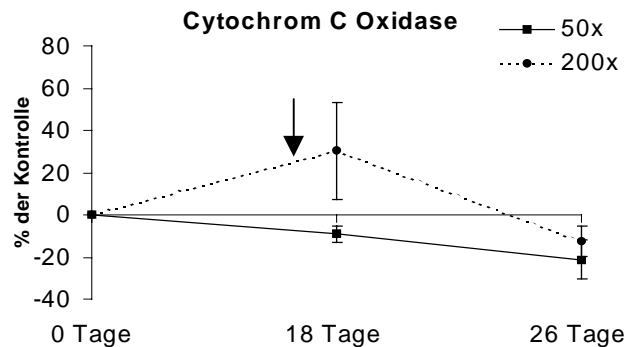


Abb. 8.1.2.2 Totale Aktivität der Cytochrom C Oxidase aus der Leber von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag, (♣), n = 8.

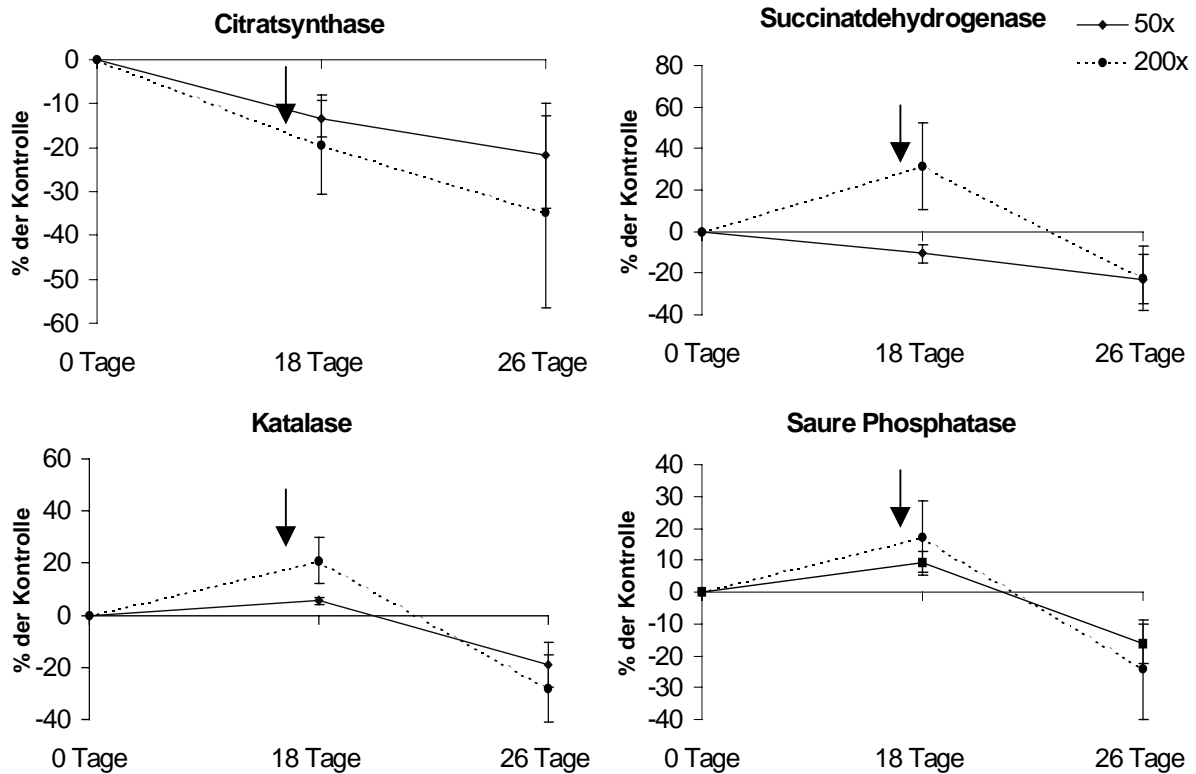


Abb. 8.1.2.3 Totale Aktivität der Succinatdehydrogenase, Citratsynthase, Katalase und Sauren aus der Leber von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körtschkonzentration und einer 48-stündigen Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körtschkonzentration am 15. und 16. Tag, (\blacktriangledown), $n = 8$.

Katalase und Saure Phosphatase. Bei geringfügigen nicht signifikanten Abweichungen von der DMSO-Referenz nach 18 bzw. 26 Tagen Grundbelastung zeigten die peroxisomale Katalase sowie die lysosomale Saure Phosphatase sehr ähnliche Aktivitätsverläufe bezogen auf Gesamtaktivität pro g Leber (Abb. 8.1.2.3). Auch nach dem Belastungsspeak schien oxidativer Stress, auf den eine erhöhte Katalaseaktivität hindeuten würde, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Nach geringfügigem Anstieg auf 20 % über den Kontrollwert 2 Tage nach dem Belastungsspeak fiel die totale Aktivität der Katalase und der Saure Phosphatase bis Expositionsende auf 25 - 30 % unter den Referenzwert. Ein gegensätzliches Ergebnis wurde dagegen auf Proteinebene erreicht, als die Katalaseaktivität am 26. Tag signifikant das Kontrollniveau überschritt (Tab. 8.1.2.3).

Alaninaminotransferase, Phosphofruktokinase, Malatenzym und Hexokinase. Für die der Energiebereitstellung zuzuordnenden Enzyme Alaninaminotransferase, Malatenzym und Phosphofruktokinase konnten sowohl in der totalen als auch der spezifischen Aktivität, aber auch zwischen den einzelnen Enzymen große Übereinstimmungen festgestellt werden (Tab. 8.1.2.2, Tab. 8.1.2.3). Die Peakbelastung mit der 200-fachen durchschnittlichen Schadstoffkonzentration der Körtsch führte bei Alaninaminotransferase, Malatenzym und Phosphofruktokinase zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität nach 48 Stunden zwischen 40 - 70 % des Kontrollwertes, um bis Expositionsende wieder das Ausgangsniveau zu erreichen, während

die Grundbelastung mit der 50-fachen Körtschkonzentration mit Ausnahme des Malatenzyms zu keinen Veränderungen führte. Beim Malatenzym hingegen konnte auch bei der Grundbelastung eine Zunahme der Aktivität bis Tag 26 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Alaninaminotransferase, Malatenzym und Phosphofruktokinase stieg die Hexokinaseaktivität nach dem Belastungspeak bis Expositionsende deutlich um 40 % an (Abb. 8.1.2.4). Bei einem kontinuierlichen Anstieg wurde dieses Niveau bis zum Tag 26 jedoch auch von den Bachforellen der Grundbelastung erreicht.

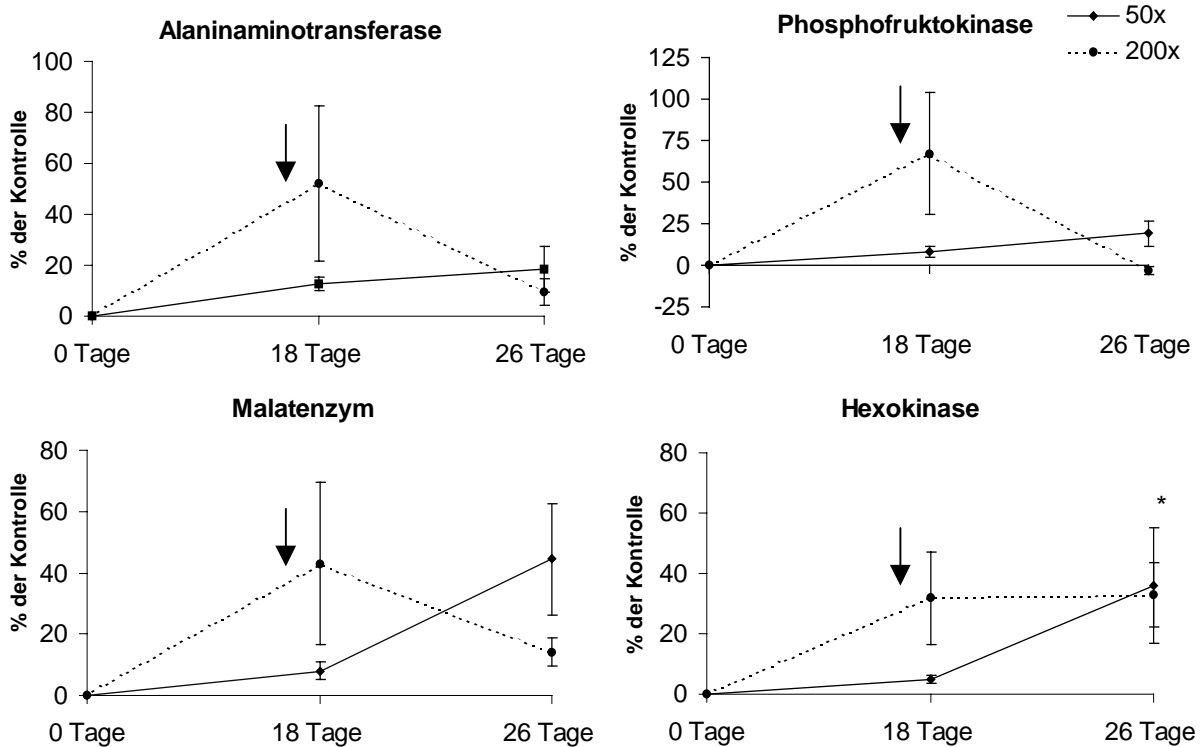


Abb. 8.1.2.4 Totale Aktivität der Hexokinase, Phosphofruktokinase, Alaninaminotransferase und dem Malatenzym aus der Leber von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körtschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körtschkonzentration am 15. und 16. Tag, ($n = 8$).

Glucose-6-P-Dehydrogenase und Esterase. Der Einfluss des Belastungspeaks wurde auch bei der Glucose-6-P-Dehydrogenase und der Esterase deutlich: 48 h nach der erhöhten Schadstoffbelastung zeigten beide Enzyme einen deutlichen Anstieg sowohl ihrer totalen und ihrer spezifischen Aktivitäten (Tab. 8.1.2.2, Tab. 8.1.2.3) über das Niveau der 50-fachen Grundbelastung bzw. der DMSO-Referenz. Mit Abklingen der erhöhten Belastung näherten sich die Aktivitätswerte am 26 Tag dem Kontrollwert wieder an (Abb. 8.1.2.5). Analog zur Hexokinase führte die 50-fache Grundbelastung zu einer kontinuierlichen Zunahme der Glucose-6-P-Dehydrogenaseaktivität nach 26 Tagen Exposition.

8. Ergebnisse und Diskussion

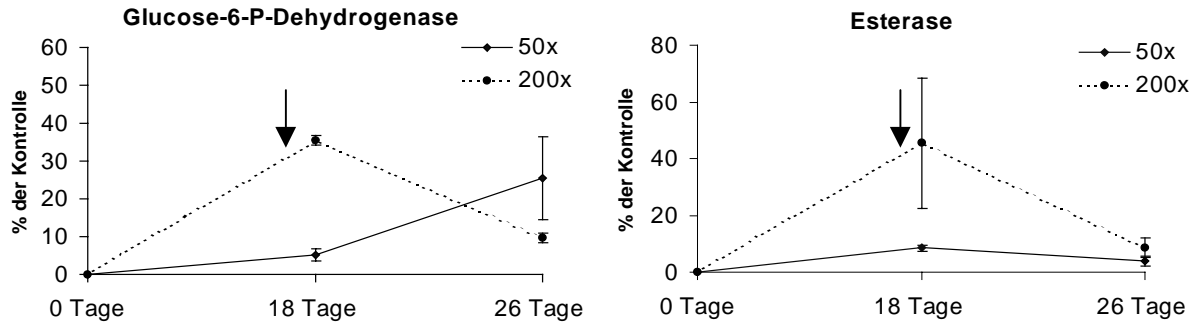


Abb. 8.1.2.5 Spezifische Aktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase und der Esterase aus der Leber von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körtschkonzentration und einer 48 h Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körtschkonzentration am 15. und 16. Tag, (\leftrightarrow), $n = 8$.

8. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 8.1.2.2 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*). Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer Grundbelastung mit 50-fachen Cocktail ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am 15. und 16.Tag für 48 h bei 4-facher Grundbelastung (Peak) exponiert. Bezug: mU/mg Protein

Probennahme: Cocktail '98	DMSO 18. Tag	50x Cocktail 18. Tag	200x Cocktail 18. Tag	DMSO 26. Tag	50x Cocktail 26. Tag	200x Cocktail 26. Tag
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	1202 ± 432 n = 8	1912 ± 576** n = 8	1762 ± 621* n = 8	1523 ± 452 n = 8	1579 ± 350 n = 8	1316 ± 402 n = 10
Cytochrom C Oxidase	156 ± 35,2 n = 8	187 ± 53,5 n = 8	183 ± 72,8 n = 8	120 ± 26,7 n = 8	104 ± 30,9 n = 8	119 ± 23,6 n = 10
Leber:						
Cytochrom C Oxidase	10,8 ± 2,34 n = 8	11,7 ± 1,21 n = 8	11,9 ± 2,43 n = 8	10,50 ± 1,55 n = 9	8,40 ± 1,69*** n = 8	12,86 ± 1,61** n = 10°
Succinatdehydrogenase	4,94 ± 1,05 n = 8	5,17 ± 0,82 n = 8	5,44 ± 0,78 n = 8	6,38 ± 2,15 n = 9	5,44 ± 1,79 n = 8	7,18 ± 1,53 n = 10
Citratsynthase	7,98 ± 1,31 n = 8	8,05 ± 0,93 n = 8	8,98 ± 2,34 n = 8	7,10 ± 1,41 n = 9	5,8 ± 1,03 n = 8	6,62 ± 0,91 n = 10
Saure Phosphatase	676 ± 112 n = 8	841 ± 131** n = 8	667 ± 163 n = 8	836 ± 187 n = 9	702 ± 135 n = 8	881 ± 154 n = 10
Katalase	69,5 ± 13,6 n = 8	71,5 ± 7,05 n = 8	75,1 ± 17,1 n = 8	54,1 ± 11,9 n = 9	63,9 ± 6,8* n = 8	75,7 ± 12,01* n = 10
Alaninaminotransferase	704 ± 250 n = 8	725 ± 370 n = 8	1163 ± 771 n = 8	773 ± 399 n = 9	1093 ± 418 n = 8	874 ± 326 n = 8
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	93,6 ± 77,9 n = 8	91,2 ± 56,5 n = 8	135 ± 98,2 n = 8	85,4 ± 23,6 n = 9	114 ± 51,6 n = 8	89,5 ± 33,8 n = 10
Phosphofruktokinase	30,0 ± 41,4 n = 7	30,5 ± 29,9 n = 5	92,0 ± 119 n = 7	26,1 ± 17,2 n = 5	35,6 ± 20,7 n = 8	17,6 ± 10,3 n = 10
Malatenzym	195 ± 125 n = 8	190 ± 97,6 n = 8	291 ± 164 n = 8	152 ± 50,4 n = 9	221 ± 81,2* n = 8	168 ± 60,5 n = 10
Hexokinase	12,4 ± 4,1 n = 8	11,4 ± 5,7 n = 8	17,5 ± 10,9 n = 8	8,2 ± 3,4 n = 8	10,6 ± 5,1 n = 8	9,99 ± 2,6 n = 10
Esterase	227 ± 88,1 n = 8	250 ± 118 n = 8	294 ± 187* n = 8	305 ± 63,5 n = 9	322 ± 91,8 n = 8	307 ± 88,6 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

8. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 8.1.2.3 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*). Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer Grundbelastung mit 50-fachen Cocktail ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am 15. und 16.Tag für 48 h bei 4-facher Grundbelastung (Peak) exponiert. Bezug: mU/g Organ

Probennahme: Cocktail '98	DMSO 18. Tag	50x Cocktail 18. Tag	200x Cocktail 18. Tag	DMSO 26. Tag	50x Cocktail 26. Tag	200x Cocktail 26. Tag
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	56718 ± 16459 n = 8	59308 ± 15807 n = 8	65848 ± 6387 n = 8	85757 ± 15608 n = 8	89151 ± 73133 n = 8	77468 ± 12782 n = 10
Cytochrom C-Oxidase	7332 ± 1029 n = 8	5715 ± 939 n = 8	6806 ± 1073 n = 8	6858 ± 716 n = 8	5932 ± 1373 n = 8	7104 ± 537 n = 10
Leber:						
Cytochrom C-Oxidase	2733 ± 2423 n = 8	2483 ± 1067* n = 8	3563 ± 2696 n = 8	955 ± 514 n = 9	751 ± 326 n = 8	835 ± 461 n = 10
Succinatdehydrogenase	1219 ± 972 n = 8	1091 ± 447 n = 8	1601 ± 1060 n = 8	612 ± 416 n = 9	471 ± 243 n = 8	475 ± 326 n = 8
Citratsynthase	1962 ± 1530 n = 8	1699 ± 658 n = 8	1581 ± 924 n = 8	661 ± 412 n = 9	517 ± 223 n = 8	432 ± 273 n = 10
Saure Phosphatase	159 ± 107 n = 8	174 ± 60,2 n = 8	186 ± 128 n = 8	72,5 ± 35,5 n = 9	60,7 ± 23,2 n = 8	54,9 ± 35,1 n = 9
Katalase	3363 ± 656 n = 8	3547 ± 812 n = 8	4069 ± 1685 n = 8	1425 ± 652 n = 9	11853 ± 515 n = 8	1023 ± 461 n = 10
Alaninaminotransferase	25879 ± 8786 n = 8	29181 ± 5942 n = 8	39360 ± 23113 n = 8	39542 ± 17848 n = 8	46873 ± 22265 n = 8	43233 ± 23819 n = 10
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	3402 ± 2686 n = 8	3574 ± 1127 n = 8	4608 ± 3029 n = 8	3652 ± 1113 n = 9	4584 ± 1956 n = 8	4008 ± 1366 n = 10
Phosphofruktokinase	604 ± 683 n = 6	536 ± 499 n = 5	1502 ± 1784 n = 7	1056 ± 738 n = 5	1889 ± 1381 n = 8	1022 ± 746 n = 10
Malatenzym	7182 ± 4369 n = 8	7761 ± 2658 n = 8	10273 ± 6287 n = 8	6490 ± 2089 n = 9	9374 ± 3826 n = 8	7410 ± 2369 n = 10
Hexokinase	446 ± 132 n = 8	468 ± 133 n = 8	588 ± 283 n = 8	352 ± 147 n = 9	621 ± 478 n = 8	468 ± 150* n = 10
Esterase	9409 ± 2922 n = 8	10204 ± 1471 n = 8	13683 ± 6943 n = 8	13301 ± 3876 n = 9	13790 ± 5138 n = 8	14463 ± 5201 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/g Leber bzw. Gehirn ± Standardabweichung in n Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01.

8.1.3 Ergebnisse - Bachschmerle

Konditionsfaktor und Leber-somatischer Index. Analog den Bachforellen konnten auch bei den Bachschmerlen für den Konditionsfaktor und den Leber-somatischen Index keine statistisch signifikanten Abweichungen von der DMSO-Referenz zu den Beprobungsterminen festgestellt werden (Tab.8.1.3.1).

Tab. 8.1.3.1 Konditionsfaktor (CF) und Leber-somatischer Index (LSI) von Bachforellen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48 h Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. Und 16. Tag; n = 8.

Bachschmerle	Tag 18		Tag 26	
	LSI	CF	LSI	CF
DMSO	1,45 ± 0,51	0,55 ± 0,12	1,51 ± 0,33	0,49 ± 0,07
50x Grundbelastung	1,40 ± 0,52	0,52 ± 0,08	1,68 ± 0,54	0,55 ± 0,08
200x Expositionspeak	1,39 ± 0,38	0,57 ± 0,07	1,67 ± 0,23	0,55 ± 0,06

Gehirn - Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase. Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle konnten für den gesamten Untersuchungszeitraum für die Acetylcholinesterase im Gehirn der Bachschmerlen nicht beobachtet werden (Tab. 8.1.3.2, Tab. 8.1.3.3) Im Gegensatz dazu stieg bei der Cytochrom C Oxidase die spezifische Aktivität 2 Tage nach Beendigung des Belastungspeaks um 44 % gegenüber der DMSO-Kontrolle an (Abb. 8.1.3.1, Tab. 8.1.3.2), während die Tiere der Grundbelastung keine Veränderungen aufzeigten. 10 Tage nach dem sich die Aktivität der dem 200-fachen Cocktail exponierten Tiere dem Kontrollwert und dem Wert der Hintergrundsbelastung wieder an. Keine Abweichung ergab der Bezug auf die Aktivität pro g Gehirn.

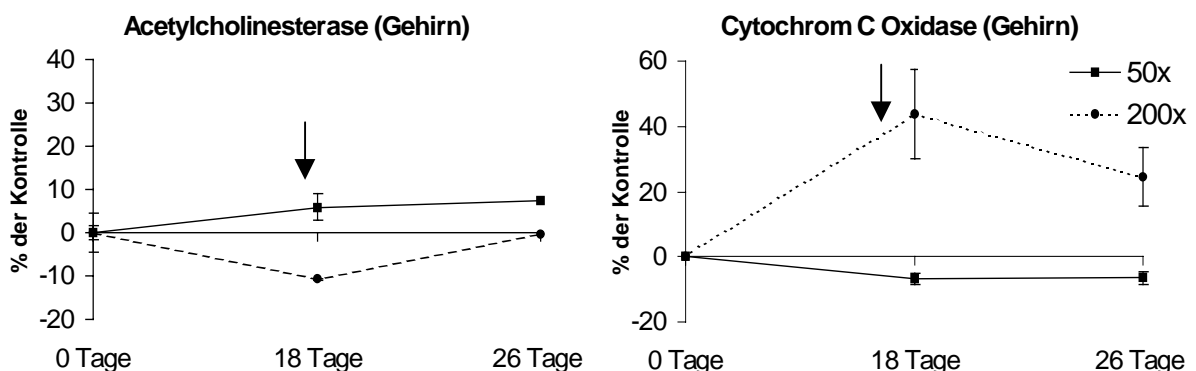


Abb. 8.1.3.1 Spezifische Aktivität der Acetylcholinesterase und der Cytochrom C Oxidase aus dem Gehirn von Bachschmerlen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag (⇕), n = 8.; * p < 0,05 nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney

Leber - Succinatdehydrogenase, Citratsynthase und Cytochrom C Oxidase. Deutliche Effekte konnten für die mitochondrialen Enzyme des Citratzyklus Succinatdehydrogenase und Citratsynthase beobachtet werden: Tiere, die einzig der Hintergrundbelastung ausgesetzt waren, ließen am 18. Tag eine um über 70 - 100 % erhöhte totale Aktivität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erkennen (Abb. 8.1.3.2), die von den Tieren des 200-fachen Peaks um weitere 45 % (Citratsynthase) und einem der Grundbelastung vergleichbaren Wert (Succinatdehydrogenase) übertroffen bzw. erreicht wurde (Tab. 8.1.3.3). Die weitere Belastung führte dann bei beiden Expositionsgruppen zu einer Aktivitätsabschwächung auf Kontrollniveau. Auch beim Atmungskettenenzym Cytochrom C Oxidase in der Leber der Bachschmerlen führte die Grundbelastung zu einem signifikanten Anstieg der totalen Aktivität um 75 % am Tag 18 relativ zur Lösungsmittelkontrolle (Tab. 8.1.3.3). Auch hier bewirkte die 48 h Peakbelastung bereits nach 2 Tagen eine weitere Aktivitätszunahme um 25 % gegenüber der Grundbelastung und einen Anstieg auf das 2-fache der DMSO-Kontrolle, um bis zum 26. Tag auf 65 % des Kontrollwertes nachzugeben (Abb. 8.1.3.3).

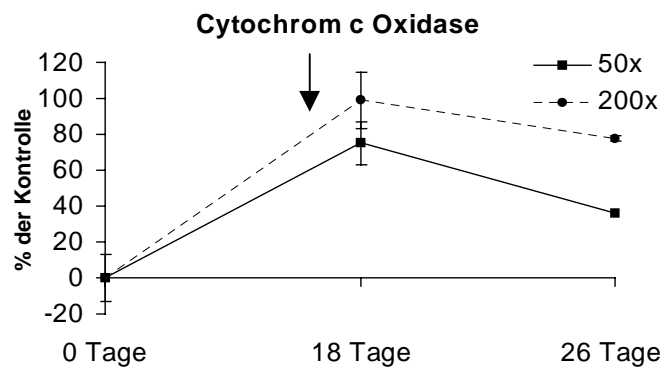


Abb. 8.1.3.3 Spezifische Aktivität der Cytochrom C Oxidase aus der Leber von Bachschmerlen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag (↕), n = 8; * p < 0,05 nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney

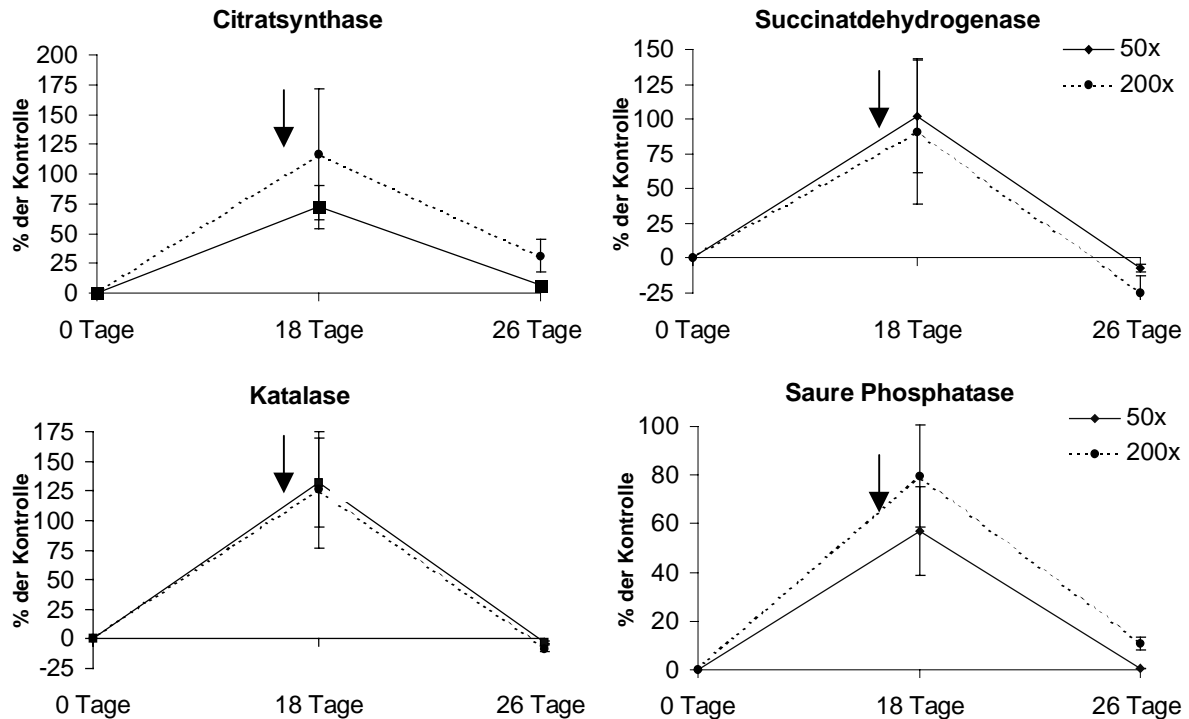


Abb. 8.1.3.3 Totale Aktivität der Succinatdehydrogenase, Citratsynthase, Katalase und Sauren Phosphatase aus der Leber von Bachschmerlen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag (⇕), n = 8; * p < 0,05; ** p < 0,0; *** p < 0,001 nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Saure Phosphatase und Katalase. Auf Proteinebene konnten für die Saure Phosphatase sowie die Katalase keine Anhaltspunkte für signifikante Abweichungen gegenüber der Referenz gefunden werden. Der Bezug auf die totale Aktivität der Sauren Phosphatase ließ jedoch einen Anstieg um 57 % bei den der Grundbelastung exponierten Tieren und eine Zunahme auf über 80 % bei den Tieren des 200-fachen Peaks (p < 0,01) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle am Tag 18 erkennen (Abb. 8.1.3.3; Tab. 8.1.3.3). Um mehr als das Doppelte war die Aktivität der peroxisomalen Katalase nach 18 Tagen Grundbelastung relativ zur Kontrolle angestiegen, wobei die kurzzeitig höhere Belastung durch den 200-fachen Cocktail über das Niveau der Grundbelastung hinaus (p < 0,01) keinen weiteren Einfluss hatte. Bei beiden Enzymen kehrten die Aktivitäten bis Expositionsende auf das Niveau der Kontrolltiere zurück.

Malatenzym, Phosphofruktokinase, Hexokinase und Alaninaminotransferase. Eine deutliche Antwort bewirkte der Belastungsspeak bei Phosphofruktokinase und Malatenzym: Bei beiden Enzymen kam es 48 Stunden nach der erhöhten Belastung zu einem starken Anstieg der spezifischen Aktivität um 110 - 160 % des Referenzwertes (Abb. 8.1.3.4; Tab. 8.1.3.2), während die Grundbelastung mit dem 50-fachen Cocktail zu keinen nennenswerten Veränderungen führte. Ein ähnliches Bild ergab der Bezug auf die Aktivität pro g Leber, wenngleich die Abweichungen mit 50 - 90 % geringer ausfielen (Tab. 8.1.3.3). Auch bei der Alaninaminotransferase bewirkte der Belastungsspeak nach 2 Tagen eine über die Grundbelastung hin-

ausgehende Aktivitätssteigerung um 41 - 57 %. 10 Tage nach dem Belastungspeak konnten bei den drei Enzymen keine Abweichungen von der Kontrolle mehr festgestellt werden. Eine Ausnahme zum Induktionsverhalten der bisher beschriebenen Enzyme bildete die Hexokinase: Erst 10 Tage nach dem Belastungspeak stieg die spezifische Aktivität um 51 % über das Niveau des Kontrollwertes (Abb. 8.1.3.4), während die 50-fache Grundbelastung zu keiner Veränderung führte.

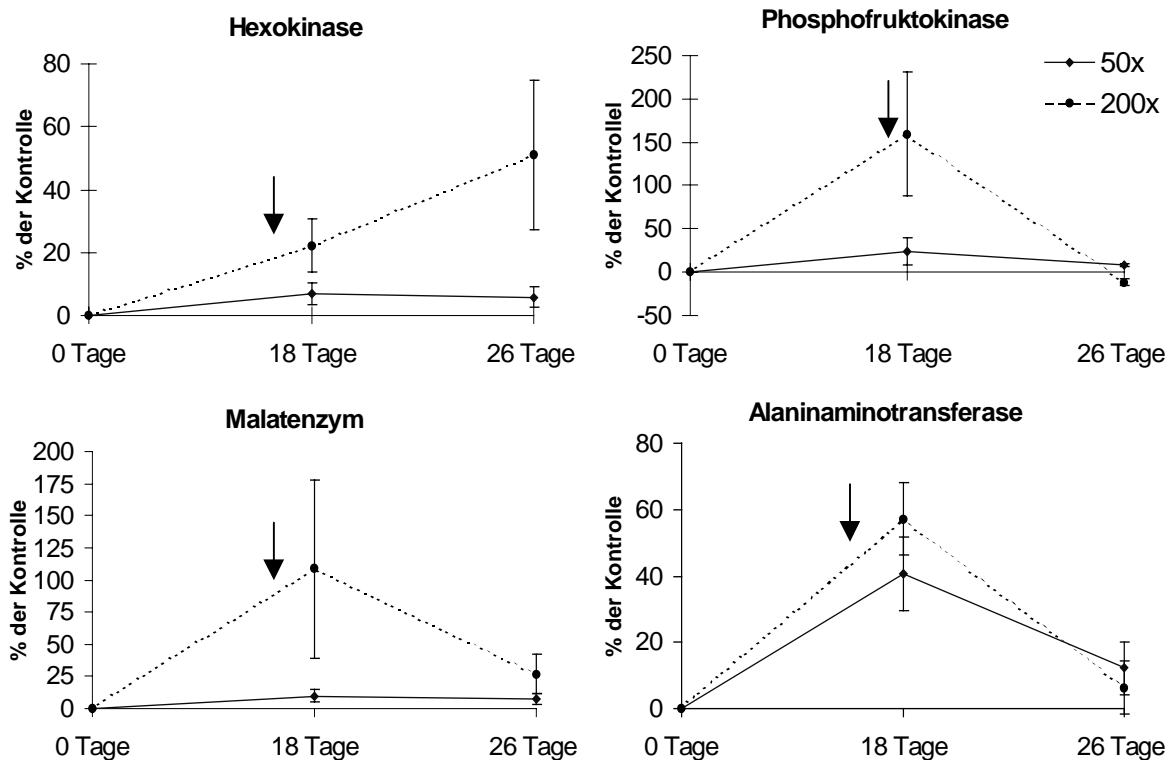


Abb. 8.1.3.4 Spezifische Aktivität der Hexokinase, Phosphofruktokinase, Alaninaminotransferase und dem Malatenzym aus der Leber von Bachschmerlen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag (\blacktriangledown), $n = 8$; * $p < 0,05$ nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Glucose-6-P-Dehydrogenase und Esterase. Bei der Glucose-6-P-Dehydrogenase bewirkte bereits die Grundbelastung wie auch der Belastungspeak bis Tag 18 einen deutlichen Anstieg der spezifischen Enzymaktivität auf 114 - 137 % der Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,01$) (Abb. 8.1.3.5; Tab. 8.1.3.2). Deutlich geringer fiel die Induktion der mikrosomalen Esterase aus, wengleich auch hier tendenziell der Belastungspeak eine höhere Aktivität gegenüber der Grundbelastung induzierte (Abb. 8.1.3.5). Während die spezifische Aktivität gegen Ende der Exposition das Kontrollniveau erreichte, sank die totale Aktivität bei den Tieren des Belastungspeaks bis zum 26. Tag um 30 % unter den Kontrollwert (Tab. 8.1.3.3).

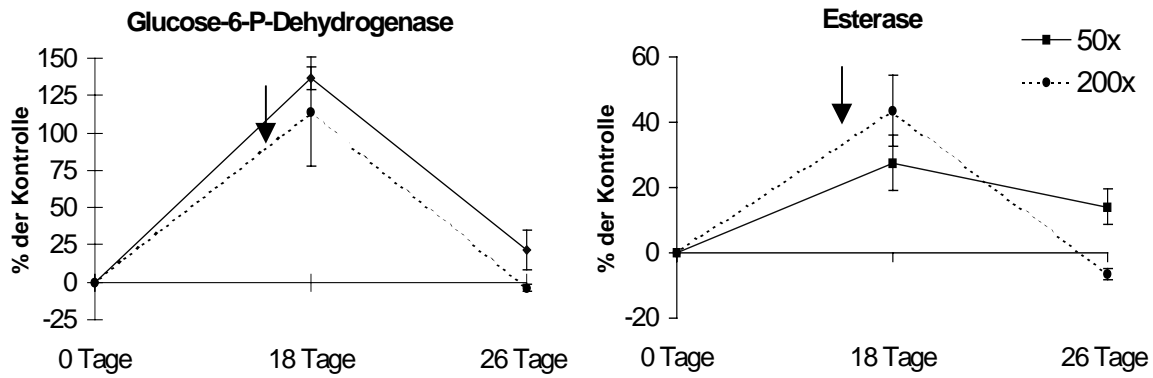


Abb. 8.1.3.5 Spezifische Aktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase und der Esterase aus der Leber von Bachschmerlen nach 26 Tagen Grundbelastung gegenüber einem Schadstoffcocktail der 50-fachen mittleren Körschkonzentration und einer 48-stündige Dosiserhöhung auf die 200-fache mittlere Körschkonzentration am 15. und 16. Tag (↕), n = 8.; ** p < 0,01; *** p < 0,001 nach dem Rang-Summentest nach Mann-Whitney.

Tab. 8.1.3.2 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*). Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer Grundbelastung mit 50-fachen Cocktail ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am 15. und 16.Tag für 48 h bei 4-facher Grundbelastung (Peak) exponiert. Bezug: mU/mg Protein

Probennahme: Cocktail '99	DMSO 18. Tag	50x Cocktail 18. Tag	200x Cocktail 18. Tag	DMSO 26. Tag	50x Cocktail 26. Tag	200x Cocktail 26. Tag
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	1001 ± 203 n = 8	1060 ± 3010 n = 8	893 ± 363 n = 8	1413 ± 339 n = 8	1517 ± 623 n = 8	1409 ± 299 n = 8
Cytochrom C Oxidase	9,89 ± 2,93 n = 8	9,22 ± 2,37 n = 8	14,26 ± 4,46* n = 7	17,1 ± 3,89 n = 8	16,0 ± 4,75 n = 8	21,3 ± 7,75 n = 8
Leber:						
Cytochrom C Oxidase	15,55 ± 3,90 n = 8	16,14 ± 4,79 n = 7	14,76 ± 1,71 n = 8	8,10 ± 3,42 n = 8	11,97 ± 3,32** n = 8	14,95 ± 4,92** n = 8
Succinatdehydrogenase	9,99 ± 2,60 n = 8	10,03 ± 3,84 n = 8	7,67 ± 2,91 n = 8	7,85 ± 3,15 n = 8	8,91 ± 2,68 n = 8	7,82 ± 2,82 n = 8
Citratsynthase	2,77 ± 0,569 n = 7	2,89 ± 0,46 n = 7	2,57 ± 0,492 n = 7	3,24 ± 0,86 n = 8	4,48 ± 0,95 n = 8	5,08 ± 2,47* n = 8
Saure Phosphatase	24427 ± 5326 n = 8	21969 ± 3400 n = 7	21304 ± 3176 n = 8	17,686 ± 3761 n = 8	20835 ± 5182 n = 8	22210 ± 6662 n = 8
Katalase	35,22 ± 7,63 n = 8	44,77 ± 8,01 n = 7	35,66 ± 4,54 n = 8	39,54 ± 21,00 n = 8	49,04 ± 16,92 n = 8	43,63 ± 4,25 n = 8
Alaninaminotransferase	278 ± 89 n = 8	391 ± 105 n = 7	437 ± 160 n = 8	189 ± 74 n = 8	212 ± 141 n = 8	201 ± 76 n = 8
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	81,2 ± 39,1 n = 7	25,8 ± 11,0*** n = 7	174 ± 55,7** n = 7	110 ± 78,7 n = 8	134 ± 81,2 n = 8	106 ± 73,2 n = 8
Phosphofruktokinase	36,6 ± 31,4 n = 7	45,5 ± 28,9 n = 6	84,8 ± 42,7* n = 8	37,9 ± 9,6 n = 6	45,6 ± 25,5 n = 7	33,3 ± 18,9 n = 8
Malatenzym	314 ± 96 n = 6	345 ± 165 n = 6	655 ± 416 n = 7	340 ± 157 n = 8	366 ± 216 n = 8	431 ± 243 n = 8
Hexokinase	30,0 ± 20,9 n = 7	30,5 ± 20,2 n = 7	37,8 ± 28,8 n = 7	20,0 ± 15,3 n = 8	16,6 ± 9,24 n = 8	23,7 ± 11,0 n = 8
Esterase	204 ± 82,2 n = 7	260 ± 80,2 n = 8	293 ± 72,9* n = 8	248 ± 89,9 n = 8	283 ± 107 n = 8	232 ± 62,9 n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Versuchsbäche und dem Labor wurden mit dem Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 8.1.3.3 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*). Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer Grundbelastung mit 50-fachen Cocktail ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am 15. und 16.Tag für 48 h bei 4-facher Grundbelastung (Peak) exponiert. Bezug: mU/g Organ

Probennahme: Cocktail '99	DMSO 18. Tag	50x Cocktail 18. Tag	200x Cocktail 18. Tag	DMSO 26. Tag	50x Cocktail 29. Tag	200x Cocktail 26. Tag
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	62943 ± 26370 n = 8	68564 ± 27889 n = 8	70577 ± 32190 n = 8	93030 ± 36410 n = 8	84664 ± 27221 n = 8	82479 ± 30118 n = 8
Cytochrom C Oxidase	423 ± 166 n = 8	593 ± 198 n = 8	588 ± 235 n = 8	1540 ± 430 n = 8	1135 ± 527 n = 8	1633 ± 422 n = 8
Leber:						
Cytochrom C Oxidase	305 ± 178 n = 8	534 ± 247* n = 7	607 ± 216* n = 8	373 ± 118 n = 8	509 ± 185 n = 8	663 ± 232* n = 7
Succinatdehydrogenase	178 ± 73 n = 8	360 ± 143** n = 8	340 ± 195 n = 8	395 ± 227 n = 8	366 ± 135 n = 8	295 ± 149 n = 8
Citratsynthase	54 ± 34 n = 7	93 ± 23 n = 7	117 ± 55* n = 7	170 ± 91 n = 8	182 ± 81 n = 8	223 ± 101 n = 7
Saure Phosphatase	472 ± 246 n = 8	742 ± 237 n = 7	848 ± 222** n = 8	862 ± 283 n = 8	867 ± 320 n = 8	955 ± 245 n = 7
Katalase	665 ± 328 n = 8	1543 ± 437*** n = 8	1502 ± 583** n = 8	2209 ± 1068 n = 8	2149 ± 1087 n = 7	2030 ± 628 n = 7
Alaninaminotransferase	102881 ± 29608 n = 7	133563 ± 37156 n = 7	120790 ± 49659 n = 8	91938 ± 48862 n = 8	60202 ± 33794 n = 8	74428 ± 14223 n = 8
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	37435 ± 23054 n = 7	77059 ± 30750 * n = 7	51378 ± 15849 n = 8	43805 ± 25263 n = 8	40449 ± 18079 n = 7	40419 ± 28475 n = 8
Phosphofruktokinase	15202 ± 13917 n = 7	12433 ± 8277 n = 7	22153 ± 10736 n = 8	24552 ± 18877 n = 6	16096 ± 10681 n = 7	12887 ± 7776 n = 8
Malatenzym	125264 ± 37984 n = 6	205486 ± 166991 n = 8	236677 ± 184717 n = 8	192885 ± 122036 n = 8	147942 ± 89789 n = 8	157331 ± 70623 n = 8
Hexokinase	8973 ± 2902 n = 6	11472 ± 7819 n = 8	10340 ± 6995 n = 7	9420 ± 7283 n = 7	6692 ± 3506 n = 8	8721 ± 2651 n = 8
Esterase	82081 ± 33559 n = 7	89673 ± 36782 n = 7	80839 ± 23717 n = 8	122029 ± 90354 n = 7	107853 ± 63317 n = 8	88885 ± 21483 n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Leber bzw. Gehirn ± Standardabweichung in n Proben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tieren der Versuchsbäche und dem Labor wurden mit dem Whitney-Rangsummentest ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

8.2 Ultrastrukturelle Veränderungen

Bachforelle und Bachschmerle - *In vivo*

Zusammenfassung: Parallel zu biochemischen Untersuchungen wurden Bachforellen und Bachschmerlen nach Exposition gegenüber einer subletalen Konzentration eines 50-fachen Körsch-PAH-Cocktails in Kombination mit einem 48 h Expositionsspeak der 200-fachen Körschkonzentration (15. Tag) auf cytologische Veränderungen in der Leber untersucht. Als Referenz wurden ein 50-facher Grundbelastungsansatz ohne Belastungsspeak und eine Lösungsmittelkontrolle gefahren. Die Beprobungen erfolgten am Tag 18 und Tag 26. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnten deutliche Effekte v. a. in Bezug auf die Kernform, Peroxisomenproliferation, Fragmentierung des RER und Induktion von SER sowie einer erhöhten Lipideinlagerung beobachtet werden. Effekte waren am 18. Tag in den Gruppen des Belastungsspeaks geringfügig stärker ausgeprägt und bis zum 26. Tag persistent.

8.2.1 Einleitung

Die vorangegangenen biochemischen Untersuchungen konnten bei Bachforelle und Bachschmerle deutliche Induktionsantworten 2 Tage nach dem Belastungsspeak aufzeigen und Hinweise auf induzierte Stoffwechselkreisläufe liefern. Im folgenden sollen cytologische Endpunkte weitere Informationen über den Angriffspunkt der Schadstoffe liefern.

In zahlreichen Untersuchungen lieferten ultrastrukturelle Untersuchungen an Organsystemen wie der Leber (Braunbeck *et al.*, 1990a; Braunbeck *et al.*, 1990b; Burkhard-Holm *et al.*, 1999; Hinton, 1994), Kiemen (Pawert *et al.*, 1998) sowie Zellkulturen Zellkulturen (Zahn *et al.*, 1993; Zahn *et al.*, 1995) wertvolle und sensitive Antworten bei der Bewertung von toxischen Monosubstanzen oder komplexen Schadstoffbelastungen aus der Umwelt. (Köhler, 1990).

Die nachfolgenden cytologischen Untersuchungen beschäftigten sich mit folgenden Aspekten:

- ein ultrastrukturelles Korrelat zu den biochemischen Befunden bilden
- Angriffspunkte der Xenobiotica auf cytologische Strukturen aufzeigen
- Adaptions- und evtl. Regenerationsmechanismen aufzeigen.

8. Ergebnisse und Diskussion

8.2.2 Ergebnisse

Tab. 8.2.2.1 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) nach Exposition gegenüber einem PAH-Cocktail, der der 50-fachen bzw. 200-fachen mittleren PAH-Konzentrationen der Körsch angelehnt wurde. Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer 50-fachen Grundbelastung ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am Tag 14 für 48 h der 200-fachen Körschbelastung (Peak) exponiert.

		Kontrolle	Cocktailexposition 18. Tag		Kontrolle	Cocktailexposition 26. Tag	
		DMSO	50-fach	200-fach	DMSO	50-fach	200-fach
Intrazelluläre Gliederung		+++	+ / +++	+ / +++	+++	+ / +++	+ / +++
Parenchymheterogenität		++	++	++	+	+++	+++
Kern	Form	+++	++	++ / +++	++ / +++	++	++
	Lage	+++	++ / +++	+++	+++	+ / ++	+ / ++
Peroxisomen	Menge	+ / ++	+++	+++	+	+++	+++
	Größe	+	+	+ / ++	+ / ++	+	+ / ++
	Heterogenität	+	+	+	+	++	++
Mitochondrien	Menge	++	++ / +++	++ / +++	++	++ / +++	+++
	Größe	++	++	++	+ / ++	+ / +++	+ / +++
	Heterogenität	++	++	++	+	+++	+++
RER	Menge	++	+++	+++	++	++ / +++	+++
	Stapel	++	+ / ++	++	+	++	++
	Parallele Zister- nen	+++	++ / +++	++ / +++	+++	++	++
	Fragmentierung	+	++	+ / +++	-	+ / +++	+ / +++
	Dilatation	+	+	+	-	+	+
	Fenestrierung	-	+ / +++	+	+	++	++
SER	Menge	-	+	+ / ++	-	++	++
	Stapel	-	-	-	-	-	-
	Lage im Glykogen	-	+	+	-	+	+
	Lage verteilt	-	++	++	-	++	++
Golgi	Menge	+	- / ++	++	+	+	+
	Zisternen	+	+ / ++	+	+++	++	++
	Fenestrierung	-	-	-	-	-	-
Lysosomen	Menge	+	++	++	+ / ++	++	+++
	Autophagosomen	+	+	++	-	++	++
	Myelin	+	+	+	+/-	+	+
	Vakuolen	-	+	-	-	+	+
Lipid	Menge	+ / ++	+	+++	++	++	+
	im Glykogen	+++	++	++	+	+++	+++
Glykogen	Menge	++ / +++	++	+++	+	+ / ++	++
Fremdzellen	Macrophagen	-	++	- / ++	-	++	++

++++ Merkmal sehr stark ausgeprägt oder sehr häufig
 +++ stark ausgeprägt oder häufig
 ++ ausgeprägt oder regelmäßig vorkommend
 + wenig ausgeprägt
 - nicht vorhanden

8. Ergebnisse und Diskussion

Tab.8.2.2.2 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber von Bachschmerlen (*Barbatula barbatula*) nach Exposition gegenüber einem PAH-Cocktail, der der 50-fachen bzw. 200-fachen mittleren PAH-Konzentrationen der Körsch angelehnt wurde. Die Cocktailtiere wurden 26 Tage einer 50-fachen Grundbelastung ausgesetzt; Tiere des 200-fachen Cocktails wurden am Tag 14 für 48 h der 200-fachen Körschbelastung (Peak) exponiert.

		Kontrolle	Cocktailexposition 18.Tag		Kontrolle	Cocktailexposition 26.Tag	
		DMSO	50-fach	200-fach	DMSO	50-fach	200-fach
Intrazelluläre Gliederung		+++	++ / +++	+ / ++	+++	+++	+++
Parenchymheterogenität		+	+	+	+	+ / ++	+
Kern	Form	++ / +++	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++
	Lage	+++	+ / ++	+ / ++	+++	+++	+++
Peroxisomen	Menge	+	+ / ++	+ / ++	+	+++	+++
	Größe	+	+ / ++	+	+ / ++	+ / ++	++
	Heterogenität	+	++	+	+	++	+
Mitochondrien	Menge	+	++	+++	++	++	++ / +++
	Größe	++	++	++ / +++	++	+ / ++	++
	Heterogenität	+	+	+ / ++	+	+	+ / ++
RER	Menge	++	+ / ++	++	++	++ / +++	++
	Stapel	-	+	+	+ / ++	+ / ++	+
	Parallele Zister- nen	++ / +++	++	++	+++	+++	+++
	Fragmentierung	+	++	++	+	+ / ++	+
	Dilatation	+	+ / ++	+ / ++	+	+	+
	Fenestrierung	-	+	+ / +++	-	+	+
SER	Menge	- / +	+ / ++	++	-	++	+++
	Stapel	-	-	-	-	-	-
	Lage im Glykogen	+	+	+ / ++	-	+ / ++	+++
	Lage verteilt	+	+++	+++	-	++ / +++	++
Golgi	Menge	++	++	++ / +++	+	++	+++
	Zisternen	+++	+++	+++	++ / +++	+++	+++
	Fenestrierung	+	+	+ / ++	+	+	++
Lysosomen	Menge	+ / ++	++	++	++	++ / +++	++ / +++
	Autophagosomen	-	+	++	+	+	+
	Myelin	+ / ++	+	-	+	++	+
	Vakuolen	-	-	-	-	-	-
Lipid	Menge	+ / ++	+	+ / +++	+	+ / ++	+ / ++
	im Glykogen	+++	++++	+++	++++	+++	++++
Glykogen		+ / ++	+++	++	++ / +++	+ / ++	++
Fremdzellen	Macrophagen	-	+	++	- / +	+	+ / ++

++++ Merkmal sehr stark ausgeprägt oder sehr häufig
 +++ stark ausgeprägt oder häufig
 ++ ausgeprägt oder regelmäßig vorkommend
 + wenig ausgeprägt
 - nicht vorhanden

Ultrastruktur der Bachforellen - *In vivo*

Bachforelle - Kontrolle 18. Tag. Das Leberparenchym der Kontrolltiere bestand weitgehend aus polygonal geformten Hepatocyten mit einer klaren cytoplasmatischen Kompartimentierung in einen meist rundlich bis ovalen Zellkern, eine organellenreiche Zone und einen peripher gelegenen lockeren bis kompakten Glykogengürtel aus unterschiedlich dicht strukturierten Glykogenfeldern (Bildtafel I a, b). Den Zellkern mit seinem diffus verteilten Heterochromatin umgab ein Mantel aus 7 - 12 parallel angeordneten Zisternen des rauhen endoplasmatischen Reticulums (RER), in die sich eine mäßige Anzahl kleiner runder bis länglich gestreckter Mitochondrien einbettete. Dilatationen und Fragmentierungen des RER traten nur in geringem Umfang auf, dagegen konnten RER-Stapel regelmäßig beobachtet werden. Glattes endoplasmatisches Retikulum (SER) trat nicht in Erscheinung, und auch Golgi-Apparate traten nur sporadisch auf. Insgesamt war die Zahl der lysosomalen Elemente und die Myelinbildung stark eingeschränkt (Bildtafel I c), Peroxisomen traten in schwacher bis mäßiger Anzahl auf. Lipid konnte schwach bis mäßig ausgeprägt und nur inmitten von Glykogenfeldern nachgewiesen werden. Fremdzellen in Form von Makrophagen waren nicht zu beobachten.

50-facher Cocktail 18. Tag. Beim 50-fachen PAH-Cocktail konnte eine deutliche Heterogenitätszunahme der intrazellulären Kompartimentierung beobachtet werden (Bildtafel II b), die sich auch in der Parenchymheterogenität der Hepatocyten widerspiegelte (Bildtafel II b, c). Zahlreiche Kerne zeigten Formveränderungen, die vielfach von flachen Einbuchtungen begleitet wurden, während sich das Heterochromatin vermehrt um den Nukleolus bzw. an der Kernperipherie konzentrierte. Das rauhe endoplasmatische Reticulum (RER) war überwiegend in parallelen Zisternen angeordnet, wenngleich Areale ausgeprägter RER-Fragmentierung zunahmen. In einigen Tieren waren RER-Zisternen zugunsten von ER-Fragmenten vollständig aufgelöst, oder es kam zur Bildung von RER-Wirbeln (Bildtafel II b). Bei einer geringfügigen Zunahme der Mitochondrien, die nun häufiger Formveränderung aufwiesen und von zunehmender Auflösung der Cristae geprägt waren, proliferierten die Peroxisomen deutlich (Tab. 8.2.2.1). Glattes endoplasmatisches Reticulum (SER) trat schwach bis mäßig ausgeprägt um Glykogenbereiche auf. Sehr heterogen fielen Golgi-Strukturen aus: Konnte bei zahlreichen Zellen kein Golgi-Apparat beobachtet werden, traten in anderen Zellen Golgi-Apparate mit verstärkter Vesikelbildung hervor (vgl. Tab. 8.2.2.1, Bildtafel II d). Im Cytoplasma konnte ein Zunahme an Lysosomen beobachtet werden, dagegen stagnierte die Menge an Autophagosomen und Myelinstrukturen, während Lipid und Glykogen tendenziell abnahmen. Makrophagen traten regelmäßig auf.

200-facher Cocktail 18. Tag. Vergleichsweise gering fielen die Unterschiede zwischen den Tieren des 50-fachen und des 200-fachen Cocktails aus: Bei zunehmender Parenchymheterogenität konnte bei zahlreichen Zellen eine gestörte cytoplasmatische Kompartimentierung festgestellt werden. Heterochromatin war vielfach an der Kernmembran, der häufig zahlreiche Einbuchtungen aufweisenden Kerne konzentriert (Farbtafel III a, e). Stapel von rauhem ER

waren deutlich ausgeprägt, während Dilatationen und Fenestrierungen des RER nur unwesentlich zunahmen. Neben parallelen ER-Zisternen, die im Extremfall vollständig zugunsten von ER-Vesikeln aufgelöst waren, konnten unregelmäßig Wirbelbildungen des RER beobachtet werden. Mitochondrien, deren Zahl sich nur leicht erhöhte, legten z. T. deutlich an Größe und Heterogenität zu. Auch hier zeigten die mitochondrialen Cristae z. T. deutliche Auflösungserscheinungen. Darüber hinaus konnten häufig intramitochondrielle Einschlüsse beobachtet werden (Bildtafel III d); gleichzeitig nahm die Assoziation der Mitochondrien zum RER zu. Gegenüber dem 50-fachen Cocktailansatzes nahm das in begrenzten Zellarealen verteilt vorkommende glatte endoplasmatische Reticulum (SER) leicht zu, und auch die Zahl und Aktivität der Golgi-Apparate stieg deutlich gegenüber der DMSO-Referenz an. Lysosomen traten vermehrt auf (Bildtafel III b), wobei v. a. Autophagosomen häufiger zu beobachten waren. Myelinwirbel und Vakuolen ließen dagegen gegenüber der Kontrolle kein vermehrtes Auftreten erkennen, während Makrophagen häufig vorkamen. Glykogenreserven nahmen leicht ab, dafür trat Lipid vermehrt in Erscheinung.

Kontrolle 26. Tag. Gegenüber der DMSO-Referenz vom Tag 18 konnten nur unwesentliche Veränderungen in den Leberzellen beobachtet werden: Bei geringer Parenchymheterogenität zeigten die Hepatocyten eine klare cytoplasmatische Kompartimentierung (Bildtafel IV a, b). Keine oder nur geringe Unterschiede ließen Peroxisomen, Mitochondrien, RER, SER sowie die Zahl der Dictyosomen erkennen, wenngleich Golgi-Zisternen wesentlich ausgeprägter (Tab. 8.2.2.1) vorhanden waren. Während Lysosomen und der zellulären Lipidanteil nur sehr leicht zugenommen hatten, war die Glykogenmenge leicht verringert (Tab. 8.2.2.1).

50-facher Cocktail 26. Tag. Ähnlich der DMSO-Referenz fielen Unterschiede zwischen dem 18. und dem 26. Expositionstag auch beim 50-Cocktailansatz relativ gering aus: Unterschiede äußerten sich in einer ausgeprägten Parenchymheterogenität, die v. a. auf große Unterschiede der intrazellulären Kompartimentierung zurückzuführen war. Neben Zellen mit annähernd Kontrollniveau konnten oft auch Zellen mit einer gestörten cytoplasmatischen Kompartimentierung gefunden werden. Erstmals konnten bei den unverändert häufig vorkommenden Peroxisomen Clusterbildungen (Tab. 8.2.2.1; Bildtafel V e, VI b) beobachtet werden, während die Mitochondrien eine gesteigerte Heterogenität erkennen ließen. Die RER-Menge sowie die Fenestrierung des RER waren nur schwach erhöht, dagegen nahm die Fragmentierung uneinheitlich zu: Bei 3 von 6 Tieren traten in der Leber neben Hepatocyten mit geordneten ER-Zisternen (Bildtafel V a), Bereiche mit Zisternenauflösung und gleichzeitiger Vesikulierung des ER auf (Bildtafel V c).

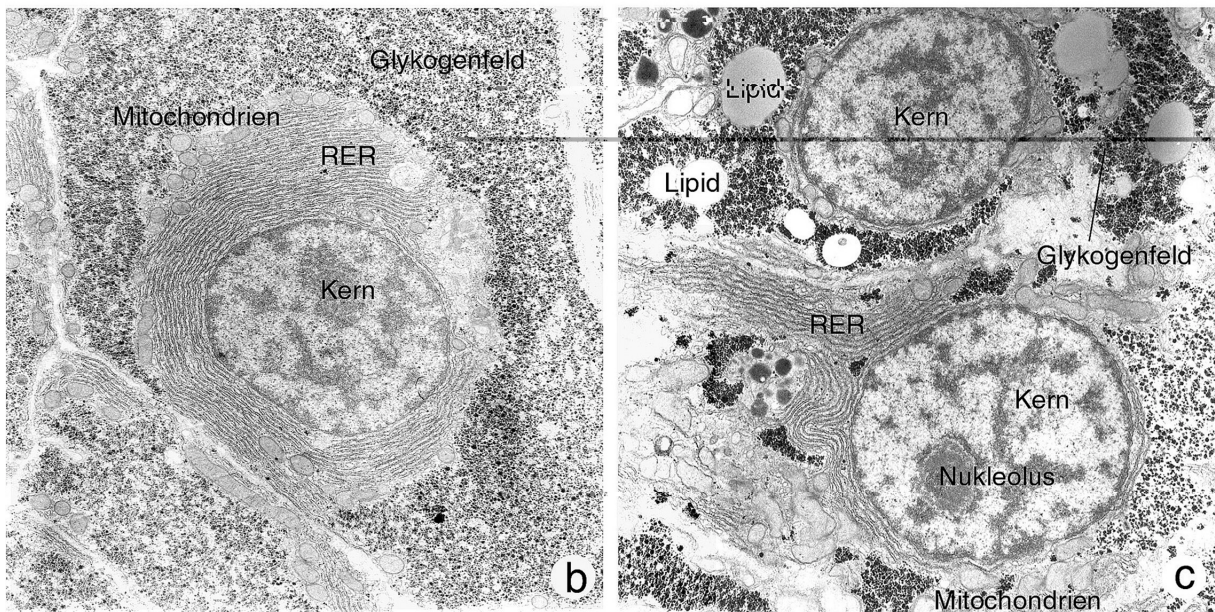
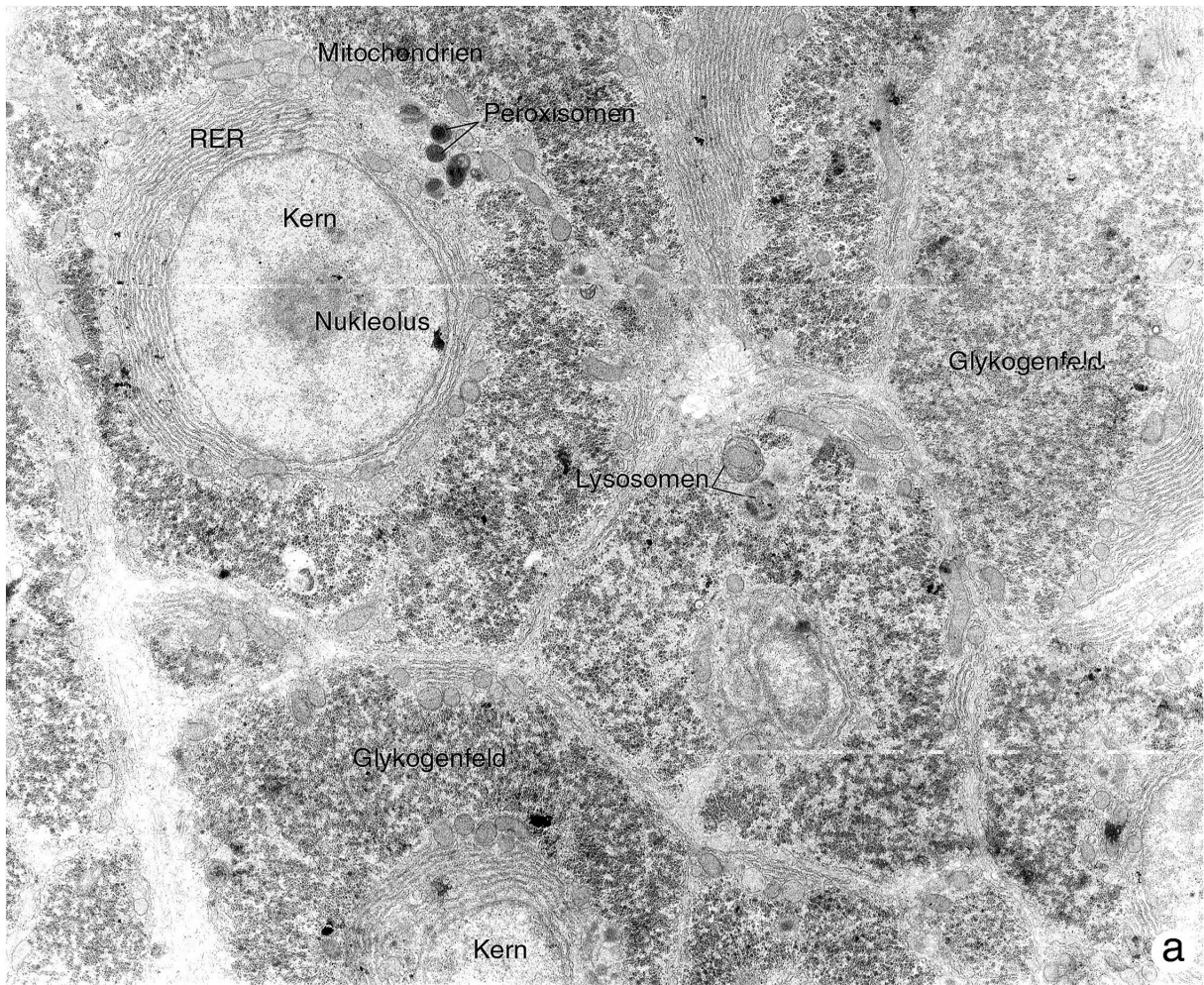
Das ausgeprägte glatte ER war nicht an Glykogen gebunden und trat verteilt im Cytoplasma auf. Golgi-Apparate waren nur sporadisch zu beobachten. Eine leichte Zunahme gegenüber dem 18. Expositionstag konnte bei den Autophagosomen, den sekundären Lysosomen sowie dem Lipid festgestellt werden, Myelinwirbel und Vakuolen waren dagegen nur selten nachzuweisen. Während die Glykogenreserven leicht abgenommen hatten, traten Makrophagen regelmäßig auf. (Tab. 8.2.2.1).

200-facher Cocktail 26. Tag. Nach 26 Tagen Exposition glich die Ultrastruktur der untersuchten Hepatocyten des 200-fachen Cocktailansatzes weitgehendem zuvor beschrieben Bild des 50-fachen Expositionsansatzes. Unterschiede traten lediglich in Form einer leicht erhöhten Anzahl an Mitochondrien und Lysosomen (Bildtafel VI d) sowie einer verringerten Lipideinlagerungen auf (Tab. 8.2.2.1).

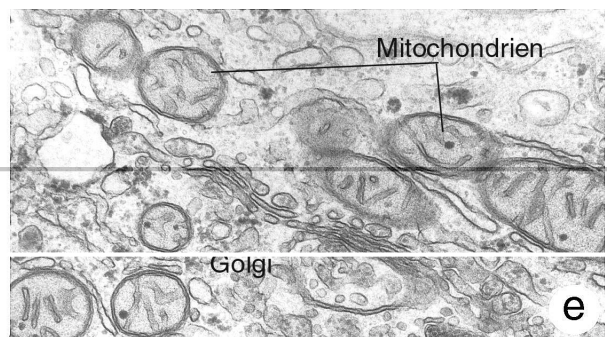
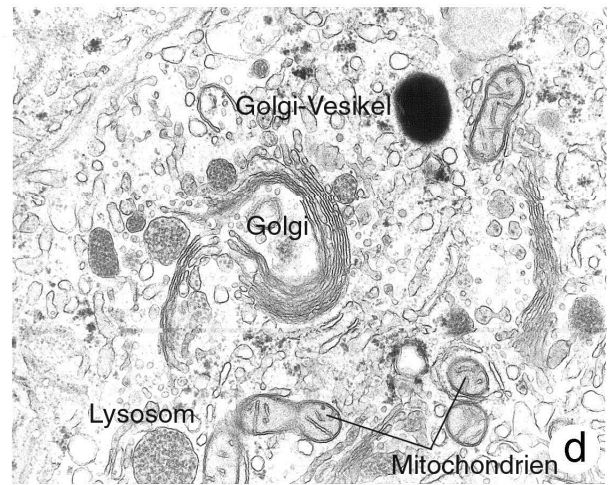
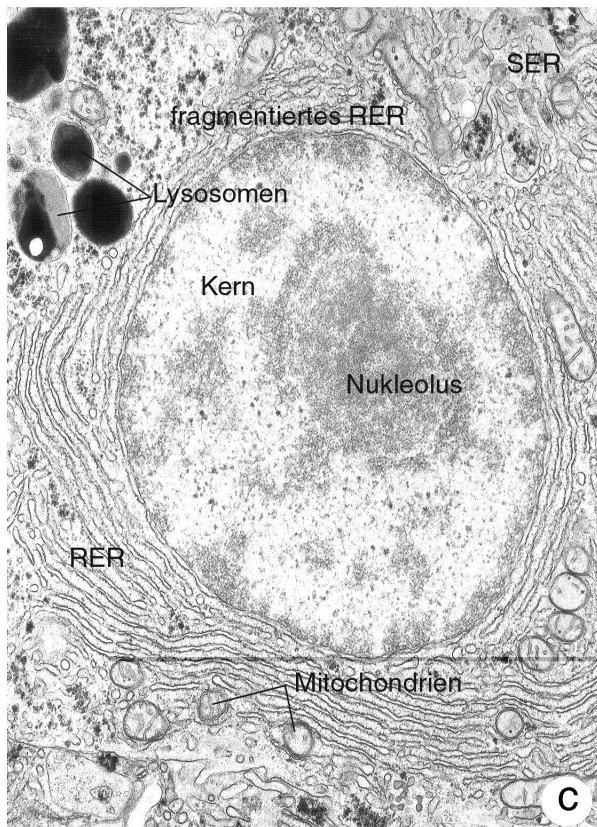
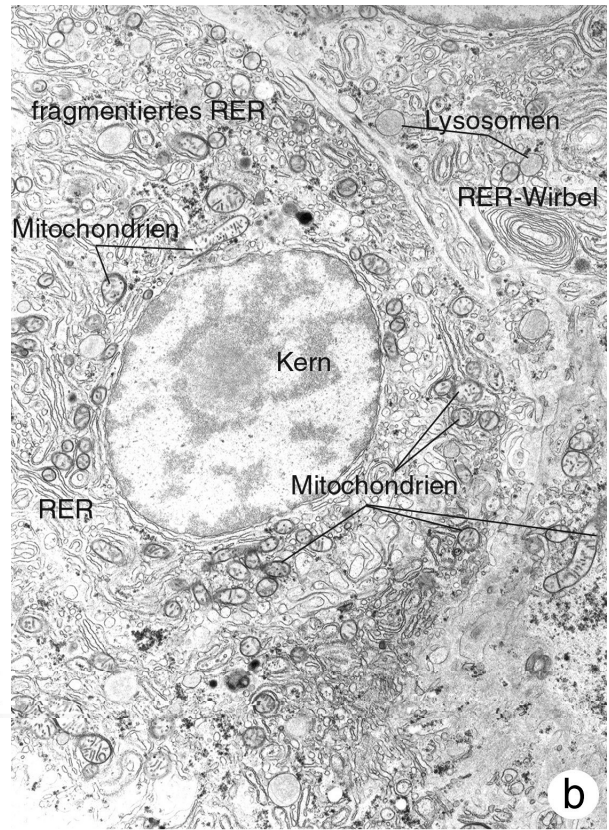
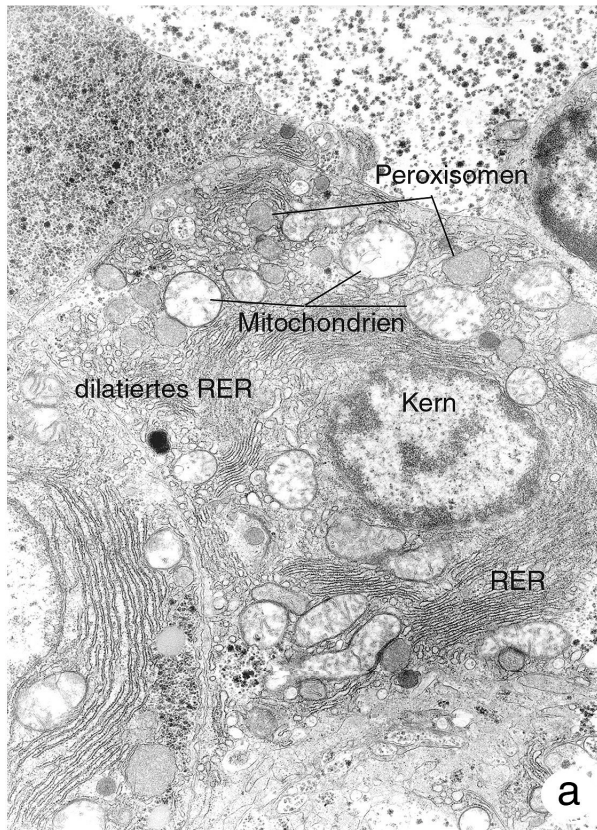
Bildtafel I, nachfolgende Seite

Bachforelle 18. Tag. a: Übersicht Leberparenchym der DMSO-Kontrolle: Intrazelluläre Kompartimentierung mit Zellkern, organellenreiche Zone und Glykogenspeicher; 6.300 x. **b:** Hepatocyte der DMSO-Kontrolle mit großen Glykogenspeichern, rundem Kern und gleichmäßigem RER; 5.500 x. **c:** Hepatocyte der DMSO-Kontrolle: Vereinzelte Zellen mit Lipideinlagerungen neben dichten Glykogenspeichern; 5.750 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



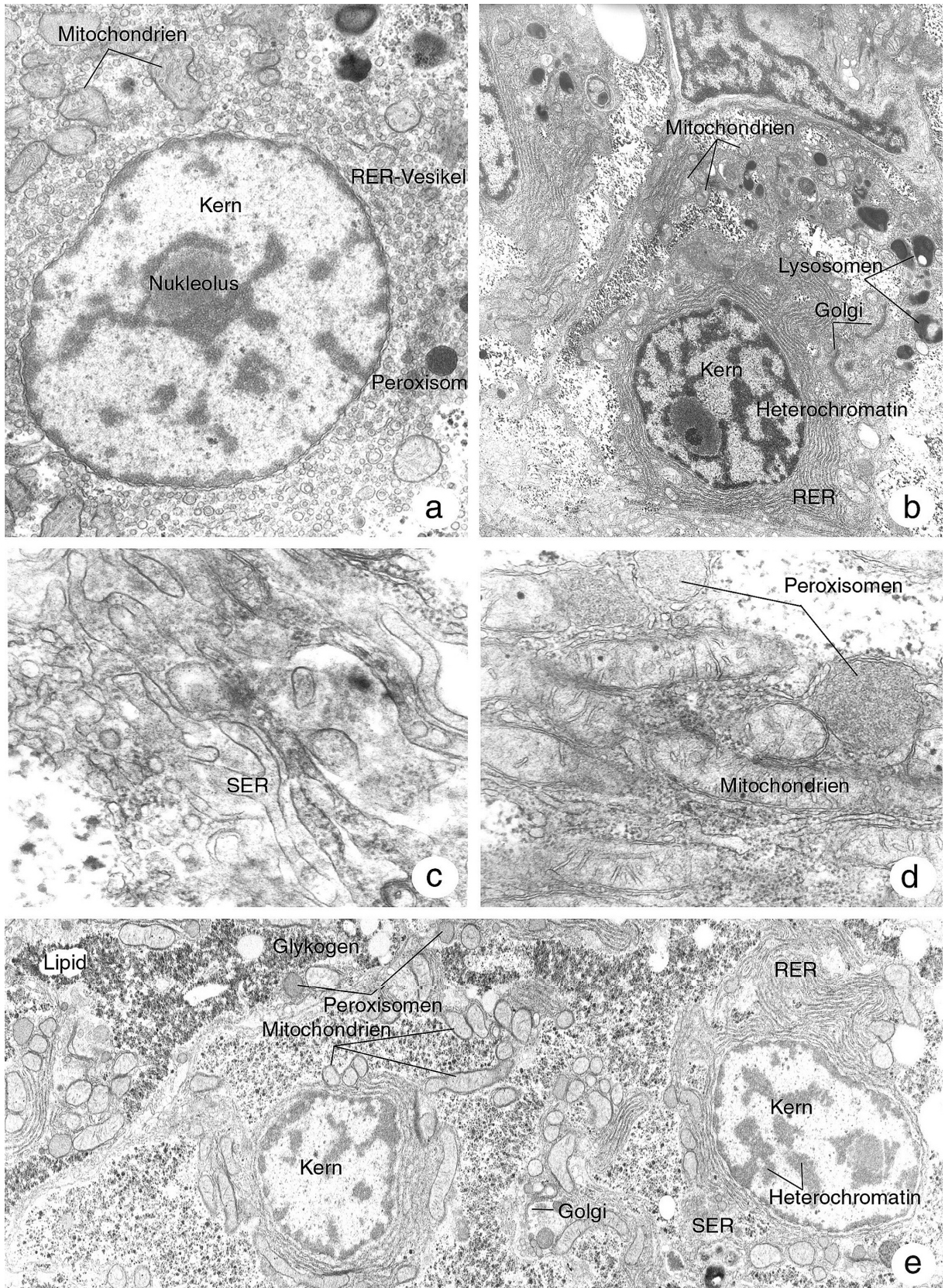
Bildtafel II, vorherige Seite

Bachforelle 18. Tag. Leberparenchym nach 18 Tagen Grundbelastung gegenüber dem 50 x-PAH-Cocktail. **a:** Hepatocyten nach 18 Tagen Grundbelastung gegenüber dem 50x-PAH-Cocktail: gestörte intrazelluläre Kompartimentierung, geschwollene Mitochondrien; 9.500 x. **b:** aufgelöste intrazelluläre Kompartimentierung, Bildung von RER-Wirbeln, RER stark fragmentiert, 5.400 x. **c:** Hepatocyte mit noch relativ geordneter Kompartimentierung; 12.900 x. **d:** geschwollenes Mitochondrium mit aufgelösten Cristae; 57.300 x. **e:** stark ausgeprägter Golgi-Apparat; 16.000 x.

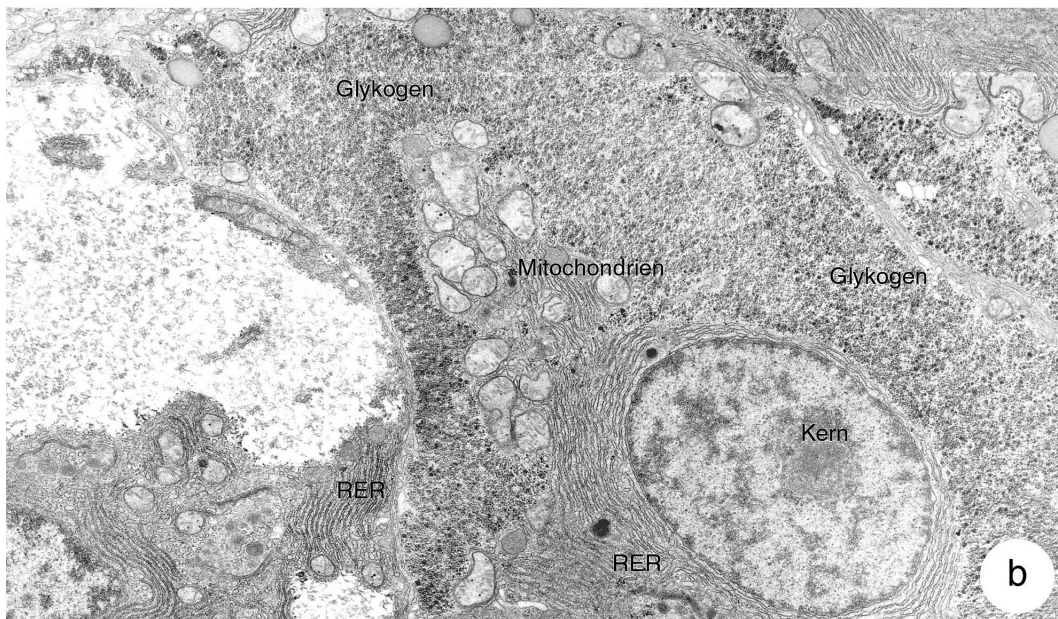
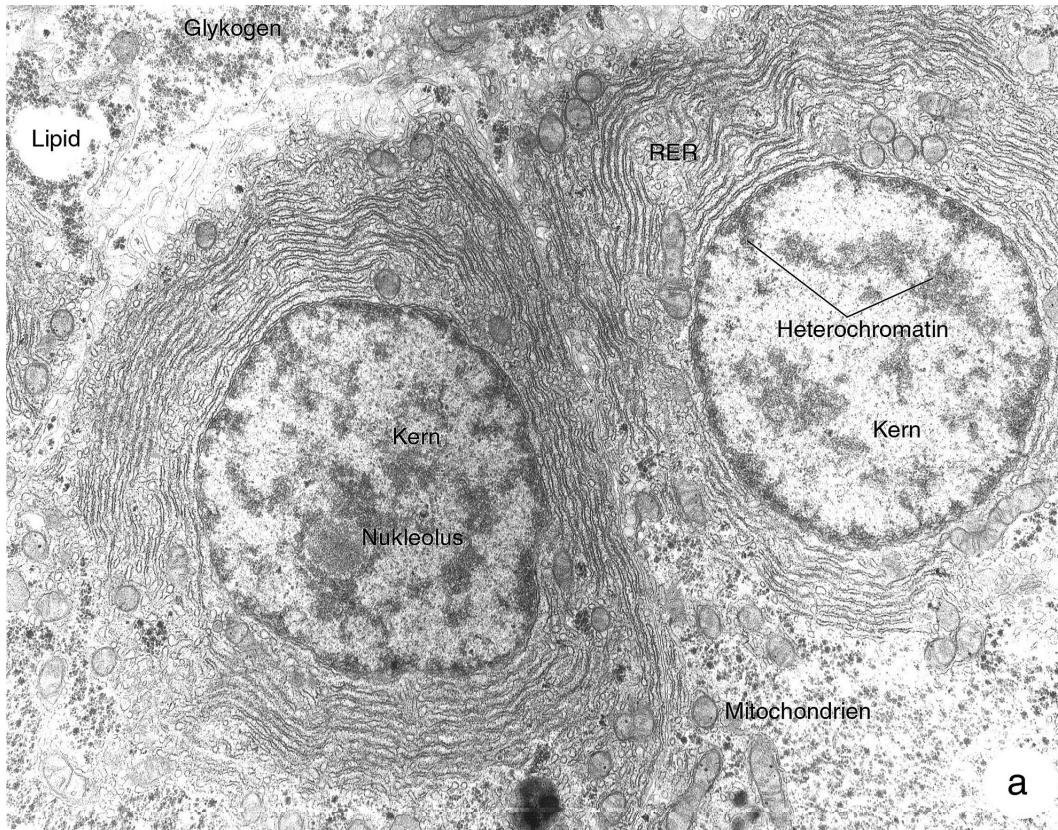
Bildtafel III, nachfolgende Seite

Bachforelle 18. Tag. Leberparenchym nach 14 Tagen Grundbelastung mit dem 50 x PAH-Cocktail und einem 48 h Belastungspeak mit dem 200 x-PAH-Cocktail. **a:** Zellkern mit stark kondensiertem und Heterochromatin und undulierender Kernhülle, starke Vesikulierung des RER; 13.200 x. **b** Übersicht über Hepatocyte: formveränderter Zellkern, vermehrtes Auftreten von Lysosomen, ausgeprägte Golgi-Felder; 3.200 x. **c:** Induziertes glattes endo-plasmatische Reticulum SER; 46.000 x. **d:** Clusterbildung von Mitochondrien und Peroxisomen; 28.700 x. **e:** Übersicht über Hepatocyten mit relativ geordneter Kompartimentierung, jedoch deutlich deformierten Kernen mit stark kondensiertem Heterochromatin; 14.100 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion

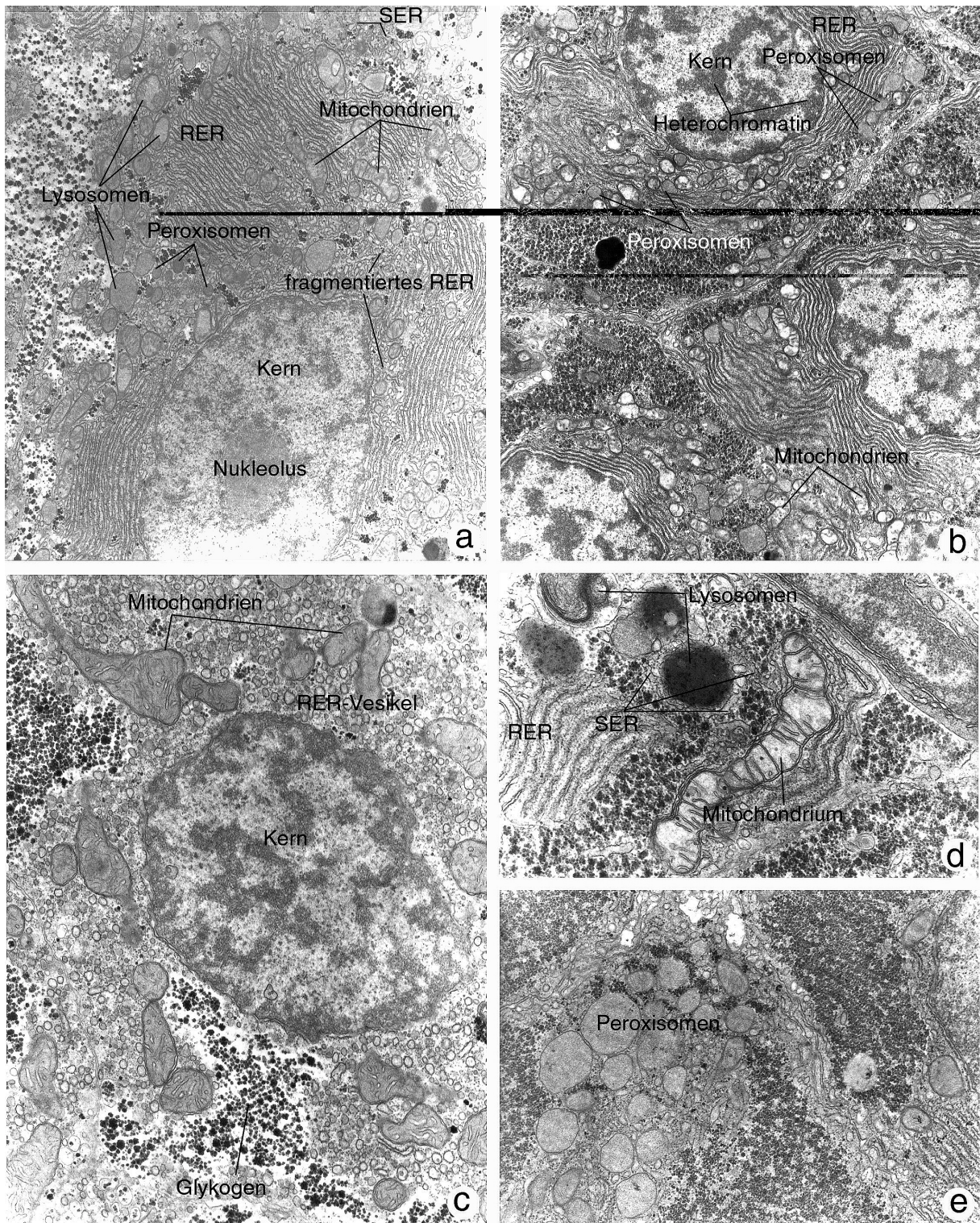
Bildtafel IV, vorherige Seite

Bachforelle 26 Tag. a: Leberparenchym der DMSO-Kontrolle; 10.300 x. **b:** Deutliche Kompartimentierung, leichte Formveränderungen bei den Mitochondrien; 6.000 x.

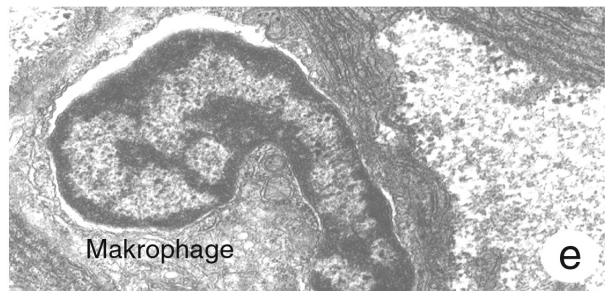
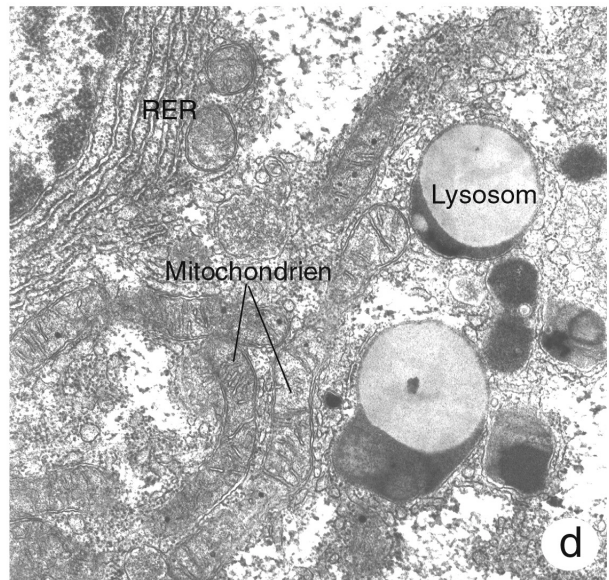
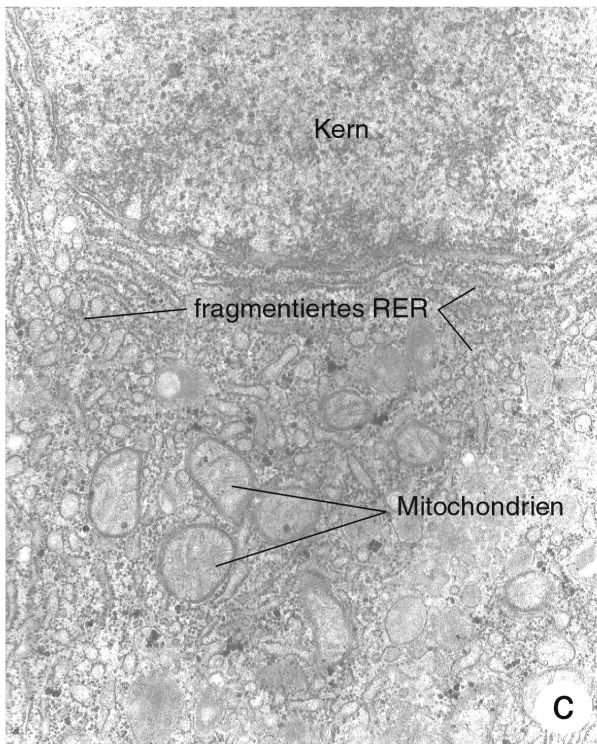
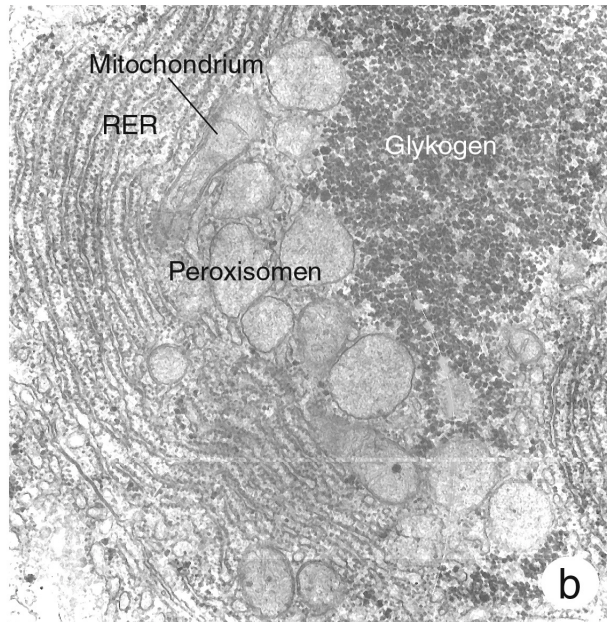
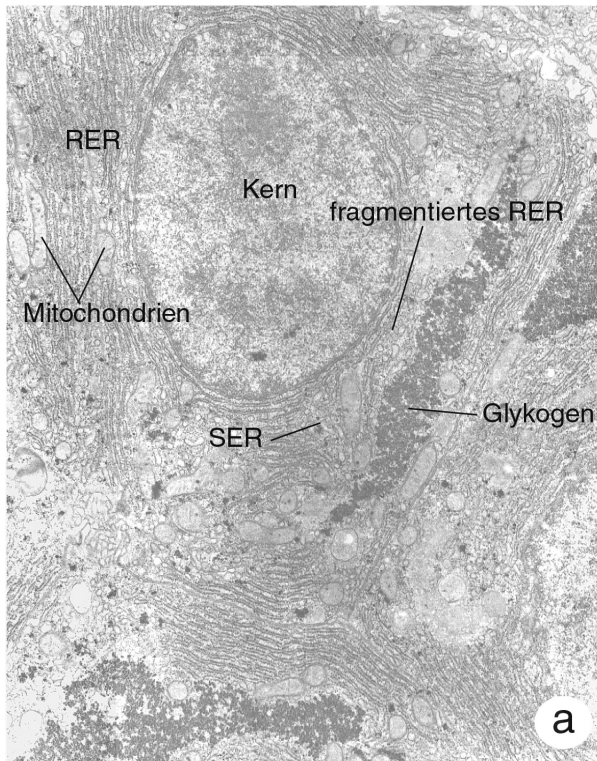
Bildtafel V, nachfolgende Seite

Bachforelle 26. Tag. Leberparenchym nach 26. Tagen Grundbelastung mit dem 50-x PAH-Cocktail. **a:** Hepatocyte; 5.900 x. **b:** Zellkerne weisen noch immer stark kondensiertes Heterochromatin auf, enge räumliche Nähe zwischen Mitochondrien und Peroxisomen; 6.100 x. **V c:** RER vollständig vesikuliert, Mitochondrien deutlich deformiert; 7.500 x. **d:** Riesenmitochondrium, 16.500 x. **e:** Clusterbildung von Peroxisomen; 12.000 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



Bildtafel VI, vorherige Seite

Bachforelle 26. Tag. Leberparenchym nach 26 Tagen Grundbelastung mit dem 50 x PAH-Cocktail und einem 48 h Belastungsspeak mit dem 200 x-PAH-Cocktail zwischen dem 14. und 16. Tag Expositionstag. **a:** Hepatocytenübersicht; 9.800 x. **b:** Clusterbildung von Mitochondrien und Peroxisomen; 22.000 x. **c:** fragmentiertes RER; 18.400. **d:** Neben großen Mitochondrien treten nun vermehrt auch Lysosomen auf; 18.400 x. **e:** Makrophagen wandern vermehrt ins Leberparenchym ein; 14.100 x.

Ultrastruktur der Bachschmerlen - *In vivo*

Bachschmerle - Kontrolle 18. Tag. Die polygonal geformten bis gestreckten Hepatocyten zeigten bei einer geringen Parenchymheterogenität eine deutliche intrazelluläre Gliederung in einen meist runden bis gestreckten Zellkern, eine organellenreiche Zone sowie peripher gelagerte Glykogenfelder (Bildtafel VII a). Den Zellkern mit seinem diffus verteilten Chromatin umgaben 6 bis 8 Reihen rauher ER-Zisternen, in die vereinzelt kleinere Mitochondrien integriert waren. Bereiche fragmentiertem oder dilatiertem ER traten nur sporadisch auf. Peroxisomen konnten in geringer Zahl im Übergangsbereich von ER-Zisternen zu den Glykogenfeldern beobachtet werden, während glattes endoplasmatisches Retikulum nicht oder nur sehr selten über das Plasma verteilt nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu den Bachforellen traten Golgi-Apparate häufiger auf, die sich im Kontrollzustand meist durch eine geringe Aktivität auszeichneten (Bildtafel VII c). Lysosomen waren in geringer bis mäßiger Anzahl zu finden. Innerhalb der untersuchten Tiere kam Glykogen sehr unterschiedlich vor: Neben schwach ausgebildeten Glykogenreserven konnten in einigen Tieren große Glykogenfelder (Bildtafel VII a) beobachtet werden, dagegen waren Lipideinlagerungen sehr viel homogener in geringer Ausprägung vorhanden. Makrophagen konnten nicht beobachtet werden. Bei wenigen Kontrolltieren waren bisweilen Interzellulare erweitert, jedoch könnte es sich hierbei auch um Perfusionsartefakte gehandelt haben (Bildtafel VII d).

50-facher Cocktail 18. Tag. Nach 18 Tagen Exposition gegenüber dem 50-fachen PAH-Cocktail betrafen Unterschiede bei einer zurückgegangenen intrazellulären Gliederung v. a. den Zellkern: Die Kernform war vielfach wellenförmig mit größeren Einbuchtungen (Bildtafel VIII a, c), oft traten zwei Nukleoli pro Zelle auf, die überwiegend randständig an der Kernmembran zum Liegen kamen (Bildtafel VIII a, c), Heterochromatin war dagegen diffus über den Kern verteilt. Rauhes endoplasmatisches Reticulum erfuhr gegenüber der DMSO-Referenz eine Zunahme (Tab. 8.2.2.2), wobei parallele Zisternen mit geringfügigen Dilatationen und Fenestrierungen gegenüber fragmentierten ER-Bereichen überwogen. Stapelbildungen waren nur selten zu finden. Mitochondrien nahmen in Größe und Zahl zu, vielfach kam es

zu enger Assoziation einzelner ER-Zisternen mit Mitochondrien (Bildtafel VIII a), bisweilen schoben sich Mitochondrien auch zwischen Kern und ER-Zisternen.

Peroxisomen nahmen geringfügig gegenüber der DMSO-Referenz zu, während kleinere Felder mit glattem endoplasmatischem Retikulum (SER) über das Plasma verteilt vorgefunden wurden. Dictyosomen nahmen nur unwesentlich zu, jedoch war eine deutlich gesteigerte Aktivität in der Abschnürung von Vesikeln zu beobachten. Myelinwirbel waren schwach ausgeprägt, dagegen konnten Lysosomen regelmäßig gefunden werden. Sekundäre Lysosomen, die bisweilen deutlich an Größe zugenommen hatten sowie Autophagosomen wurden in geringer Anzahl vorgefunden. Der geringe Anteil an Lipid war ausschließlich auf Glykogenfelder beschränkt, die insgesamt deutlich stärker im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgeprägt waren. Vereinzelt konnten Makrophagen beobachtet werden.

200-facher Cocktail 18. Tag. Bei ähnlicher Ultrastruktur im Vergleich zum 50-fachen PAH-Cocktailansatz konnte eine weitere Steigerung der Effekte gegenüber dem Referenzansatz festgestellt werden. Die intrazelluläre Gliederung unterlag einer weiter gesteigerten Auflösung: Der z. T. stark gebuchtete Zellkern war vielfach nur noch von wenigen ER-Lamellen umgeben (Bildtafel IX a, c). Während das Chromatin meist diffus über den Zellkern verteilt war, kam es oft zu randständig, an der Kernmembran gelegenen Nukleoli. Gelegentlich konnten Perforationen der Kernmembran beobachtet werden (Bildtafel IX c). Bei schwacher Peroxisomenproliferation hatte die Zahl der Mitochondrien gegenüber der DMSO-Referenz zugunsten großer Mitochondrien deutlich zugenommen. Unverändert zeigte sich die Menge an RER, das vorwiegend als parallele Zisternen vorkam, wenngleich auch kleinere Areale mit überwiegend ER-Fragmenten beobachtet werden konnten. Stellenweise wies das RER deutliche Fenestrierungen auf. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER), welches überwiegend auf kleinere Felder verteilt vorkam, war leicht erhöht. Ausgeprägt war die Zahl der Golgi-Apparate, die durch starke Vesikelbildung charakterisiert waren. Eine Zunahme konnte auch bei den Autophagosomen, dem Lipid (Bildtafel IX e) und den Makrophagen gegenüber dem 50-fachen Cocktailansatz beobachtet werden (Bildtafel IX c, d).

Kontrolle 26.Tag. Ultrastrukturell entsprach das Bild der Kontrollhepatocyten nach 26 Tagen weitgehend dem Erscheinungsbild der Hepatocyten vom 18. Expositionstag. Im Gegensatz zum 18. Tag lagen bei den meist rundlichen bis ovalen Kernen die Nukleoli häufig randständig, wo sie sonst nur bei den Cocktailgruppen beobachtet werden konnten (Bildtafel X a). Während bei den Peroxisomen keine Veränderungen festgestellt werden konnten, nahm die Zahl und die durchschnittliche Größe der Mitochondrien leicht zu (Bildtafel IX b). Veränderungen beim RER und SER waren marginal, jedoch schien die Zahl der Golgi-Apparate leicht reduziert. Lysosomen kamen regelmäßig vor, wobei auch Autophagosomen sporadisch zu beobachten waren. Lipid blieb in den Kontrollzellen selten und ausschließlich auf das regelmäßig vorkommende Glykogen beschränkt.

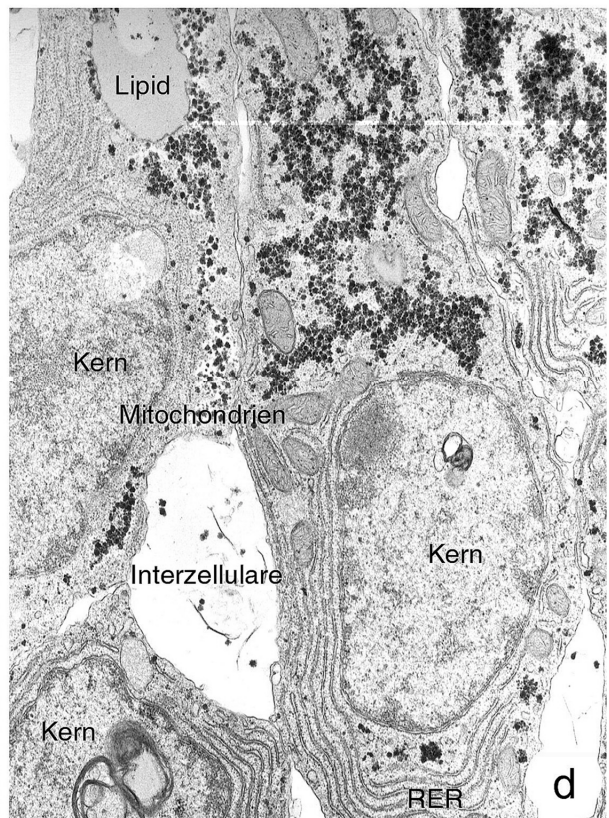
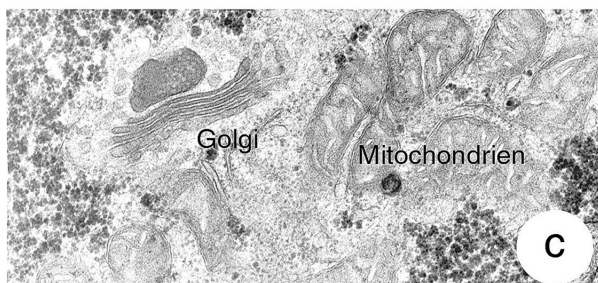
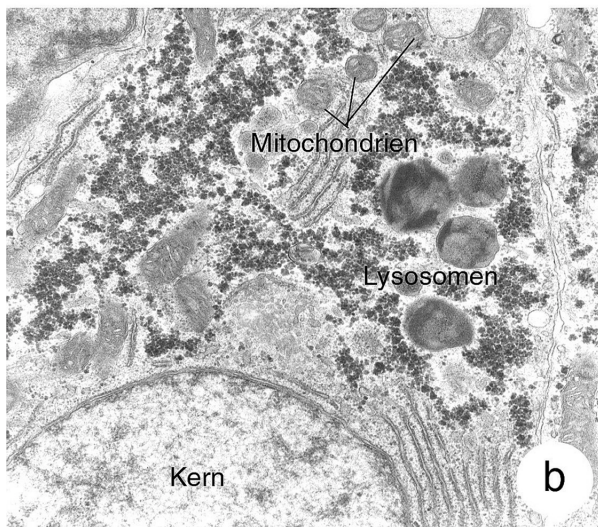
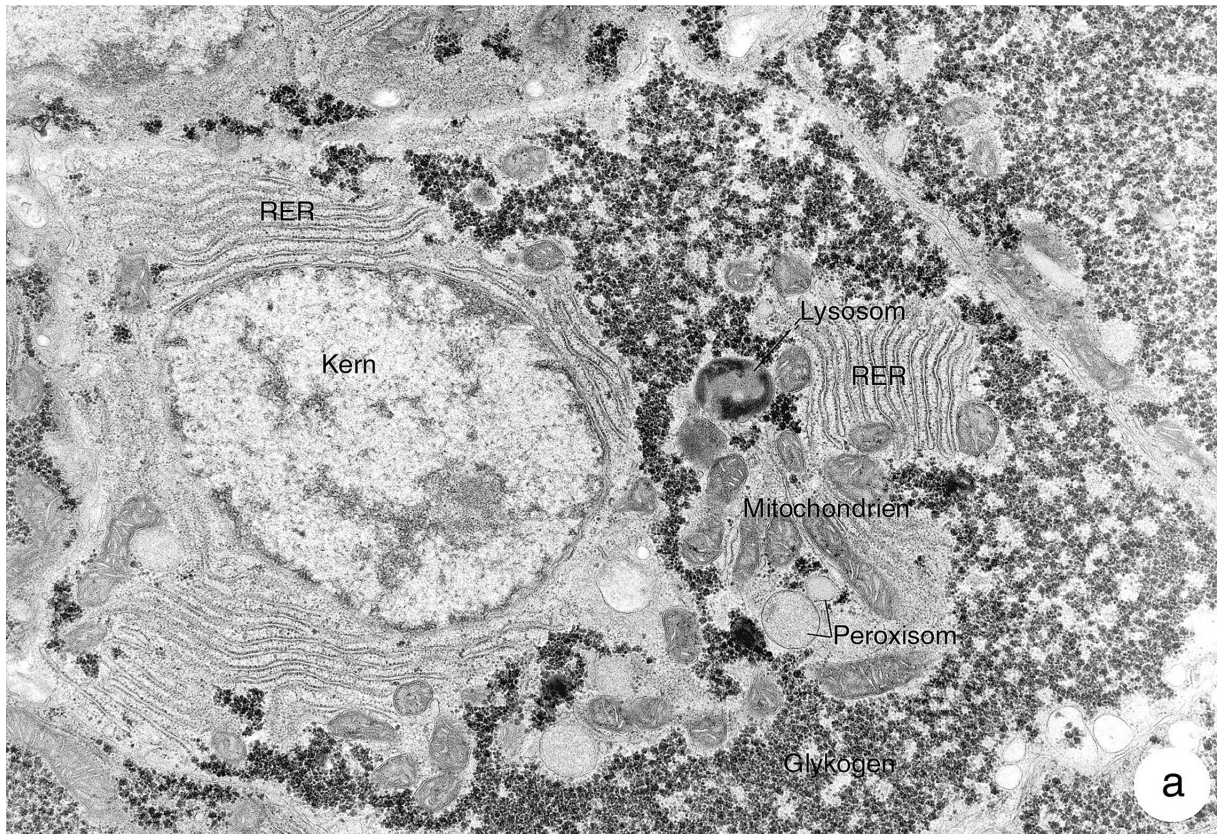
50-facher Cocktail 26. Tag. Zellen der 26 Tage dem 50-fachen PAH-Cocktail exponierten Bachschmerlen waren gegenüber den Referenztieren von einer größeren Heterogenität geprägt: 2 von 6 Tieren erreichten annähernd Kontrollstatus (Bildtafel XI d), während bei 3 Tieren die intrazelluläre Gliederung deutlich verschlechtert war. Häufig ließen die Kerne Einbuchtungen erkennen, parallel dazu kam es zu Ansammlungen von Heterochromatin entlang der Kernmembran (Bildtafel XI c). Im Gegensatz dazu war bei Zellkernen mit runder Form das Chromatin über den Kern verteilt. Peroxisomen traten bei leichter Größenzunahme nun regelmäßig auf, gleichzeitig nahm die räumliche Nähe zu Mitochondrien zu. Gegenüber der DMSO-Referenz und dem 18. Expositionstag stieg der RER-Gehalt an, gelegentlich kam es zu Wirbelbildung. Fragmentierung und Dilatationen des RER traten nur in geringem Umfang auf. Glattes ER trat regelmäßig in kleineren Feldern auf. Keine Veränderungen gegenüber dem 18. Tag waren bei den Golgi-Apparaten zu erkennen; jedoch nahm die Zahl der Lysosomen sowie der Myelinstrukturen stark zu. Makrophagen und Lipid war nur selten vertreten, im Gegensatz dazu war die Glykogenverteilung sehr heterogen verteilt: Neben Zellen mit geringen Glykogenreserven verfügten zahlreiche Zellen über ausgeprägte Glykogenfelder (Bildtafel XI c, d).

200-facher Cocktail 26. Tag. Neben zahlreichen Übereinstimmungen mit dem 50-fachen Cocktailansatz verstärkten sich Effekte zur DMSO-Referenzgruppe: Bei zwei Tieren waren die Interzellularen deutlich erweitert und trotz einer insgesamt schwach bis mäßig ausgeprägten Parenchymheterogenität zeigte die intrazelluläre Gliederung gegenüber dem 18. Expositionstag nur geringfügige Verbesserung (Tab. 8.2.2.2). Einbuchtungen der Kernmembran, wie sie häufig beim 50-fachen PAH-Cocktailansatz beobachtet werden konnten, traten jedoch seltener und in wesentlich abgeschwächerter Form auf. Bei einem Tier konnten in einzelnen Zellen lamellenförmige Ausbildungen der Kernmembran beobachtet werden, die einzelne, in Gruppen vorliegende zusammenstehende Mitochondrien eng umflossen (Bildtafel XII f). Bei überwiegend unverändertem Vorkommen kam es zu einer engen Assoziation von Peroxisomen und Mitochondrien (Bildtafel XII d). Gegenüber dem 18. Tag zeigten sich das RER sowie die Lipid- und Glykogenreserven wenig geändert; dagegen nahm die Zahl der aktiven Golgi-Apparate, der Lysosomen, der Makrophagen sowie die Menge an SER (Bildtafel XII c, e) deutlich zu.

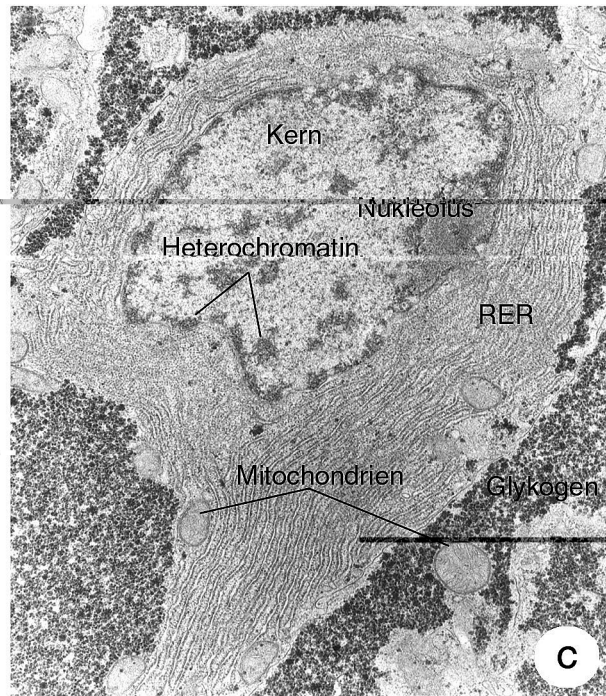
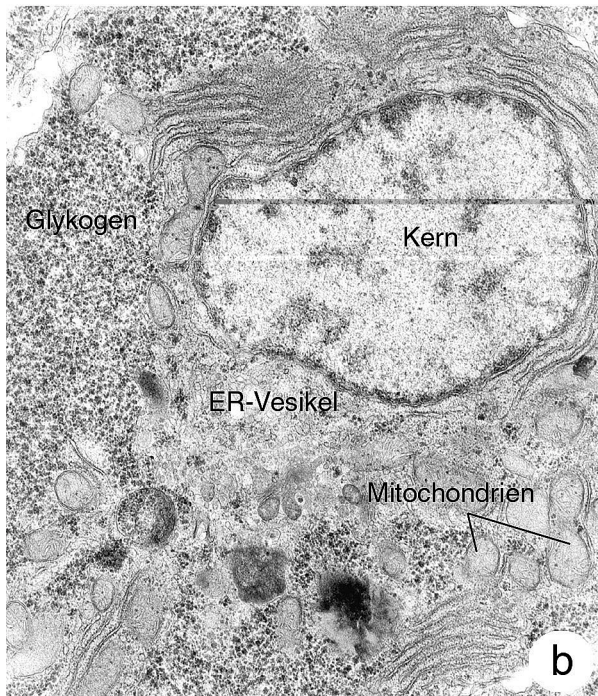
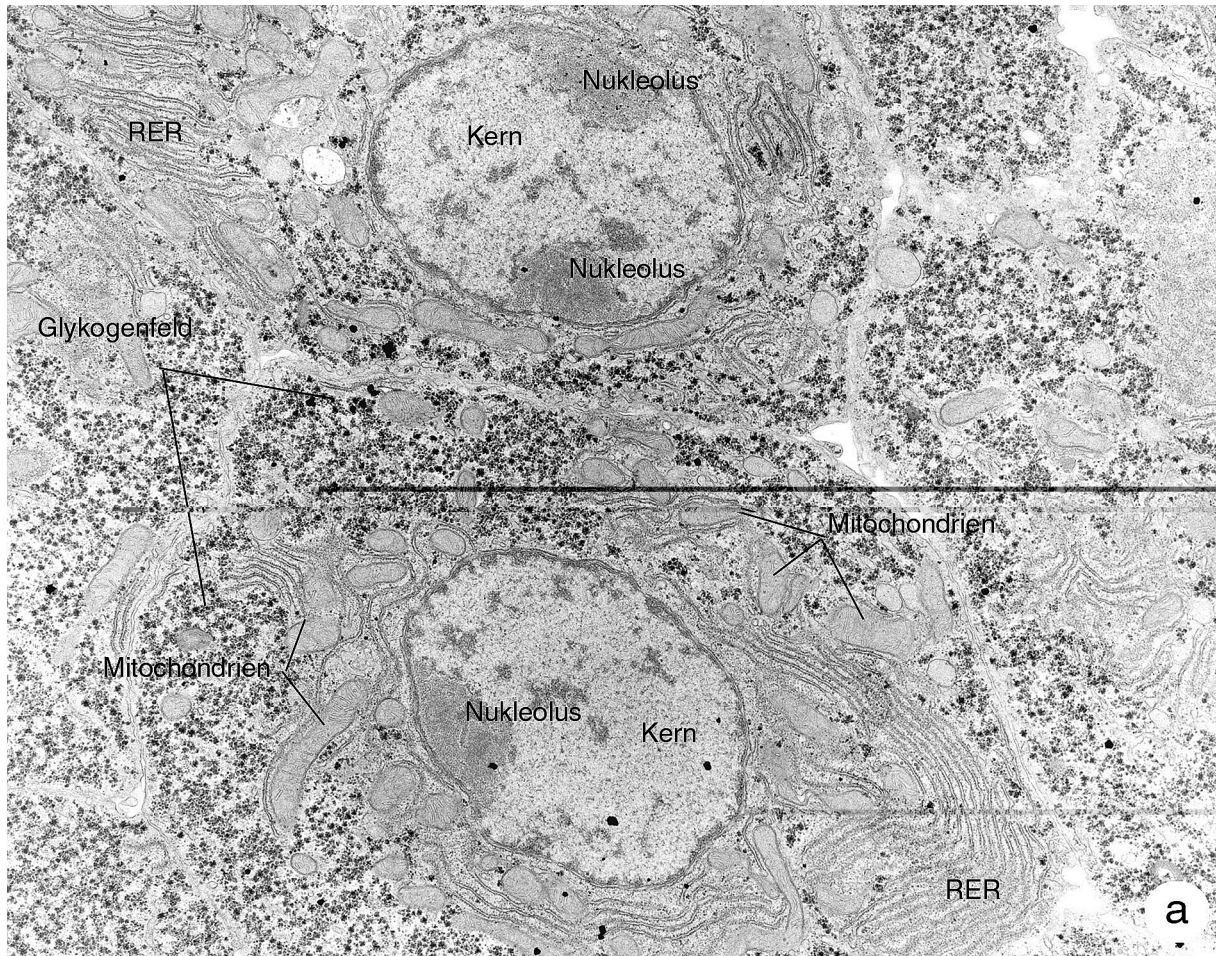
Bildtafel VII, nachfolgende Seite

Bachschmerle 18. Tag. Übersicht Hepatocyte der DMSO-Kontrolle: **a** Intrazelluläre Kompartimentierung, mit ausgeprägten Glykogenspeicher; 14.500 x. **b**: Hepatocyte mit kleinen und zahlenmäßig wenigen Mitochondrien und Lysosomen; 13.100 x. **c**: Kontrolle mit gering ausgebildetem Golgi-Apparat; 23.000 x. **d**: Leberparenchym bisweilen gestreckter Hepatocyten, Interzellulare präperationsbedingt erweitert; 10.600 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



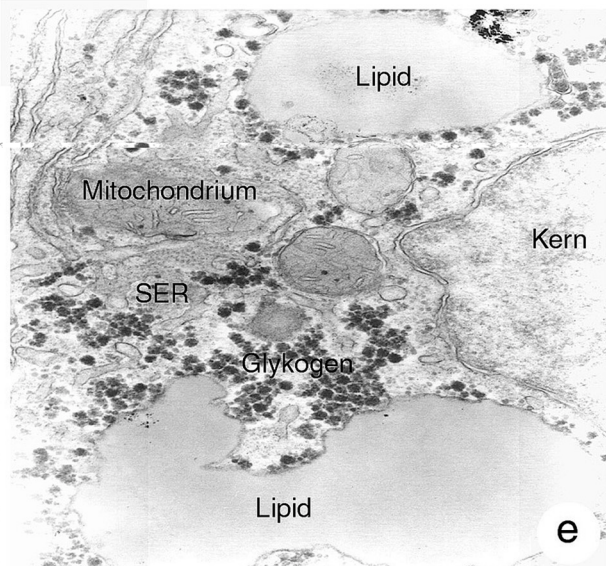
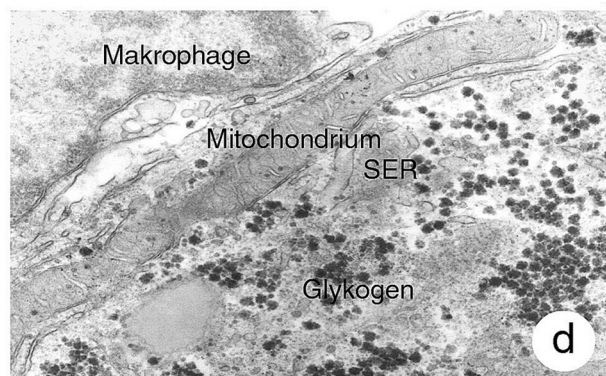
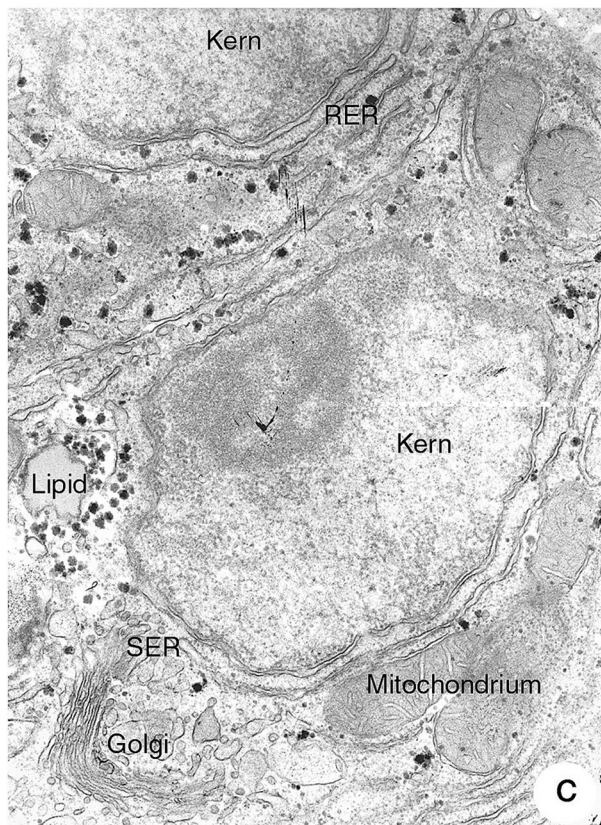
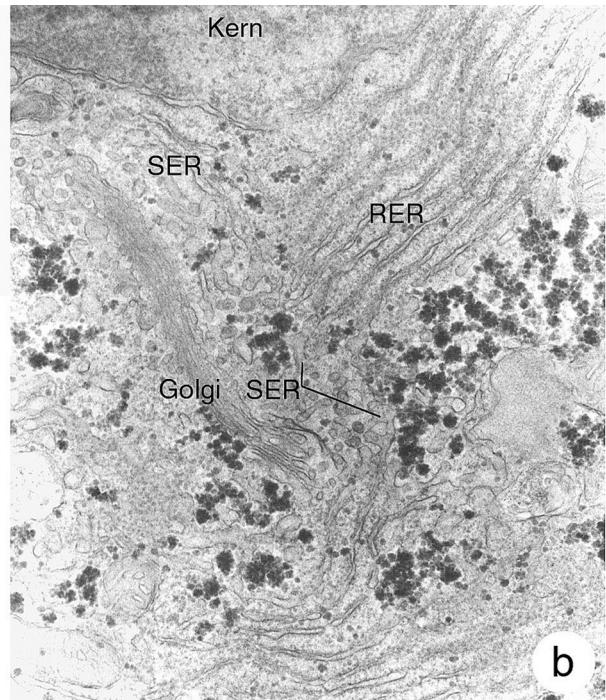
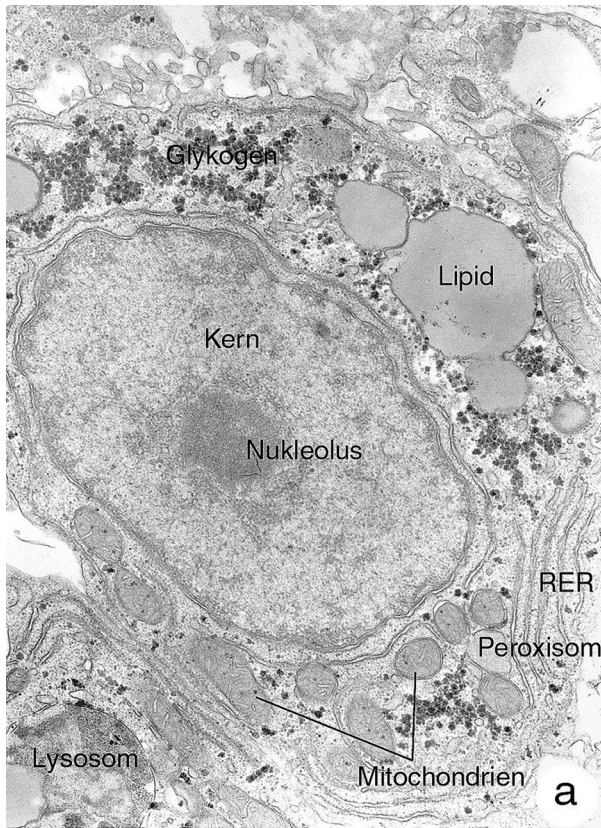
Bildtafel VIII, vorherige Seite

Bachforelle 18. Tag. Leberparenchym nach 18 Tagen Grundbelastung gegenüber dem 50 x-PAH-Cocktail: **a:** Übersicht, deutliche Zunahme in Größe und Anzahl der Mitochondrien, nicht mehr so kompakte Glykogenfelder; 13.700 x. **b:** deutliche Kerndeformation und ER-Vesikulierung; 11.500 x. **c:** Deutliche Heterogenität zwischen den Hepatocyten mit deutlicher Kerndeformation, aber starken Glykogenfeldern; 11.500 x.

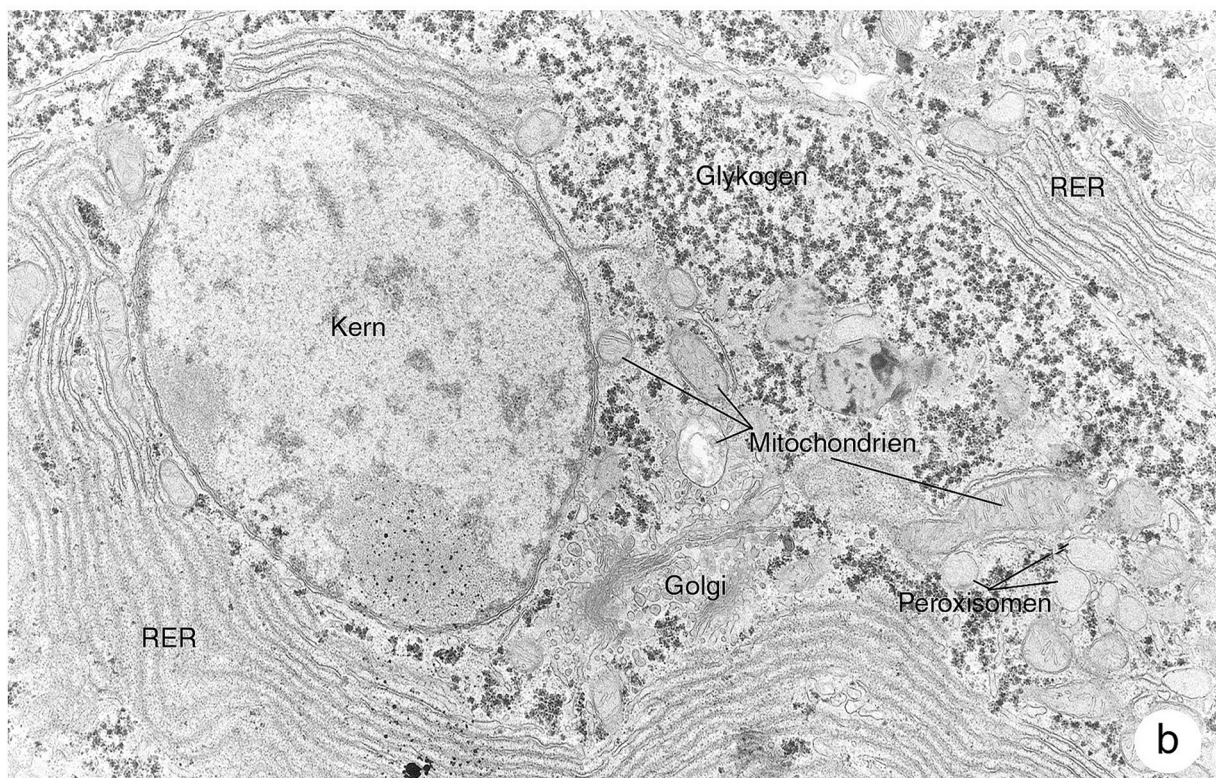
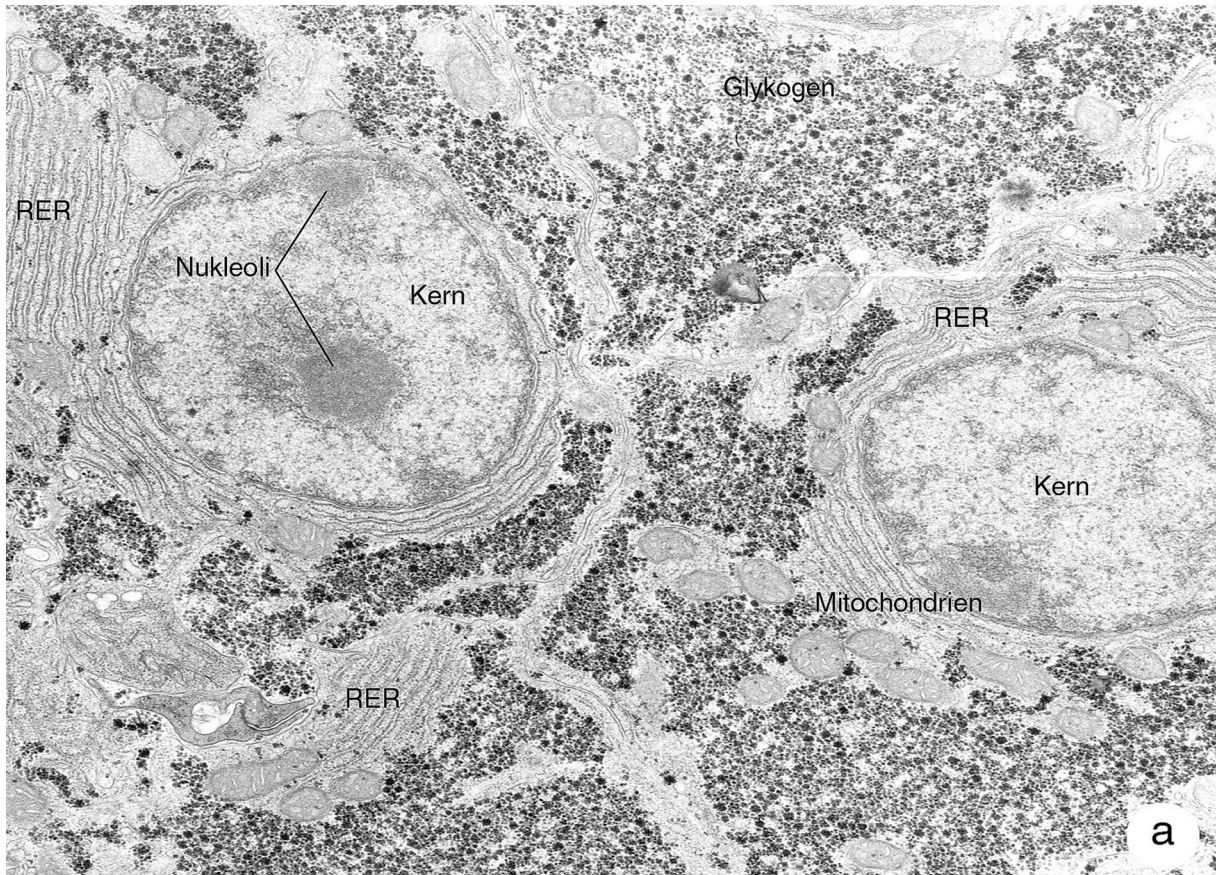
Bildtafel IX, nachfolgende Seite

Bachforelle 18. Tag. Leberparenchym, nach 14 Tagen Grundbelastung mit dem 50 x PAH-Cocktail und einem 48 h Belastungsspeak mit dem 200 x-PAH-Cocktail. **a:** undulierende Kernform, Kern kaum noch von angeordneten ER Zisternen umgeben, zunehmende Lipideinlagerung; 13.500 x. **b:** Sehr aktiver Golgi-Apparat, Induktion von glatten endoplasmatischen Retikulum (SER), 28.700 x. **c:** zunehmende Kerndeformationen und Mitochondrienheterogenität, 11.700 x. **d:** Riesenmitochondrium; 18.400 x. **e:** Zunehmende Lipidakkumulation bei gleichzeitigem Glykogenabbau; 27.900 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



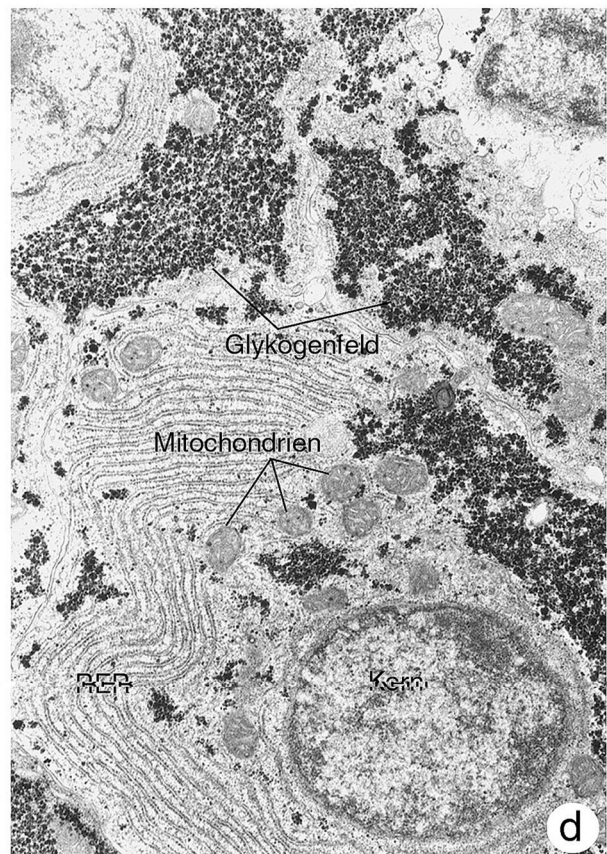
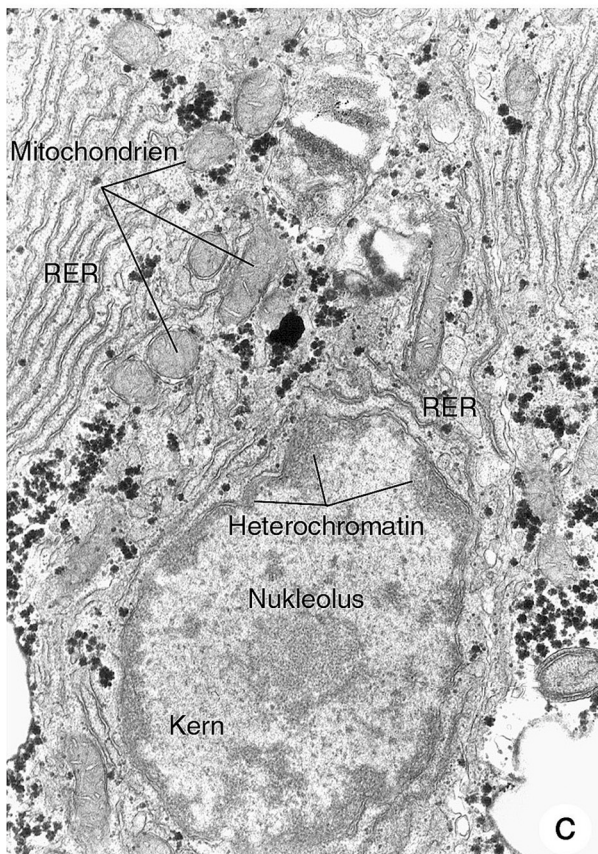
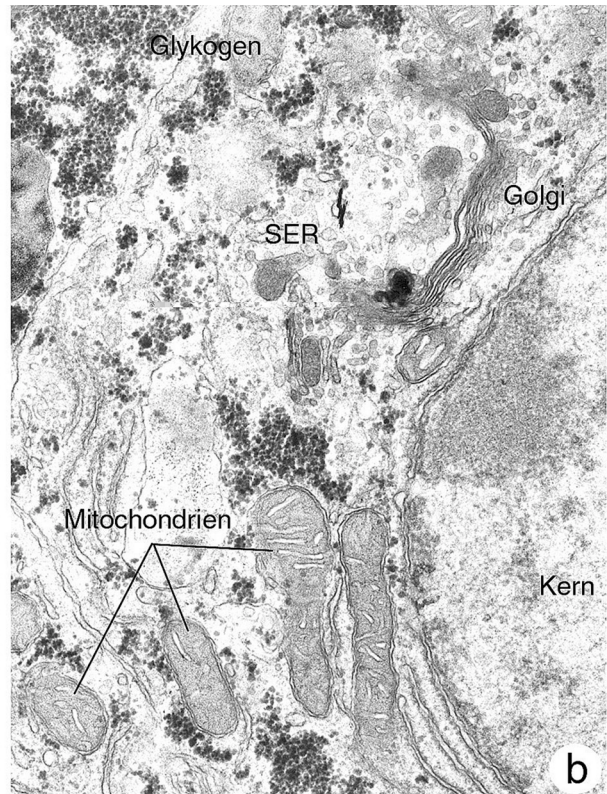
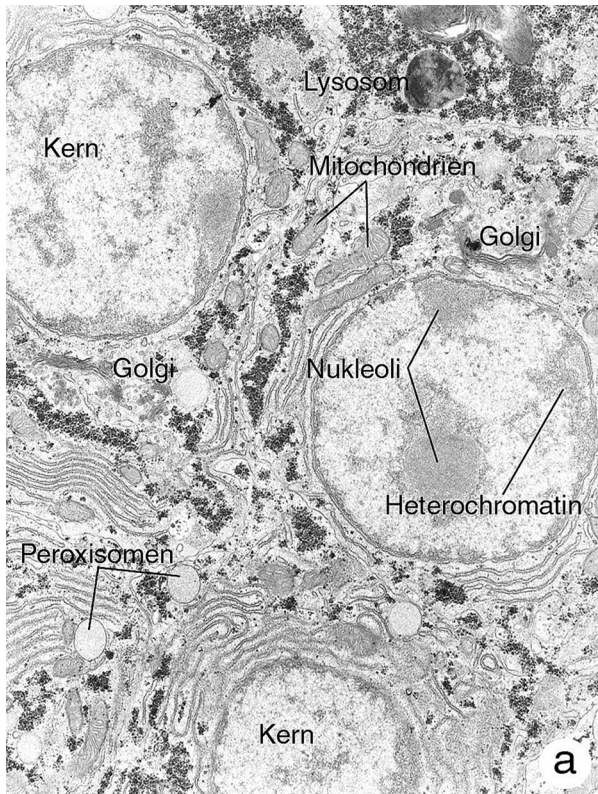
Bildtafel X, vorherige Seite

Bachschmerle 26. Tag. DMSO-Kontrolle **a**: Cytoplasmatische Ordnung und Kompartimentierung mit ausgedehnten Glykogenfeldern, parallelen ER-Zisternen und rundlich-ovalem Zellkern.; 12.400 x. **b**: 14.100 x.

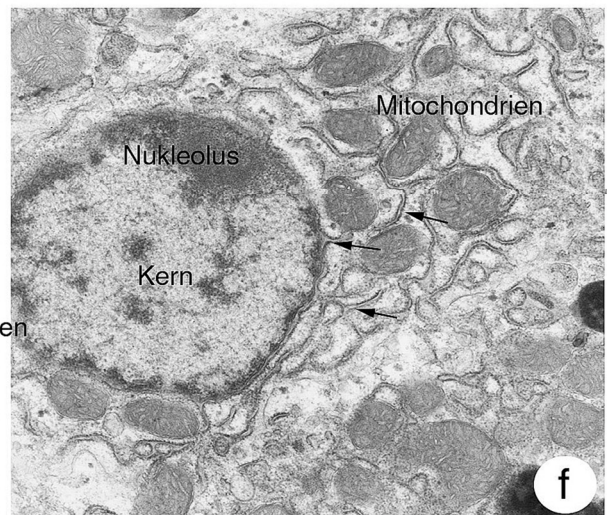
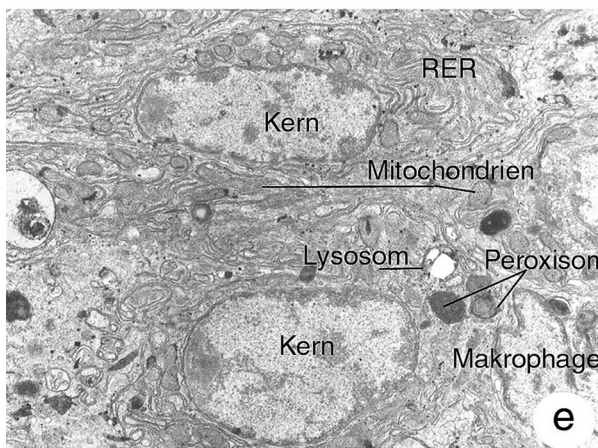
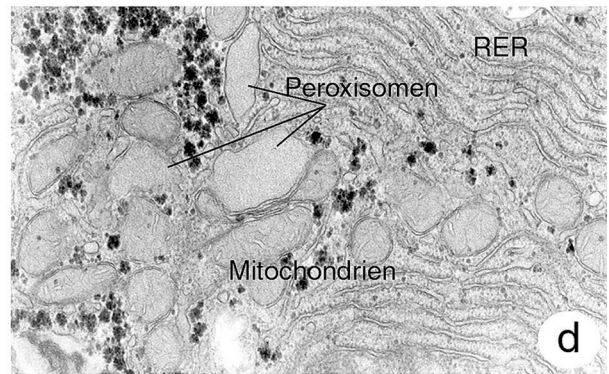
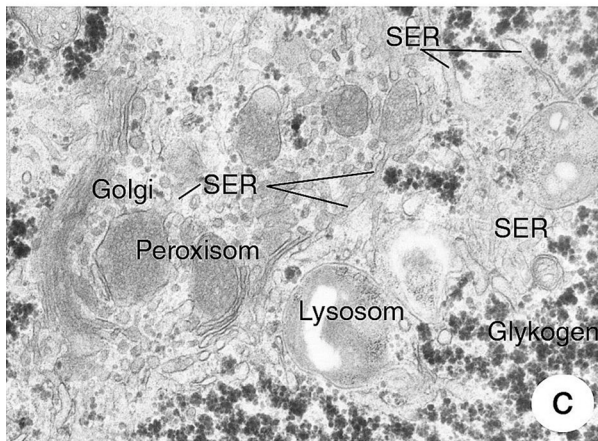
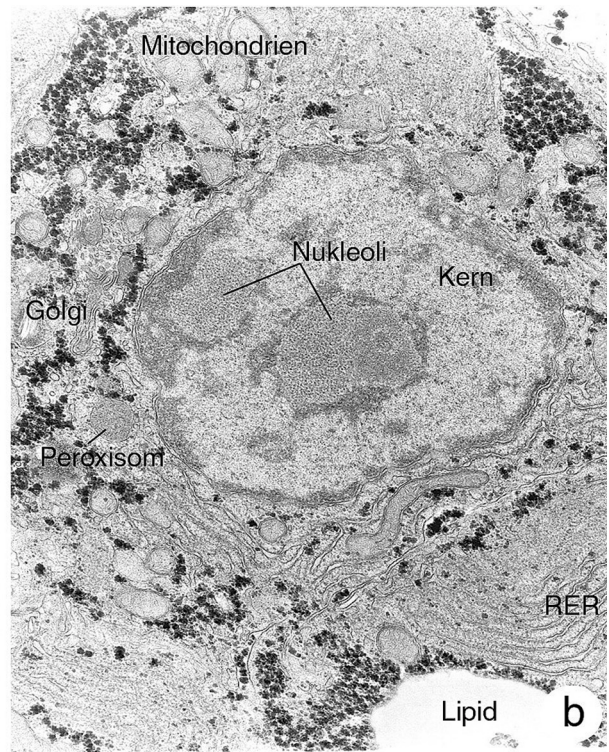
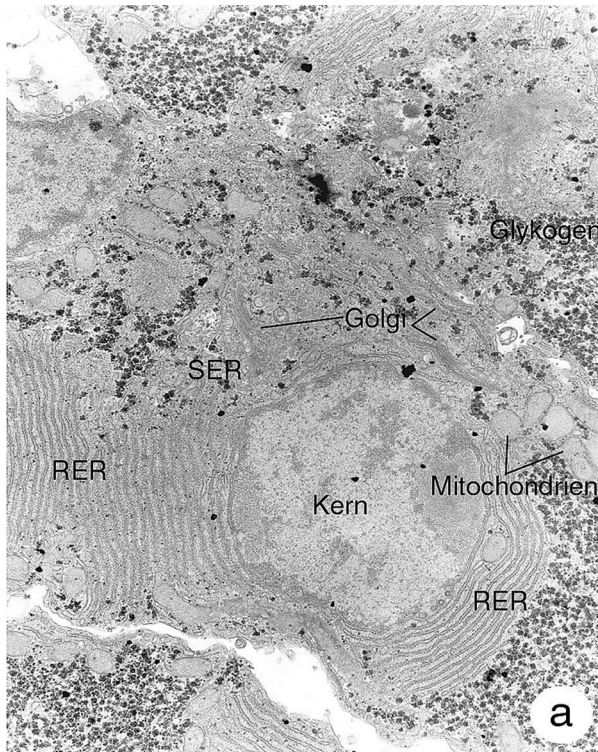
Bildtafel XI, nachfolgende Seite

Bachschmerle 26. Tag. Leberparenchym nach 26. Tagen Grundbelastung mit dem 50-x PAH-Cocktail. **a-d**: Heterogenität setzte sich auch bis zum 26. Tag fort. **a-b** Hepatocyten mit stark aktivem Golgi-Apparat und induziertem SER. **a**: 9.200 x, **b**: 26.200 x. **c**: noch stark deformierter Zellkern bei aufgelöster intrazellulärer Kompartimentierung; 16.700 x. **d**: Als Kontrast: Zelle mit annäherndem Kontrollstatus, und ausgeprägter intrazellulärer Kompartimentierung; 12.400 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



Bildtafel XII , vorherige Seite

Bachschmerle 26. Tag. Leberparenchym nach 26 Tagen Grundbelastung mit dem 50 x PAH-Cocktail und einem 48 h Belastungsspeak mit dem 200 x-PAH-Cocktail zwischen den 14. und 16. Tag Expositionstag. **a:** Übersicht über typische Hepatocyte des 200-fachen Cocktailansatzes. Neben zahlreichen kürzeren RER-Zisternen prägten v. a. Golgi-Felder das Erscheinungsbild; 9.200 x. **b:** Zellkern mit stark kondensiertem Heterochromatin und ausgeprägten RER-Fragmentierungen. **c:** sehr aktives Golgi-Feld und wenige SER-Tubuli; 23.000 x. **d:** Ähnlich den Bachforellen treten Peroxisomen und Mitochondrien zu Clustern zusammen. **e:** Hepatocyten mit völlig aufgelöster intrazellulärer Kompartimentierung; 5.700 x. **f:** Kernmembran bildet Ausläufer, die Mitochondrien umfließen; 14.400 x.

8.2.3 Diskussion

Neben polychlorierten Biphenylen (PCBs), Schwermetallen und chlorierten Kohlenwasserstoffen sind es v. a. polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), die weltweit Anteil an der zunehmenden Gewässerverschmutzung haben. Neben ihrer ausgeprägten Tendenz zur Akkumulation in biologischem Gewebe wirken sie häufig als Lebergifte, Carcinogene, Promotoren oder Genotoxine (Black *et al.*, 1988; Hendricks *et al.*, 1985; Irons and Sawahata, 1985; Köhler, 1990; Nagata *et al.*, 1982). Da zahlreiche PAHs regelmäßig in der Körsch nachzuweisen waren (Honnen *et al.*, 1999b), sollte an den bereits vorgestellten Stoffwechsellenzymen das zeitliche Induktionsverhalten bei einer pulsartigen Belastung nach Vorbelastung untersucht werden.

In den Bachforellen und Bachschmerlen, die dem Cocktail aus Umweltchemikalien der Körsch (bestehend aus 9 polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) und 3 Pestiziden) exponiert worden waren, konnten deutliche cytopathologische Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden. Einige cytologische Endpunkte zeigten dabei 48 h nach dem Belastungsspeak mit dem 200-fachen Körschcocktail eine Dosis-Wirkungsbeziehung, die jedoch im weiteren Verlauf der Exposition bis zum 26. Tag gegenüber der Grundbelastung keinen weiteren Bestand hatte.

Beide Fischarten zeigten sehr ähnliche Effekte nach der Schadstoffbelastung. Während bei den Bachschmerlen jedoch eine negative Korrelation zwischen erhöhter Belastung und intrazellulären Gliederung bestand, gab es bei den Bachforellen eine ausgeprägte Parenchymheterogenität. Neben Zellen mit aufgehobener intrazellulärer Gliederung traten immer wieder Zellen mit annähernd Kontrollstatus auf.

Im ultrastrukturellen Bild fiel zunächst bei den Bachschmerlen des Kontrollansatzes die wenig ausgeprägten Energiespeicher (Glykogen bzw. Lipid) auf. Während im 50-fachen Ansatz Gly-

kogen den überwiegenden Energiespeicher stellte, nahm die Menge an eingelagertem Lipid im 200-fachen Ansatz zu. Ähnliches ließ sich auch bei den Bachforellen beobachten: Auch hier wurde mit zunehmender Schadstoffkonzentration Glykogen ab- und Lipid aufgebaut. Die Anreicherung von Lipid in Leberzellen nach Schadstoffbelastung konnte in zahlreichen Versuchen mit verschiedenen Testsystemen beobachtet werden. In Fischen führten die Monosubstanzen Lindan (Braunbeck *et al.*, 1990b), Linuron, Ochratoxin (Braunbeck, 1994), Dinitro-*o*-Kresol (Braunbeck and Völkl, 1991) zu einer Zunahme an intrazellulären Lipid. Im Gegensatz zu (Baglio and Farber, 1965), die bei Säugern Lipidtropfen in den Cristae des RER als morphologischen Ausdruck einer Blockade des Triglyceridstoffwechsels betrachten, bzw. auf eine Störung der Proteinsynthese zurückführen (Iglesia *et al.*, 1982; Plaa, 1986), hält (Braunbeck *et al.*, 1990b) zumindest bei der durch Lindan induzierten Lipideinlagerung eine Fehlregulation bei der Synthese von VLDL (very low density lipoproteins) für eher wahrscheinlich als einen Defekt in der eigentlichen Lipidsynthese.

Im Verlauf der weiteren Exposition nahm auch in der DMSO-Kontrolle die Einlagerung von Lipid zu, und der weitere Glykogenabbau wurde wie auch in den Belastungsansätzen eingestellt. Bis auf die Citratsynthase in der Leber der Bachforellen zeigten die in den Energiestoffwechsel involvierten Enzyme der Glykolyse (Phosphofruktokinase), des Citrat- (Succinatdehydrogenase und Citratsynthase), des Protein- (Alaninaminotransferase) und des Fettstoffwechsels (Malatenzym und Glucose-6-P-Dehydrogenase) 48 h nach dem Schadstoffpeak eine deutliche Induktion. Damit korrelieren die ultrastrukturellen Daten mit Befunden der Biochemie, die auf einen erhöhten Energiestoffwechsel im Zuge eines erhöhten Energiebedarfs hindeuten. Auch in parallel durchgeführten *In vitro*-Untersuchungen mit Hepatocyten der Regenbogenforelle konnte durch eine gesteigerte Lactatdehydrogenaseaktivität auf eine zunehmende Glykolyseaktivität infolge der Schadstoffbelastung geschlossen werden (Strmac, 2000). Einhergehend mit der Aktivitätsabnahme der Enzyme zwischen dem 18. und 26. Expositionstag verringerten sich auch die Unterschiede in den Energiespeichern von Lipid und Glykogen zwischen den Kontrolltieren und den Expositionsansätzen. Beispielsweise kann der ultrastrukturell beobachtete reduzierte zelluläre Lipidgehalt am 26. Tag des 200-fachen Cocktailansatzes durch die verminderten Aktivitäten der Glucose-6-P-Dehydrogenase und des Malatenzyms relativ zur Kontrolle bestätigt werden.

Die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme am 18. Tag können mit der Zunahme an Mitochondrien korreliert werden, die auf einen erhöhten zellulären Energiebedarf in Form von ATP, durch das Atmungskettenenzym Cytochrom c Oxidase indiziert, hindeutet. In diesem Zusammenhang kann auch die zunehmende Heterogenität in der Mitochondrienform gesehen werden, die nach (Zahn and Braunbeck, 1995) zu größeren Austauschflächen zwischen den Kompartimenten führt.

Übereinstimmungen ergaben sich auch zwischen Biochemie und Ultrastruktur für die Grundbelastung der Bachforellen. So können die Aktivitäten auf Kontrollniveau mit einer unveränderten bis leicht verminderten Glykolyse- und Lipogeneseaktivität erklärt werden, die sich auf zellulärer Ebene in einem annähernd konstanten Lipid- und Glykogengehalt zur DMSO-Kontrolle äußerte.

Die Aktivitäten der peroxisomalen Katalase und der lysosomalen Sauren Phosphatase können bei beiden Fischarten sowohl in der 50-fachen als auch in der 200-fachen Konzentration 2 Tagen nach dem Expositionsspeak mit der ultrastrukturell beobachteten Proliferation von Lysosomen und Peroxisomen korreliert werden. Damit stimmen die Befunde mit Ergebnissen aus *In vitro*-Untersuchungen überein, bei denen (Strmac, 2000) in isolierten Hepatocyten mit der 50-fachen Cocktailkonzentration nach 1 und 2 Tagen ebenfalls eine deutliche Induktion bei Katalase und Sauren Phosphatase feststellen konnte.

Die Proliferation von lysosomalen Elementen ist für verschiedene Schadstoffe beschrieben worden. Sie könnte in einer schadstoffinduzierten Zunahme im Umsatz hepatozellulärer Komponenten zu suchen sein und wurde wiederholt auf Fremdstoff induzierter Stress zurückgeführt (Braunbeck *et al.*, 1990b; Hawkes, 1980; Lipsky *et al.*, 1978; Rojik *et al.*, 1983). Die Bildung von pathologisch vergrößerten Lysosomen, wie sie vereinzelt bei den Bachschmerlen auftraten, führt (Moore, 1985) auf Destabilisierungen in der Lysosomenmembran zurück, die schließlich Fusionen mit anderen Organellen begünstigen.

Die Induktion von Biotransformationsenzymen (Ethoxyresorufin-*o*-Deethylase (EROD) und Glutathione-*S*-Transferase), die Behrens und Segner (unveröffentlichte Daten) in den Bachforellen nach der Pulsbelastung nachweisen konnten, sowie der Anstieg der Carboxylesterase in beiden Fischarten könnten aus der Zunahme, Dilatationen und Vesikulierung von glattem bzw. rauhem endoplasmatischem Reticulum (SER bzw. RER) erklärt werden (Nott and Moore, 1987; Robbi and Beaufay, 1983). Neben der Dilatation von RER-Zisternen stellt die Zunahme von SER-Tubuli vermutlich den morphologischen Ausdruck von verstärkt einsetzenden Detoxifikationsprozessen dar (Braunbeck, 1989; Braunbeck, 1995; Hinton *et al.*, 1978; Lester *et al.*, 1993). In diesem Zusammenhang könnte auch die gesteigerte G6PD-Aktivität des Pentose-Phosphatwegs gesehen werden, die neben der Bereitstellung von NADPH für die Lipidsynthese u.a. auch andere Stoffwechselwege mit NADPH versorgen kann, wie z.B. die Mischfunktionellen Oxygenasen des Cytochrom P450-Systems, welches an der Entgiftung von PCBs und PAHs maßgeblichen Anteil hat (DiGiulio *et al.*, 1993; Eggens *et al.*, 1995; Klauning *et al.*, 1980; Livingstone *et al.*, 1993; Oikari *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1994; Schoor *et al.*, 1979; Segner and Braunbeck, 1998).

Unbeeinflusst von den Schadstoffen zeigten sich die Enzyme Acetylcholinesterase und Cytochrom C Oxidase im Gehirn der Versuchstiere. Dieser Befund ist nicht weiter verwunderlich, da die Inaktivierung der ACHE im Nervengewebe v. a. durch Carbamate und Phosphorsäureester (Abiola *et al.*, 1991; Aldridge, 1953; Fernandez-Vega *et al.*, 1999), aber auch einigen Schwermetallverbindungen (vgl. Diskussion 3.3, (Christensen *et al.*, 1982)) hervorgerufen wird, die in dem Schadstoffcocktail nicht enthalten waren.

Auch wenn die ultrastrukturellen Veränderungen mit biochemischen Befunden korreliert werden können, scheinen sie dennoch eher unspezifischer und adaptiver Art zu sein. Untersuchungen von (Schoor and Couch, 1979) ergaben nach Belastung von Meeräschen (*Mugil cephalus*) mit dem PAH Cholanthren eine Verringerung von Glykogenspeichern, Proliferationen von RER und SER sowie eine Zunahme an Fragmentierungen, Dilatationen und ER-

Vesikeln. Derartige ER-Veränderungen konnten bei Fischen (Braunbeck, 1994; Braunbeck *et al.*, 1990b; Braunbeck and Völkl, 1991; Gingerich, 1982a; Köhler, 1990; Schnurstein, 2000) sowie Zellkulturen (Strmac, 2000; Zahn *et al.*, 1995) auch durch andere Schadstoffe bzw. Schadstoffgemische beobachtet werden. Beobachtungen, die auch in den eigenen Untersuchungen gemacht werden konnten. Des Weiteren kam es im Kern zu verstärktem Auftreten von Heterochromatin bei gleichzeitiger Verlagerung an die Kernperipherie. Derartige Kernveränderungen, die als Frühstadien von Nekrosen angesehen werden (Schoor and Couch, 1979), zeigten auch Bachforelle und Bachschmerle. Eine zunehmende Kondensation von Heterochromatin mit fortschreitender Marginalisierung sowie dem Auftreten einer undulierenden Kernmembran konnte *In vivo* (Gerundo *et al.*, 1991) und *In vitro* (Zahn and Braunbeck, 1995) auch durch Malachitgrün hervorgerufen werden. Die Kondensation und Marginalisierung von Heterochromatin führen Zahn and Braunbeck, 1995 auf eine fortschreitende Inaktivierung des Kerns zurück, dagegen wird die undulierende Kernmembran als Versuch gewertet, die Fläche zwischen Karyoplasma und Cytoplasma zu vergrößern, um den intrazellulären Austausch beider Zellkompartimente zu fördern. Das Auftreten von mehreren Nukleoli, wie sie bei den Bachschmerlen zu beobachten waren, ist nach Braunbeck, 1994 als weitere unspezifische Reaktion auf Schadstoffbelastung im Zellkern anzusehen.

Schlussfolgerungen:

- Die untersuchten Stoffwechsellzyme stellten selbst unter Vorbelastung, wie sie im Freiland anzutreffen ist, bei einer zusätzlichen Belastungsspitze schnell integrierende Marker dar, die mit cytologischen Veränderungen einhergehen.
- Ultrastrukturelle Veränderungen in den Leberzellen waren nach 18. Tagen Grundbelastung klar zu erkennen. Möglicherweise wurden bereits induzierte Enzymwerte innerhalb der 14-tägigen Vorlaufzeit mit der 50-fachen Cocktailkonzentration durch Adaptionsprozesse überlagert.
- Sowohl biochemische als auch ultrastrukturelle Veränderungen sind eher als unspezifische Reaktionen anzusehen, die vermutlich im Sinne von Adaptionsprozessen zu interpretieren sind.
- Geht man von etwa gleich akkumulierten Schadstoffmengen in den Bachforellen wie beim 50-fachen Ethanol-Cocktail (vgl. Kap. 5.3) aus, so untermauerte auch dieser Versuchsansatz die bereits geäußerte Hypothese, dass zumindest bis zu einem möglichen Schwellenwert nicht die Menge an akkumulierten Schadstoffen für die Auslösung von Enzymreaktionen verantwortlich ist. Vielmehr bedarf es der Stimulation durch einen zusätzlichen Peak, um bei chronischer Belastung in den hier verwendeten Einzelstoffkonzentrationen von max. 4 µg/L eine (deutliche) Enzymantwort zu induzieren.
- Geringfügige Abweichungen in der Reaktion auf die Cocktailbelastungen zwischen Bachforelle und Bachschmerle könnten auf artspezifische Unterschiede zurückzuführen sein.

9. Embryotoxizität

Untersuchungen zur teratogenen Wirkung des PAH-Schadstoffcocktail auf die Larvalentwicklung und Jungstadien des Zebraärblings (*Danio rerio*)

Zusammenfassung: Zebraärblinge (*Danio rerio*) wurden in Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Tests sowie darüber hinaus bis zum 12. bzw. 14. Entwicklungstag in zwei verschiedenen Testansätzen unterschiedlichen PAH-Cocktailkonzentrationen der 0,1-fachen bis 200-fachen durchschnittlichen Konzentrationen des Körschwassers, exponiert. Insgesamt blieb die Zahl der in Mitleidenschaft gezogenen Tiere zu gering um einen LC₅₀-Wert bestimmen zu können. Kontrolltiere sowie Tiere der 0,1 bis 1-fachen Cocktailkonzentration blieben ohne Befund. Erst ab der gegenüber dem Freiland 10-fach erhöhten Konzentration konnten bereits nach 48 h bei einigen Embryonen erste Anzeichen von Perikardialödemen beobachtet werden. Derartige Ödeme führten zu schweren Beeinträchtigungen des Blutkreislaufsystems wie Missbildungen des Herzens sowie einem nicht geschlossenen Blutkreislaufsystem und erwiesen sich in 100 % der Fälle im Verlauf der weiteren Larvalentwicklung als letal. Ab der 10-fachen Cocktailkonzentration konnte eine deutliche Zunahme an Wirbelsäulenverkrümmungen beobachtet werden, die den Tod der Fischlarven bis zum 10 Tag zur Folge hatten.

9.1 Einführung

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte die teratogene Wirkung des Schadstoffcocktails, der bereits in den *In vivo*-Versuchen mit Bachforelle und Bachschmerle geprüft wurde (vgl. Kap. 8.0), in Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Tests mit dem Zebraärbling getestet werden. Hintergrund dieser Studie war der Versuch, die in Kapitel 8.1 und 8.2 aufgezeigten Effekte der biochemischen Veränderungen der Stoffwechselenzyme sowie der ultrastrukturellen Befunden mit anderen biologischen Endpunkten zu korrelieren. In zwei verschiedenen Testansätzen wurden Parameter (vgl. Tab. 2.13.1; Kap. 2.13) des klassischen Embryotoxizitätstest und des Early Life Stage-Tests über die Dauer von 96 h erfasst und die weitere Entwicklung bis zum 14. Tag verfolgt. Im ersten Testansatz wurden Eier einzeln in mit Flachbodengläsern bestückten 24-well-Platten den 0,1-fachen, 1-fachen, 10-fachen 100-fachen und 200-fachen Cocktailkonzentrationen exponiert (vgl. Kap. 2.13) und Endpunkte gemäß Tab. 2.13.1 erfasst. In einem zweiten Ansatz wurden jeweils 100 Eier den 0,1-fachen, 10-fachen und 200-fachen Cocktailkonzentrationen ausgesetzt und die Jungfischentwicklung bis zum 14. Tag auf die Parameter Schlupf, Ödementwicklung Missbildung der Längsachse und Tod verfolgt. Jeder Testansatz erfolgte in 2 Replika.

9.2 Ergebnisse

Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Test in 24-well-Platten und in Glasschalen

Wasser-Kontrolle. Nach der Befruchtung ließen sich bereits nach ca. 30 min. im 4 Zellstadium befruchtete von unbefruchteten Eiern eindeutig unterscheiden. Ab der 4-5 h hatte sich beim befruchteten Ei durch die Zellteilungsaktivität eine milchig-trübe Keimscheibe gebildet

(Farbtafel XIII a, b), die bei unbefruchteten Eiern durchsichtig blieb. Nach 24 h konnten bereits Kopf und Augenanlagen sowie Wirbelsäule, Blutgefäßsystem und Herzschlag beobachtet werden, häufig traten Spontanbewegungen auf (Farbtafel XIII c). Das 48 h-Stadium war durch eine zunehmende Pigmentierung der Epidermis, als auch durch eine Abnahme der Spontanbewegungen gekennzeichnet (Farbtafel XIII g). Der Schlupf der Fischlarven erfolgte bei gegebenen Versuchsbedingungen zwischen 48 h und 72 h, wobei sie zunächst überwiegend am Gefäßgrund in Seitenlage verharrten; erst mit 96 h trat aktives Schwimmen ein.

DMSO-Kontrolle. Bei den in den 24-well-Platten exponierten Tieren der Lösungsmittelkontrolle gab es im Vergleich zur Wasserkontrolle keine Unterschiede in der Embryonalentwicklung. Lediglich beim Schlupfverhalten konnte eine leichte Verzögerung (83 % nach 72 h) beobachtet werden (Abb. 9.2.1). Nach 12 Tagen betrug die Überlebensrate über 93 %, die der Wassertiere 91 % (Abb. 9.2.3). Bei gleichen äußeren Expositionsbedingungen erfolgte der Schlupf im Glasschalenansatz früher als in den 24-well-Platten: Nach 48 h waren bereits knapp 65 % der Tiere geschlüpft (Abb. 9.2.1), in den 24-well-Platten waren es dagegen erst 8 %. 92 % der Jungfische überlebten bis zum 14. Tag (Abb. 9.2.3).

0,1-fachen Cocktail. Die stärkste Cocktailverdünnung führte im Hinblick auf die untersuchten Parameter bei den Embryonal- und Larvalstadien des Zebrafisch im 24-well-Plattenansatz zu keinen Abweichungen gegenüber den Kontrollen. Im Glasschalenansatz lag der Schlupferfolg nach 48 h mit 55 % ca. 10 % unter der DMSO-Exposition (Abb. 9.2.1), jedoch waren auch hier nach 72 h alle Fischlarven geschlüpft. 2 % der Jungfische wiesen leichte Verkrümmungen der Wirbelsäule auf, die Überlebensrate blieb nach 14 Tagen Exposition mit 92 % stabil (Abb. 9.2.3).

1-fache Cocktail. Die der Körsch vergleichbaren Schadstoffkonzentrationen des 1-fachen Cocktails führten bei den Fischlarven bezogen auf die Schlupf- und Überlebensrate (90 %) zu vergleichbaren Werten mit der Wasser-Kontrolle.

10-fache Cocktail. Im 24-well-Plattenansatz konnten für den Parameter Schlupfverhalten der Kontrolle vergleichbare Werte beobachtet werden, jedoch zeigten nach 72 h bereits vereinzelt (3 %) erste Tendenzen zur Ausbildung von Pericardialödemen (Farbtafel 13 h, i; Abb. 9.2.2) sowie nach 96 h die Ausbildung von Wirbelsäulenverkrümmungen bei 5 % der Larven (Farbtafel XIV j, k). Die Überlebensrate betrug nach 12 Tagen ca. 83 %. Auch im Glasschalenansatz nahmen Effekte erstmals zu: Bereits nach 30 h zeigten sich Verzögerungen in der Entwicklung (Farbtafel XV b) und nach 72 h erreichte die Schlupfrate nur noch 80 % (Abb. 9.2.1). Mit 6 bzw. 4 % lag die Zahl der Wirbelsäulenverkrümmungen bzw. die Bildung von Pericardialödemen geringfügig über denen der 24-well-Plattenansätze (Farbtafel XV e, h, i), so dass nach 14 Tagen Belastung die Überlebensrate mit 78 % festgestellt wurde

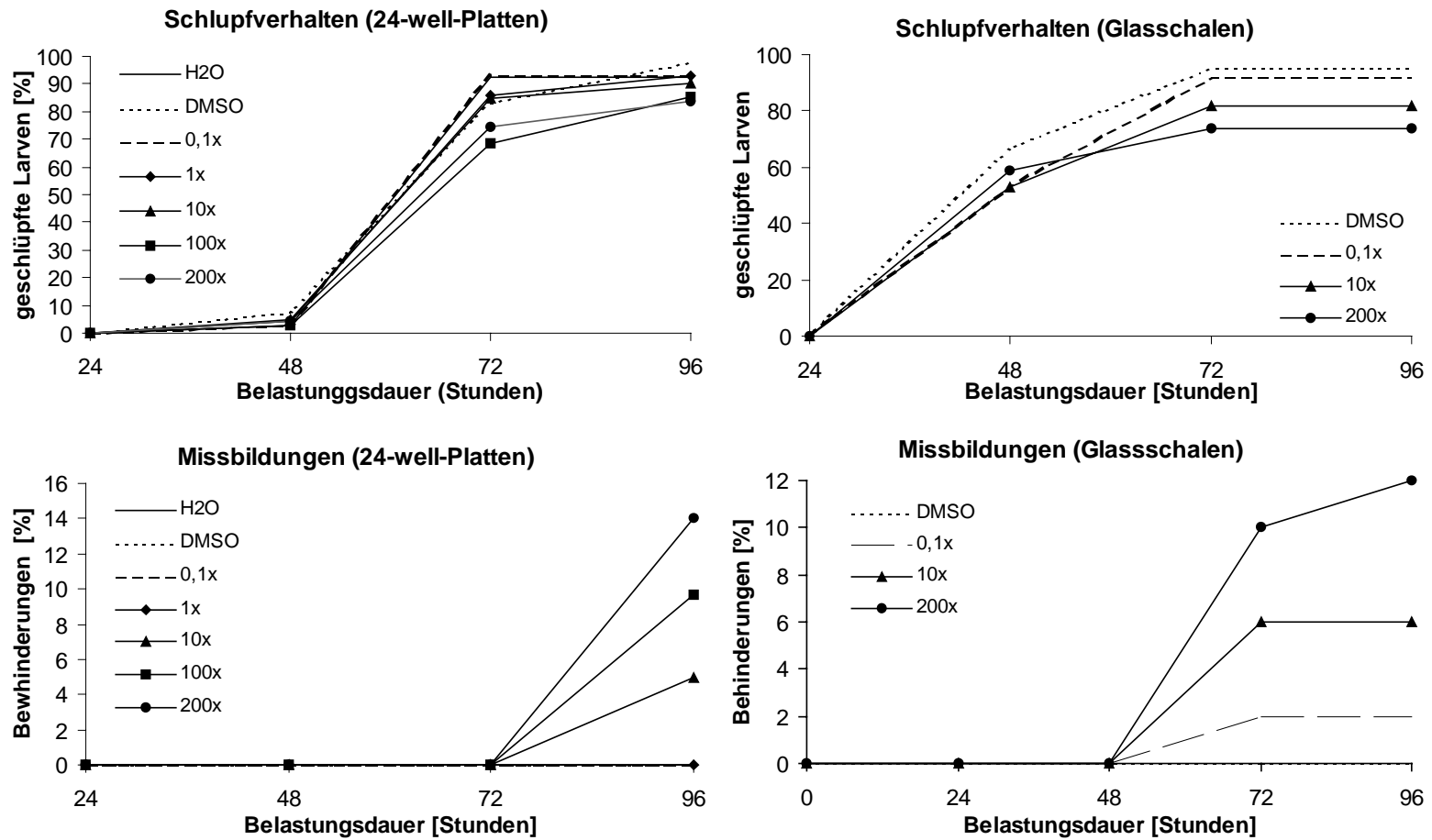


Abb. 9.2.1 Schlupfverhalten und Behinderungen der Larven des Zebrafärblings (*Danio rerio*) nach Belastung gegenüber PAH-Cocktailkonzentrationen der Körsch. Konzentration: 0,1-fach bis 200-fach. Mittelwert aus je 2 Replika. n = 20 in 24-well-Platten bzw. n = 100 in Glasschalen.

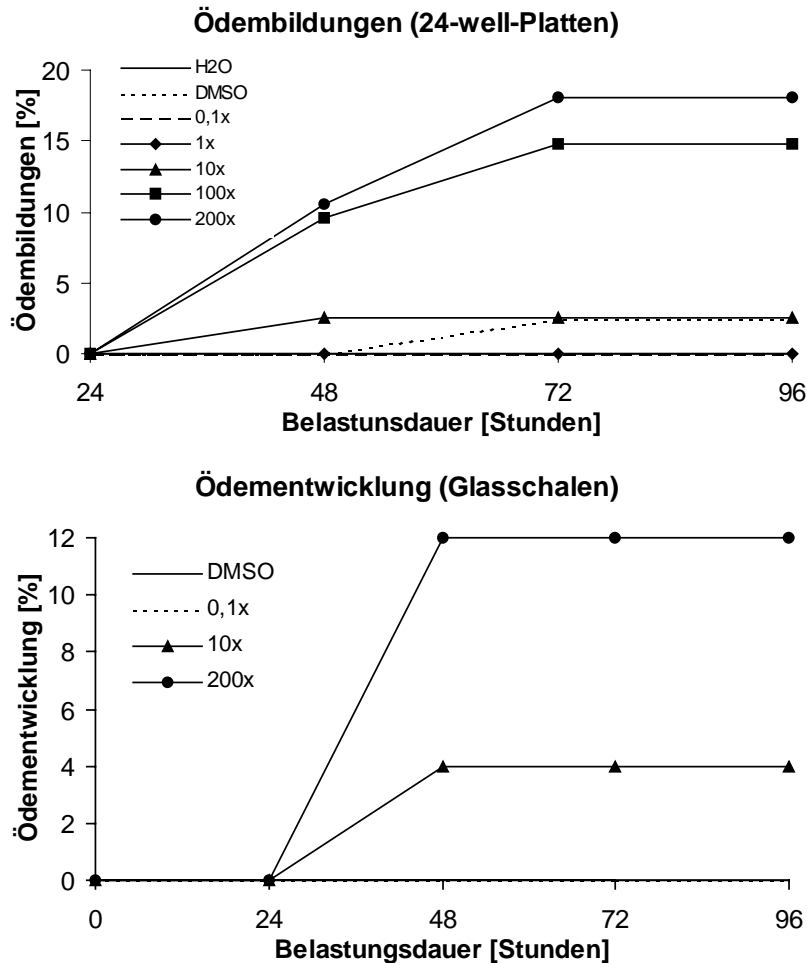


Abb. 9.2.2 Ödembildungen in Larven des Zebrafischblings (*Danio rerio*) nach Belastung gegenüber PAH-Cocktailkonzentrationen der Körsch. Konzentration: 0,1-fach bis 200-fach. Mittelwert aus je 2 Replika. 24-well-Platten n = 20, Glasschalen n = 100

100-fache Cocktail. Mit 68 % verzögerte sich die Schlupfrate in den 24-well-Plattenansätzen nach 72 h gegenüber den Kontrollwerten um etwa 20 %, nach 96 h waren 85 % der Larven geschlüpft. Eine weitere Zunahme konnte bei den Wirbelsäulendeformationen auf 10 % festgestellt werden. Gleichzeitig stieg die Ausbildung von Ödemen auf 15 % (Abb. 9.2.2, Farbtabelle XIV k) während die Überlebensrate auf 78 % sank (Abb. 9.2.3).

200-fache Cocktail. Die höchsten Cocktailkonzentration führte zu einer weiteren Verstärkung der Effekte: Bei einigen Embryonen konnten bereits nach 24 h Verzögerungen in der Augen- und Ohrentwicklung sowie der Somitenanlagen (Farbtabelle XIII e, f) festgestellt werden; Retardierungen in der Entwicklung setzten sich auch nach 48 h fort (Farbtabelle XIII j). In den 24-well-Platten zeigten 14 % der Larven Deformationen der Wirbelsäule sowie 18 % eine Induktion von Perikardialödemen. Nach 12 Tagen betrug die Überlebensrate 74 %.

In den Glasschalenansätzen war mit 74 % die Schlupfrate vergleichsweise gering; v. a. Tiere, die die Bildung von Ödemen zeigten (12 %) (Abb. 9.2.2), verblieben häufig bis zum Absterben im Ei. Die Ausbildung von Deformationen der Wirbelsäule konnte bei 12 % der Larven verfolgt werden (Farbtabelle XV c, d, f, g), die bereits in Kombination mit Ödemen nach 4 - 5

8. Ergebnisse und Diskussion

Tagen zum Tod der Larven führten. 69 % der Tiere überlebten bis zum 14. Expositionstag (Abb. 9.2.3).

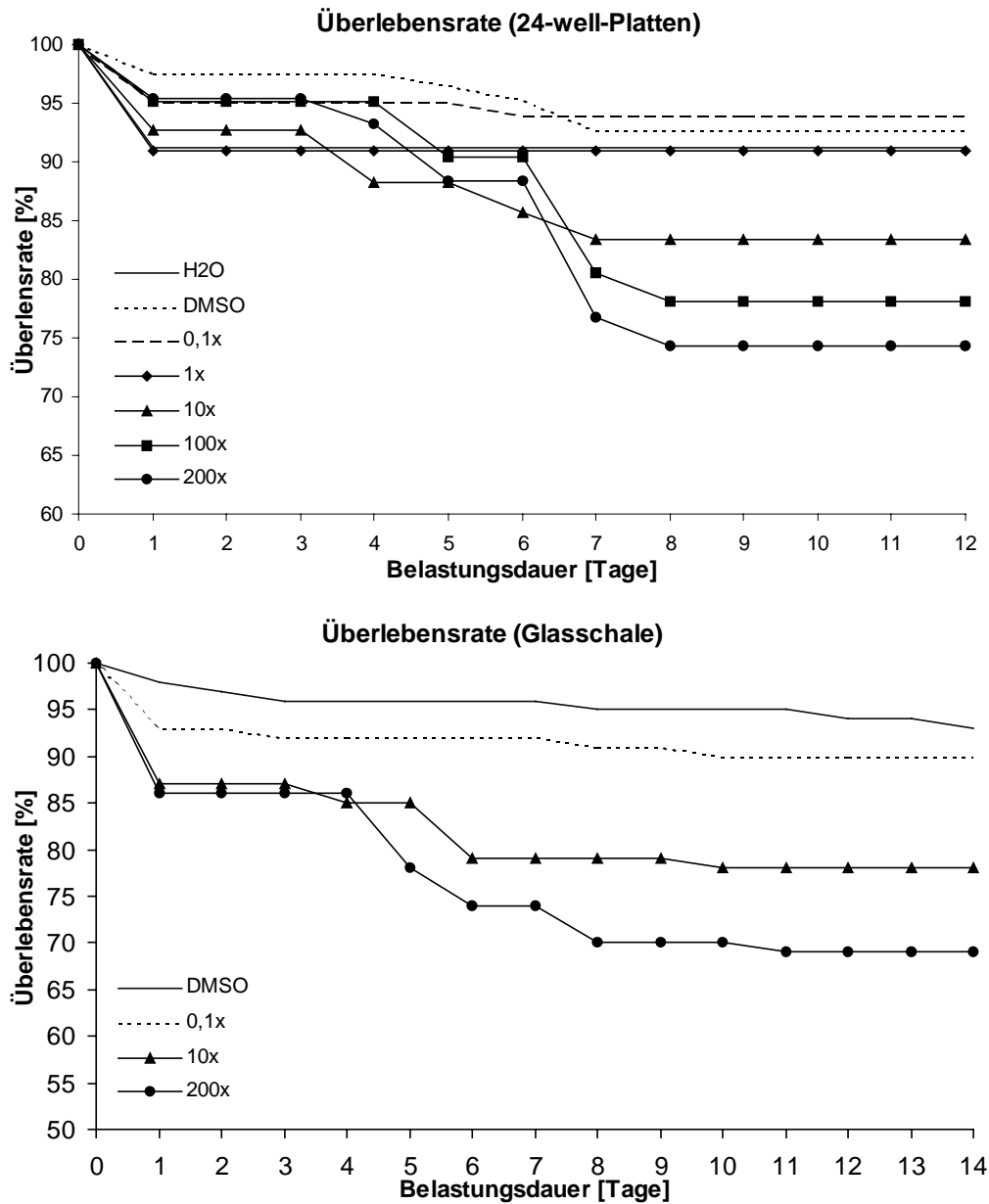
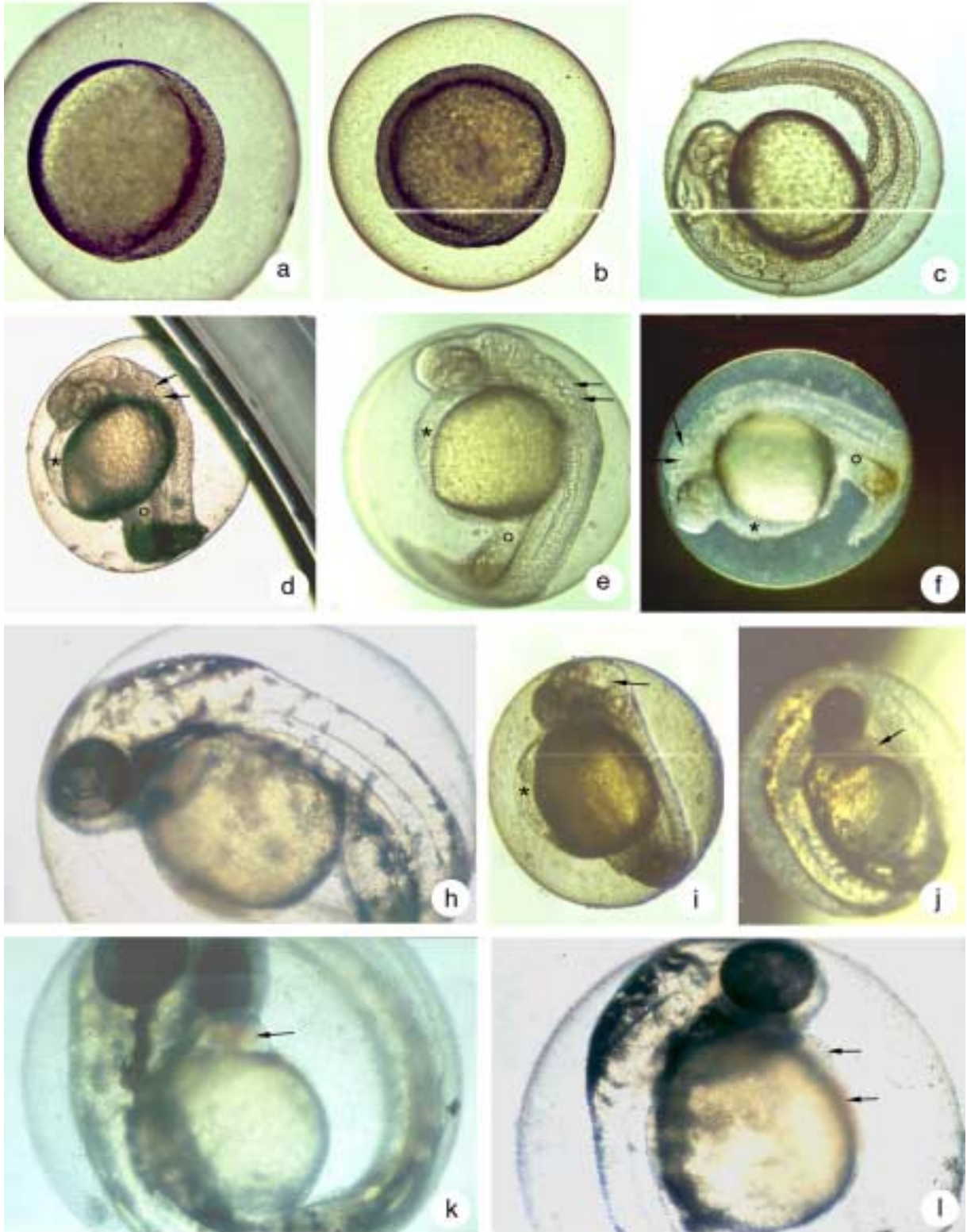


Abb. 9.2.3 Überlebensraten der Larven des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach Belastung gegenüber PAH-Cocktailkonzentrationen der Körsch. Konzentration: 0,1-fach bis 200-fach. Mittelwert aus je 2 Replika. n = 20 in 24-well-Platten bzw. n = 100 in Glasschalen.

8. Ergebnisse und Diskussion



Bildtafel XIII, vorherige Seite

Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Untersuchungen mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) des 24-well-Plattenansatzes. **a**: Bereits wenige Stunden nach der Befruchtung ist die Ausbildung der Keimscheibe sichtbar, 27 x. **b**: Befruchtetes Ei nach etwa 6 h, 33 x. **c**: 24 h alter Embryo mit deutlichen Spontanbewegungen und noch ausstehender Pigmentierung, 27 x. **d** bis **f**: Embryonen der Cocktailkonzentrationen 100-fach (**d**, 21 x) u. 200-fach (**e** und **f**, 32 x bzw. 27 x) zeigen bereits nach 24 h deutliche Retardierungen in der Entwicklung des Gehirns sowie der Augen- und Ohranlagen (Pfeile). Im Bereich des Dottersacks kommt es bereits zu Vorstufen von Ödemen (Sterne). Der Schwanzbereich ist noch unvollständig abgelöst. **h**: 48 h alter Kontrollembryo mit deutlicher Pigmentierung, 43 x; **i** - **l**: 48 h alte Embryonen der 1-fachen (**l**, 43 x), 10-fachen (**k**, 43 x), 100-fachen (**j**, 21 x) und 200-fachen (**i**, 21 x) und PAH-Cocktailexposition. Ablösungen am Dottersack im Herzbereich haben sich verstärkt (Pfeile), es kommt zur Ansammlung von Erythrocyten, erste Anzeichen eines gestörten Blutkreislaufs. Vergrößerungen:

Bildtafel XIV, nachfolgende Seite

Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Untersuchungen mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) des 24-well-Platten-Ansatzes. **a**: DMSO-Kontrolle nach 72 h, 16 x. **b** u. **c**: Fischlarven mit stark verkrümmter Wirbelsäule nach 72 h Exposition gegenüber der 10-fachen durchschnittlichen Körsch-PAH-Belastung, je 16 x. **d**: Stark in der Entwicklung zurückgebliebene Fischlarve, bei stark entwickelten Pericardialödemen (Pfeile) nach 72 h Exposition gegenüber dem 200-fachen PAH-Cocktail, 23 x. **e**: ähnlich **d**, bei zusätzlicher unvollständiger Schwanzablösung. Exposition: 72 h gegenüber 100-fachen PAH-Cocktail, 23 x. **f**: Fischlarve nach 72h noch nicht geschlüpft; Exposition gegenüber 200-fachen Cocktail, 28 x. **g**: DMSO-Kontrolle nach 96 h, 31 x. **h**: Fischlarve nach Exposition gegenüber dem 200-fachen PAH-Cocktail mit stark entwickelten Perikardialödemen und Verkrümmung der Schwanzwirbelsäule, 16 x. **i** u. **j**: Verkrümmung der Wirbelsäule (Pfeile) nach Belastung 96 h mit der 10-fachen PAH-Cocktailkonzentration, 7x bzw. 43 x. **k** u. **l**: Fischlarven nach 96 h mit ähnlicher Symptomatik nach Belastung gegenüber der 100-fachen (**k**) und 200-fachen (**l**) PAH-Cocktailkonzentration. Bei retardierter Entwicklung kommt es zu einer stark verkrümmten Wirbelsäule, die Kopf-form ist wenig ausdifferenziert. Perikardialödem (Stern) behindern die Blutzirkulation, je 31 x.

8. Ergebnisse und Diskussion



8. Ergebnisse und Diskussion



Bildtafel 15, vorherige Seite

Embryotoxizitäts- und Early Life Stage-Untersuchungen mit dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) des Glasschalenansatzes. **a**: Kontrollembryonen nach 30 h., 10 x; **b**: Bereits nach 30 h in der Entwicklung retardierter Embryo nach Belastung gegenüber dem 10-fachen PAH-Cocktail. Augen u. Somitenanlage sind deutlich zurückgeblieben., 16 x ; **c** und **d**: Fischlarve nach 72 h nach Belastung mit dem 200-fachen PAH-Cocktail. Ähnlich dem 24-well-Ansatz treten Perikardialödeme (Pfeil) und Verkrümmungen der Schwanzwirbelsäule auf. 16 x bzw. 10 x **e**: Fischlarve der 10-fachen PAH-Cocktailkonzentration nach 72 h. Neben normalen Körperfunktionen kommt es zu starken Verkrümmungen im Wirbelsäulenbereich, 23 x. **f** und **g**: Fischlarven der 200-fachen PAH-Cocktailkonzentration nach 72 h. Neben den Verkrümmungen der Wirbelsäule sind Ödeme der Herzregion zu erkennen (Pfeile). Bei der Fischlarve unter **f** ist zusätzlich ein wenig differenzierter Flossensaum erkennbar (Stern); je 31 x. **h** und **i**: Ähnlich dem 24-well-Ansatzes treten bereits bei der 10-fachen Cocktailkonzentration Verkrüppelungen im Wirbelbereich auf. Expositionszeit: 96 h; 16 x bzw. 21 x.

9.3 Diskussion

Nachdem der PAH-Cocktail im Pulsversuch (vgl. Kap. 8.1 bzw. 8.2) zu Induktionsantworten auf biochemischer und ultrastruktureller Ebene führte, war es das Ziel der vorliegenden Studie, die Wirkung des PAH-Cocktail auf verschiedene entwicklungsbiologische Endpunkte bei Fischen in Early Life Stage (ELS) - und Embryotoxizitätstests mit dem Zebraquarienfisch zu untersuchen.

Für die erhobenen Parameter Schlupfverhalten, Missbildungen, Ödemausbildung und Überlebensrate konnten in experimentellen Ansätzen sowohl in den 24-well-Platten als auch in den Glasschalen Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden, wobei eine Differenzierung zwischen der 100-fachen und die 200-fachen Cocktailkonzentration auf Basis vergleichbarer Effekte kaum mehr gegeben war. LC_{50} -Werte waren innerhalb der eingesetzten Konzentrationen nicht zu ermitteln.

Da sich die Embryonal- und Larvalentwicklung von Fischen in Life Cycle-Tests (der Belastung von juvenilen Tieren bis zur F1 oder F2-Generation) als sensitives Instrument zur Erfassung toxischer Effekte erwiesen hat, ist sie mittlerweile ein wichtiger Bestandteil zur Erfassung des umweltgefährdenden Potentials von Chemikalien (Binder and Stegemann, 1984; Görges and Nagel, 1990, Kristensen, 1994; Leeuwen *et al.*, 1990b; McKim, 1977; McKim, 1985).

Die Vorgehensweise bei der Bestimmung der Toxizität von Chemikalien ist jedoch keineswegs einheitlich. Gemäß der 2. Teststufe des 6. EG-Amendments und des Deutschen Chemikaliengesetzes (§ 7 ChemG) sollen in Langzeitstudien mit Fischen auch die Auswirkungen auf die Reproduktion untersucht werden (Nagel, 1994). Diese Forderung bei der Bestimmung von NOEC (No Observed Effect Concentrations) bei chronischen Belastungsstudien unterstützt die Durchführung von Life Cycle-Test. Andererseits sind Life Cycle-Tests bei Fischen mit wenigstens 3 - 4 Monaten sehr zeit- und personalaufwendig, und die Kostenfrage spielt nicht zuletzt auch hier eine entscheidende Rolle. Verschiedene Ansätze beschränkten sich daher bei der Erfassung chronischer Toxizitäten auf Early Life Stage-Tests (ELS), der Belastung vom befruchteten Ei bis zum Schlupf, bzw. auf Embryolarval Tests (ELT), der Belastung vom befruchteten Ei bis zum juvenilen Stadium.

Untersuchungen am Zebrafisch mit 4-Nitrophenol und 3, 4 Dichloranilin zeigten, dass der partielle Life Cycle-Test mit dem Zebrafisch nach (Bresch, 1982) die Sensitivität des kompletten Life Cycle-Test nicht erreicht und auch durch Early Life Stage-Test nicht zu ersetzen ist (Bresch, 1991; Nagel, 1994).

Dennoch scheinen ELS und ELT neben dem partiellen Life Cycle-Test für einen Großteil von Umweltgiften ein adäquater Kompromiss zwischen Kosten und Aufwand einerseits und der Bestimmung von NOEC für Umweltchemikalien andererseits darzustellen. Bei Untersuchungen zu partiellen Life Cycle-Tests (Jährlingen, die kurz vor der Gonadenreife stehen und über Eiablage hinaus exponiert werden) konnten für einige Schwermetalle ähnliche Empfindlichkeiten wie im kompletten Life Cycle-Test nachgewiesen werden (Holcombe *et al.*, 1976; McKim *et al.*, 1976). Vergleichende Untersuchungen von (McKim, 1977) ergaben in 83 % der Fälle gleiche Werte zwischen Life Cycle-Tests und ELS, lediglich 17 % wiesen eine höhere bzw. niedrigere Sensitivität innerhalb eines Faktors 2 auf.

Die Verkürzung der Expositionszeit vom Embryolarval-Test auf den Early Life Stage-Test kann bei der Bestimmung und Abschätzung von Toxizitäten mit einem gewissen Risiko behaftet sein. Untersuchungen haben gezeigt, dass Schadstoffe in den verschiedenen Entwicklungsstadien sowohl unterschiedlich akkumuliert als auch eliminiert werden (Guiney *et al.*, 1980), so daß auch hier Auswirkungen auf die Erfassung der Toxizität einer Chemikalie nicht ausgeschlossen werden kann. Dies ist (1) auf unterschiedliche Lipidanteile der Fischlarven (Guiney *et al.*, 1980), (2) auf einen späten Aufbau von Entgiftungsenzymen im Übergang vom Dottersackstadium zum juvenilen Fisch (Binder and Stegemann, 1984; Leeuwen *et al.*, 1990b) und (3) auf die Lipophilie und den Metabolisationsweg eines Schadstoffes (Call *et al.*, 1983; Leeuwen *et al.*, 1990b; Norberg-King, 1989) zurückzuführen. Darüber hinaus stellen der Zeitpunkt des Schlupfes sowie der Zustand der geschlüpften Larven weitere wichtige Parameter in der Abschätzung einer Belastung dar, die in den durchgeführten Untersuchungen bis zum 5. Tag erfasst wurden. Zwischen dem 5. und 12. bzw. 14. Tag wurde der Parameter Überlebensrate weiter verfolgt. Der Schlupf wird in der Regel über das Zusammenspiel des "hatching enzymes" Chorionase mit erhöhtem Innendruck, Muskelkontraktion sowie aktiver Wasserauf-

nahme durch den Embryo ausgelöst (Dave and Xiu, 1991). Hier können Umweltfaktoren und Schadstoffe diesen vielschichtigen Prozess auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen.

Die Zusammensetzung des PAH-Cocktails zeigte eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl in den Ansätzen der 24-well-Platten als auch in den Glasschalen. Jedoch waren Effekte in den Glasschalenansätzen aufgrund der höheren Ei- und Larvenzahl deutlich geringer. Bis zur 1-fachen Cocktailkonzentration konnten keine Effekte in den Eiern und Larven beobachtet werden, erst mit dem 10-fachen PAH-Cocktail zeigten einige Embryonen Entwicklungsverzögerungen in der Somitenanlage, der Cephalisation und der Ausbildung der Augen. Bei 4 - 6 % der Larven konnten nach 96 h Verkrümmungen der Längsachse beobachtet werden. Behinderungen dieser Art erwiesen sich für die betroffenen Tiere im Verlauf der weiteren Exposition bis zum 12. bzw. 14. Tag zu 100 % letal. Skelettdeformationen der Wirbelsäule wurden sowohl bei Zebrafärblingen auch durch Lindan, Deltamethrin, Atrazin (Görge and Nagel, 1990), 4-Chloranilin (Bresch, 1991), Tetramethylthiuramdisulfid (Leeuwen *et al.*, 1990a) als auch bei der Elritze (*Phoxinus phoxinus*) durch Triphenylzinn (Fent and Meier, 1994) ausgelöst. Da Lindan eines der Pestizide war, das dem PAH-Cocktail zugesetzt war, könnten die beobachteten Missbildungen zumindest z.T. auf Lindan zurückzuführen sein.

In den höchsten Cocktailkonzentrationen kam zu den bereits beschriebenen Veränderungen Ödembildungen in der Herzregion hinzu. Die Ausbildung von Ödemen beeinflusste die weitere Entwicklung der Embryonen zunehmend, da die Blutzirkulation immer mehr eingeschränkt wurde, so dass bisweilen kein Herzschlag mehr zu erkennen war. Derartige Anomalien, die auf extreme Dehnung und Vergrößerung der Blutgefäße des Herzens zurückzuführen sind (Laale *et al.*, 1977), erwiesen sich nach 5 - 7 Tagen bei allen betroffenen Larven letal. Eine Zunahme an Perikardialödemen bei Zebrafärblingen konnte auch (Strmac and Braunbeck, 2000) mit Sedimentextrakten der Körsch beobachten. Gerade von Pestiziden ist bekannt, dass sie die Bildung von Ödem induzieren oder zumindest begünstigen, wie Untersuchungen an Zebrafärblingen mit Atrazin und Deltamethrin (Görge and Nagel, 1990) sowie beim Saibling (*Salvelinus namaycush*) nach TCDD-Belastung (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin) (Guiney *et al.*, 1997) zeigten.

Die Verringerung des Schlupferfolges ist in engem Zusammenhang sowohl mit einer retardierten Entwicklung als auch mit der Induktion von Perikardialödemen in den Embryonen der höchsten Cocktailkonzentrationen zu sehen. Während im 24-well-Plattenansatz nach 48 h etwa 5 % der Larven geschlüpft waren, führte die Exposition der Eier nach 72 h gegenüber den höchsten Cocktailkonzentrationen zu einem um etwa 20 % verzögerten und reduzierten Schlupf. Im Gegensatz dazu waren in den Glasschalenansätzen nach 48 h bereits etwa 50 % der Tiere aller Cocktailkonzentrationen, jedoch schon 60 % der DMSO-Kontrolle geschlüpft. Geringfügig verzögerte Schlupfraten konnte auch Luckenbach *et al.*, 1998 bei Bachforellenembryonen, die dem Wasser der Körsch im Vergleich zu Krähenbach und Laborkontrolle exponiert worden waren, feststellen. Auch die Exposition von Zebrafärblingen gegenüber Del-

tamethrin führte im Gegensatz zu Lindan und Atrazin zu reduzierten Schlupfraten (Görge and Nagel, 1990). Ähnliche Ergebnisse ließen sich nach Schwermetallbelastung bei der Elritze (Fent and Meier, 1994) bzw. dem Zebraärbüchling nachweisen (Dave and Xiu, 1991, Strmac and Braunbeck, 1999).

Die Ausbildung von Ödemen sowie von Deformationen der Wirbelsäule spiegelten sich auch in der Überlebensrate wider. Während in den ersten 24 h v. a. die koagulierten Eier zur Reduktion der Überlebensrate beitrugen, lässt sich der weitere Abfall zwischen dem 4. - 7. Tag auf den Tod von Embryonen und Larven mit Ödemen und Deformationen der Wirbelsäule zurückführen. Im Verlauf der weiteren Exposition konnte dann keine Zunahme an Ausfällen selbst in den höchsten Cocktailkonzentrationen mehr beobachtet werden.

Insgesamt erwies sich die Überlebensrate als Marker mit der besten Differenzierbarkeit zwischen den einzelnen Schadstoffkonzentrationen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen vergleichende Untersuchungen von (Kristensen, 1994; McKim, 1985; Woltering, 1984), in denen sich die Überlebensrate als sensitiver Marker bei der Bewertung von Xenobiotica herausstellte.

10. Zusammenführung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Validierung von ausgewählten Stoffwechsellenzymen, um sie als Biomarker in Kombination mit ultrastrukturellen Untersuchungen innerhalb des Verbundprojektes VALIMAR zur Abschätzung der chemischen Belastung kleiner Fließgewässer einzusetzen. Einige der untersuchten Stoffwechsellenzyme aus Leber und Gehirn konnten bereits erfolgreich in Zellkulturen (Zahn *et al.*, 1996) bzw. Monosubstanzprüfungen *In vivo* (Arnold, 1995; Arnold *et al.*, 1995; Braunbeck and Völkl, 1991) zur Charakterisierung der Toxizität bestimmter Chemikalien beitragen. Insgesamt jedoch war bisher die Erfassung von Veränderungen der Stoffwechsellenzymen unter Schadstoffeinfluss eher sporadischer Natur, so dass Daten zum Einsatz als Biomarker bis dato nur sehr begrenzt vorlagen.

Die Halbfreilanduntersuchungen gestatteten eine klare Differenzierung sowohl zwischen den unterschiedlich stark belasteten Modellgewässern Krähenbach und Körsch, als auch gegenüber der Laborreferenz. Trotz unterschiedlicher Empfindlichkeit von Bachforelle und Bachschmerle für die chemische Belastung ergab die Bewertung ein vergleichbares Ergebnis, aus dem folgende Schlüsse zu ziehen waren:

- Die **numerische Analyse** ergab für die Körsch mehr Abweichungen von der Laborreferenz, so dass die Körsch als deutlich stärker belastetes Gewässer einzuschätzen ist. Diese Einschätzung wurde durch die chemische Analytik bestätigt.
- Das der ursprünglich als Kontrolle zur belasteten Körsch gedachte Krähenbach selbst eine diskontinuierliche, jedoch im Vergleich zur Körsch deutlich schwächere Belastung aufweist, die über Abweichungen in den Aktivitäten der Stoffwechsellenzyme von der Laborreferenz zu erfassen war.
- Die **qualitative Analyse** konnte zeigen, dass Abweichungen an der Körsch ein statistisch höheres Signifikanzniveau erreichen. Die Effekte in der Körsch sind wesentlich energieintensiver bzw. schwerwiegender einzuschätzen.
- Selbst unter Berücksichtigung der geringeren Zahl an Beprobungen der Bachschmerlen zeigten die Bachforellen insgesamt die höhere Anzahl an Abweichungen von der Laborkontrolle, womit die Bachforelle als die empfindlichere Art einzustufen ist.
- Die Heterogenität in den Abweichungen der Stoffwechsellenzymeaktivitäten gegenüber der Laborkontrolle weist auf eine diskontinuierliche Belastung der Modellgewässer hin. Auch diese Einschätzung konnte durch die chemische Analytik bestätigt werden (vgl. Abb. 1.2 -1.5)

Die Eignung eines jeden Enzyms zur Differenzierbarkeit zwischen den Untersuchungsgewässern stellt einen Kompromiss aus drei Faktoren dar, die sich wie folgt in Zusammenhang (Abb. 10.1) bringen lassen: Zentraler Bezugspunkt der Gewässerbelastungen ist jeweils der Referenzwert "Labor", da alle signifikanten Abweichungen in Relation zu diesem gesetzt

werden. Dabei sollte die Gewässerbelastung an jedem Gewässer so realitätsnah wie möglich sowohl durch die numerisch (*Anzahl der signifikanten Abweichungen gegenüber dem Laborwert*) als auch die qualitativ signifikante Abweichung (*Maß des Signifikanzniveaus einer Abweichung gegenüber dem Laborwert*) erfasst werden. Die höchste Differenzierbarkeit wird jedoch erst dann erreicht, wenn die Differenz aus den Abweichungen vom Referenzwert eines jeden Gewässers n_1 bzw. n_2 maximal ist.

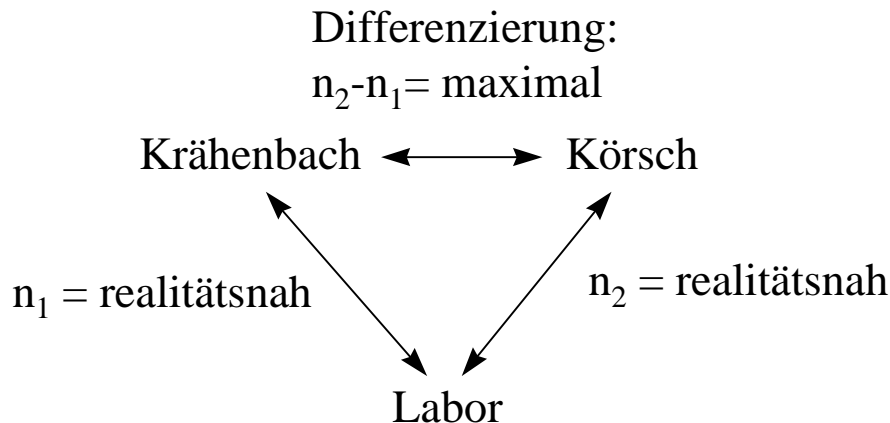


Abb. 10.1 Der Zusammenhang der Differenzierbarkeit eines jeden Biomarkers zwischen unterschiedlich belasteten Gewässern in Relation zum Laborwert; n_1 = Abweichungen am Krähenbach von Laborwert; n_2 = Abweichungen an der Körsch vom Laborwert.

Erreicht die Differenz 0, kann zwischen Gewässern nicht mehr unterschieden werden. In diesem Fall ist lediglich eine Unterscheidung zwischen den Gewässern und dem Labor gegeben. Tabelle 10.1 fasst die Enzyme nach ihrem Wert zur Differenzierbarkeit der Gewässer für beide Fischarten zusammen.

Von den untersuchten Stoffwechsellenzymen trat die mikrosomale Esterase als das Enzym bei gegebener Gewässerbelastung mit der besten Differenzierbarkeit sowohl zwischen den Untersuchungsgewässern als auch zur Laborreferenz hervor. Dennoch zeigen die Unterschiede in den Rängen bei beiden Fischarten, dass es "die Enzyme zur Differenzierung" zwischen den Gewässern nicht gab, und dass sowohl Artunterschiede als auch die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Lebensraum einen entscheidenden Einfluss haben. Insbesondere die Bachschmerlen mit ihrer benthischen Lebensweise könnten einer höheren Belastung ausgesetzt gewesen sein, da Schadstoffe v. a. an Schwebstoffe gebunden sind und gerade in den Bypass-System eine starke Sedimentierung auftrat.

Ein anderer Aspekt betrifft die in den Stoffwechselkreisläufen eingebundenen Enzyme, die nicht isoliert betrachtet werden können. So wirkt sich beispielsweise die Aktivierung des Citratzyklus unweigerlich auf die in ihm involvierten Enzyme Succinatdehydrogenase und Citratsynthase aus. Tatsächlich liegen gerade die Enzyme aus Stoffwechselwegen, die aufeinander

aufbauen, in der Differenzierbarkeit zwischen den Gewässern immer sehr eng beieinander, wie die Beispiele Succinatdehydrogenase (Citratzyklus) und Malatenzym (Fettstoffwechsel), Citratsynthase (Citratzyklus) und Phosphofruktokinase (Glykolyse) bzw. Alaninaminotransferase (Aminosäureabbau) bei den Bachforellen, bzw. Phosphofruktokinase (Glykolyse) und Succinatdehydrogenase (Citratzyklus) bei den Bachschmerlen verdeutlichen.

Tab. 10.1 Rangliste der Enzyme geordnet nach der Differenzierung zwischen den Gewässern Krähenbach und Körsch auf der Basis der numerischen Analyse nach Bypassexposition von Bachforelle und Bachschmerle.

Bachforelle		Bachschmerle	
Enzym	$n_2 - n_1 = \text{max.}$	Enzym	$n_2 - n_1 = \text{max.}$
Esterase	9	Katalase	4
Hexokinase	5	Esterase	3
Malatenzym	3	Malatenzym	3
Succinatdehydrogenase	3	Alaninaminotransferase	3
Saure Phosphatase	2	Cytochrom C Oxidase (Gehirn)	3
Citratsynthase	2	Phosphofruktokinase	2
Phosphofruktokinase	1	Succinatdehydrogenase	1
Alaninaminotransferase	1	Hexokinase	1
Cytochrom C Oxidase	1	Acetylcholinesterase	1
Superoxiddismutase	1	Saure Phosphatase	0
Acetylcholinesterase	0	Glucose-6-P-Dehydrogenase	0
Katalase	0	Cytochrom C Oxidase	0
Glucose-6-P-Dehydrogenase	0	Superoxiddismutase	0
Cytochrom C Oxidase (Gehirn)	0	Citratsynthase	n. bestimmt

Differenzierungspotential

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, inwieweit die in den Bypass-Systemen (aktives Biomonitoring) beobachteten Reaktionen der Biomarker mit den im Freiland (passives Biomonitoring) induzierten Antworten von frei lebenden Fischpopulationen im Einklang stehen. Hierzu wurden die im Bypass exponierten Testfische mit Bachschmerlen und Bachforellen aus den Untersuchungsgewässern verglichen. Schon sehr bald wurde offenbar, dass die Vergleichbarkeit nur unvollständig war. Bei der Elektobefischung zeigte sich, dass es in der Körsch keine stehende Bachforellenpopulation gab, die eine ausreichende Versorgung mit Testfischen ermöglichen würde. Auf der anderen Seite konnten im Krähenbach aufgrund von Wasserverbauungen keine Bachschmerlen nachgewiesen werden. Daher musste der Vergleich

zwischen Freiland und Bypass bei den Bachforellen auf das Krähenbach/Aich-system und bei den Bachschmerlen auf das Körschsystem beschränkt werden.

Trotz dieser Einschränkungen konnten für die Bachforellen Übereinstimmungen von 64,2 % mit dem Freiland erzielt werden, was vor dem Hintergrund der geringeren Belastung und der größeren Heterogenität des Krähenbach nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre. Bei den Bachschmerlen stieg auf der Basis der biochemischen Parameter die Übereinstimmungsrate mit dem Freiland sogar auf 73,1 %, woraus folgenden Schluss gezogen werden kann:

- Zusammen mit den Vorteilen eines hohen Maßes an Kontrollierbarkeit stellt das Bypass-System eine gute Alternative zum passiven Biomonitoring (*Testorganismen werden direkt zu Untersuchungszwecken dem Freiland entnommen*) und zur Käfighaltung des aktiven Biomonitorings dar, bei der selbst flache oder reißende Gewässer auf ihr ökotoxikologische Potential hin überprüft werden können.

Neben den Schadstoffen in den Untersuchungsgewässern wirken eine Fülle weiterer nicht kontrollierbarer Parameter auf die Physiologie der Versuchstiere ein, die nicht zuletzt auch die Aktivitäten der Stoffwechsellzyme beeinflussen. In ergänzenden Laborversuchen sollte daher die Einflussnahme der Schadstoffe auf die Biomarkerantworten geklärt werden. Dabei stellte sich heraus, dass trotz Erreichens vergleichbar akkumulierter Schadstoffkonzentrationen in den Versuchstieren des Labors zum Bypass bzw. dem Freiland die Biomarkerantworten sowohl bei den biochemischen als auch strukturellen und pathologischen Markern oft nur tendenzieller Art waren und weit hinter den im Freiland beobachteten Antworten zurückblieben. Möglicherweise gehen die geringen Induktionsantworten im Labor auf die insgesamt sehr niedrigen Konzentrationen der Einzelstoffe (ng/L-Bereich) zurück, die in den Versuchstieren zu Adaptionsprozessen führten. Im Freiland wechseln aufgrund der inhomogenen Belastung, Belastungs- und Entspannungsphasen einander ab. Eine neuerliche Belastung, auf eine Entspannungsphase folgend, könnte somit von Neuem Induktionswirkung auf die Enzymsysteme haben. Diese neuerliche Induktionswirkung ist bei chronischen Belastungsszenarien nicht gegeben; deshalb könnte eine geringere Schadstoffbelastung im Freiland deutlichere Markerantworten hervorrufen, die im Laborexperiment bei chronischer Belastung nur mit sehr viel höheren Schadstoffdosen erreicht werden können.

- Die Daten zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen Biomarkerantwort und akkumulierter Schadstoffkonzentration bis zu einem möglichen Schwellenwert notwendigerweise nicht gegeben ist. Neuerliche Induktionsimpulse durch wiederkehrende Belastungsspeaks wie sie im Freiland auftreten, scheinen die bedeutendere Rolle zu spielen. Hierzu sind dringend weitere Untersuchungen erforderlich.

Eine der Hauptbelastungsquellen der Körsch stellen neben der Landwirtschaft 7 Kläranlagen entlang des Bachlaufes dar. Einer der Belastungspunkte stellen Stickstoffverbindungen in Form von Ammoniak, Nitrit und Nitrat dar. Dieser Eintrag war Anlass, den Einfluss auf die

zusätzlich vorhandene Gewässerbelastung unter Laborbedingungen zu überprüfen. Dabei konnte gezeigt werden:

- dass die eingesetzten Ammoniak/Ammonium-Konzentrationen zu einer tendenziell leichten Induktion der Enzymaktivitäten führten, und
- dass eine generelle synergistische oder antagonistische Wirkung mit dem Körsch-Cocktail bei den Bachforellen nicht zu beobachten war, wenngleich für einzelne Enzyme zumindest tendenziell Effekte gegenüber dem alleinigen Cocktailansatz stärker ausgeprägt waren. Biologische Folgen waren aus den induzierten Werten jedoch nicht abzuleiten. Dies bestätigen die Ergebnisse sowohl der Bypassexpositionen als auch der Freilanduntersuchungen.

Regenerationsphasen, in denen die Gewässerbelastung verringert ist, können für die Organismen von zentraler Bedeutung sein, ermöglichen sie doch, angereicherte Umweltchemikalien abzubauen, ohne gleichzeitig neue aufzunehmen und ohne den Metabolismus durch die Induktion von Detoxifikationsprozessen über das Normalmaß hinaus zu belasten. Der in diesem Rahmen dazu durchgeführte Regenerationsversuch konnte bestätigen, dass die zuvor im Bypass belasteten Tiere in der Lage sind, Enzymaktivitäten auf das Normalmaß zurückzuführen und vermutlich auch akkumulierte Schadstoffkonzentrationen auf das Niveau der Kontrolltiere abzubauen.

Neben dem Regenerationsverhalten der Stoffwechsellzyme kommt dem Zeitfenster, in dem sich Induktionsantworten bei Biomarkern nach chronischer Gewässerbelastung manifestieren, eine zentrale Bedeutung zu. Davon hängt ab, ob ein Biomarker eine kurzzeitige Belastung integrieren und damit auch indizieren kann. Um diesen Aspekt zu beleuchten, wurden Bachforellen und Bachschmerlen nach chronischer Belastung gegenüber einem ausgewählten Pesticid- und PAH-Cocktail für 48 h einem Belastungspeak ausgesetzt und sowohl das Induktionsverhalten als auch das Abklingen der Induktion bei kontinuierlicher Hintergrundbelastung biochemisch und ultrastrukturell verfolgt. Dabei konnte gezeigt werden, dass:

- Bachforellen und Bachschmerlen unter gleichen (künstlichen) Habitatsbedingungen (*gleichmäßige Belastung der Wasserphase, ohne Sediment*) sehr ähnliche Veränderungen zeigten,
- innerhalb von 48 h eine deutliche, wenn auch häufig nicht signifikante Enzymreaktion induziert wurde, und
- biochemische Befunde ultrastrukturell durch zelluläre Veränderungen erklärt werden können.

Der Vorteil der Elektronenmikroskopie ist in der Integration zahlreicher biochemischer und physiologischer Prozesse zu sehen. Die Untersuchungen schadstoffbedingter struktureller Veränderungen ist nicht von spezifischen zellulären Zielsystemen abhängig, sondern stellt gleichzeitig Effekte in praktisch allen Zellorganellen dar. Trotzdem ermöglicht oft erst die

Korrelation ultrastruktureller und biochemischer Resultate, die Bedeutung der Effekte abzuschätzen.

Veränderungen, die in der Ultrastruktur durch die Cocktailbelastungen induziert wurden, waren meist unspezifischer Art. Hierzu gehören z.B. Effekte im lysosomalen Kompartiment und die Zunahme des glatten endoplasmatischen Reticulums. Interessanterweise sind es diese unspezifischen Effekte, deren adaptive und degenerative Bedeutung für die Zelle bekannt sind (Ghadially, 1988). Auf eine degenerative Wirkung des Cocktails wiesen die strukturellen Veränderungen der Mitochondrien (nach Belastungspeak), aber auch die Zunahme an Heterochromatin bei gleichzeitiger Marginalisierung an der Kernmembran hin. Die Proliferation der Organellen des Energiestoffwechsels und Veränderungen in den Reservestoffen der Leber sind dagegen wahrscheinlich auf die Kompensation von Energieverlusten und einen erhöhten Stoffwechsel im intakten Tier zurückzuführen. Dabei könnte es sich bei den meisten Effekten um regulatorische Maßnahmen zur Anpassung der Homöostase an den durch den Cocktail verursachten Stress handeln.

Während die in dem Belastungsversuch eingesetzten Bachforellen durch Adaptionsprozesse in der Lage waren, ihre innere Homöostase innerhalb eines festen Zeitfensters wieder herzustellen, sind Eier, heranwachsende Larven und Jungfische dagegen nur begrenzt in der Lage, die Akkumulation von Schadstoffen zu begrenzen bzw. zu umgehen. Neben dem unterschiedlichen Lipidanteil innerhalb eines Larven-/Jungfischstadiums (Guiney *et al.*, 1980), der zu veränderten Akkumulationsraten führt, kommt der späten Ausbildung von effizienten Entgiftungsenzymssystemen (Binder and Stegemann, 1984; Guiney *et al.*, 1980) im Übergang vom Dottersackstadium zum Jungfisch eine bedeutende Rolle bei der Entstehung schadstoffbedingter Schädigungen und Missbildungen zu. Führte sowohl der 50-fache PAH-Cocktail als auch der Belastungspeak bei den Bachforellen zu unspezifischen Adaptionsreaktionen, traten bereits ab der 10-fachen Cocktaillkonzentration in den Early Life Stage- und Embryolarval-Tests mit dem Zebraäbrbling sowohl qualitativ als auch quantitativ dosisabhängige Schädigungen auf.

Der Vergleich der verschiedenen chronischen Belastungsversuche bestätigt, dass die Stoffwechsellzyme in einem vergleichbaren Sensitivitätsbereich mit weiteren wichtigen biologischen Endpunkten der Embryotoxikologie wie etwa Ödembildung, Missbildung oder Letalität anzusiedeln sind. Bei wechselnden bzw. diskontinuierlichen Belastungen ist der Sensitivitätsbereich sogar noch höher einzuschätzen.

Fazit. Die verschiedenen Teilaspekte der durchgeführten Studie zur Charakterisierung der ausgewählten Stoffwechsellzyme als Biomarker haben gezeigt, dass die Stoffwechsellzyme ein sehr empfindliches Instrument zur Erfassung von Umweltchemikalien darstellen. Dies wird umso klarer, wenn man berücksichtigt, dass in den eingesetzten Cocktaillkonzentrationen die Summenparameter einzelner Schadstoffgruppen wie beispielsweise den PAHs, PCBs oder Pestiziden vielfach Werte im unteren ng/L bis µg/L-Bereich erreichten. Da nicht alle darin enthaltenen Einzelsubstanzen in diesen Konzentrationsbereichen eine biologische Wirkung

entfalten (Schnurstein, 2000), reduziert sich die Induktionskonzentration biologisch wirksamer Einzelkomponenten weiter, die dennoch Reaktionen in den Stoffwechsellzymen hervorbrachten.

Im Gegensatz zu Enzymen wie der Acetylcholinesterase, die selektiv durch bestimmte Pestizidklassen gehemmt wird, ist der Rückschluss auf einen bestimmten Schadstoff bzw. eine Schadstoffgruppe einzig aus den Reaktionen der Stoffwechsellzyme bei den vielfach unspezifischen Reaktionen des Metabolismus meist nicht gegeben. Insbesondere Enzyme allgemeiner Stoffwechselwege wie beispielsweise Glykolyse oder Citratzyklus sind als unspezifische Marker zu werten. Dennoch, in Kombination mit ultrastrukturellen oder histopathologischen Untersuchungen und gegebenenfalls chemischer Analytik lassen sich Effekte in ihrer Wirkung eingrenzen und liefern damit einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Belastung durch Umweltgifte, Schadstoffgemische unbekannter Zusammensetzung in unseren Gewässern.

11. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie standen Untersuchungen zur Validierung von ausgewählten Stoffwechsell-enzymen in Leber und Gehirn als Biomarker zweier einheimischer Fischarten, Bachforelle und Bachschmerle, zur Erfassung von Umweltgiften im Vordergrund. Im Rahmen des vom BMBF geförderten Verbundprojektes "VALIMAR" wurden zwischen 1995 und 2000 im Großraum Stuttgart die unterschiedlich stark belasteten Fließgewässer Krähenbach/Aich und Körsch beprobt. Die aus Halbfreilandbeprobungen (Bypass-Exposition) gewonnen enzymatischen Daten wurden zu ultrastrukturellen, pathologischen Daten sowie zu Ergebnissen der Biotransformation in Beziehung gesetzt. Aufgrund der Daten zu den Stoffwechsellenzymen konnten beide Gewässer klar nach ihrem Belastungszustand differenziert werden. Die Körsch erwies sich dabei im Vergleich zum leicht belasteten Krähenbach/Aich-System als das stärker belastete Gewässer, wobei die Ergebnisse durch die chemische Analytik bestätigt wurden.

In einer zweiten Phase wurden um die Aussagefähigkeit der Markerantworten aus den Bypassexpositionen zu bewerten zwischen 1998 - 1999 Ergebnisse des passiven und aktiven Biomonitoring verglichen. Für die parallel zu den Halbfreilanduntersuchungen aus dem Freiland entnommenen Bachforellen und Bachschmerlen konnten Übereinstimmungen von 61,4 % bzw. 71,8 % erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Umweltmonitoring durch Bypass-Expositionen von Testorganismen eine wirkungsvolle Alternative/Ergänzung zum passiven Umweltmonitoring bzw. zur Käfighaltung im aktiven Biomonitoring darstellt.

Um die Wirkung nicht zu kontrollierender Einflüsse auf die Biomarker im Freiland zu minimieren und den Einfluss der Schadstoffe auf die Biomarker zu überprüfen, wurden parallel zu den Halbfreilanduntersuchungen, Bachforellen im Labor unterschiedlichen Konzentrationen eines Cocktails der durchschnittlichen Schadstoffkonzentration der Körsch exponiert. Nach 4 wöchiger Exposition wurden bereits bei der 1-fachen bzw. 10-fachen Konzentration dem Bypass vergleichbare Akkumulationswerte erreicht. Dennoch blieben die Reaktionen der Stoffwechsellenzyme deutlich hinter den Antworten des Freilands zurück. Offensichtlich ist zumindest bis zu einem möglichen Schwellenwert für die Induktion von Antworten der Stoffwechsellenzyme eine Diskontinuität in der Belastung, wie sie im Freiland auftritt, von größerer Bedeutung als die Schadstoffkonzentration. Die Kombination von Ammoniak und Körsch-Cocktail im subletalen Bereich führte zu keinen synergistischen oder antagonistischen Effekten von statistischer Signifikanz, wengleich die alleinige Exposition gegenüber Ammoniak zu tendenziell induzierten Werten führte.

Die Regenerationsfähigkeit der Stoffwechsellenzyme konnte an Bachforellen im Anschluss an eine halbjährige Bypass-Exposition gezeigt werden, als nach Überführung in schadstofffreies Wasser die Aktivitäten nahezu aller Enzyme den Referenztieren vergleichbare Werte aufwiesen.

Zur Charakterisierung des Zeitfensters in dem sich Induktionsantworten bei Biomarkern unter fortwährender Belastung nach einem Belastungsspeak manifestieren, wurden Bachforellen und Bachschmerlen in einem chronischen Belastungsexperiment einem ausgewählten PAH-Cocktail exponiert. Nach einem zusätzlichen Belastungsspeak konnte gezeigt werden, dass selbst unter kontinuierlicher Belastung, die Stoffwechsellenzyme schnell integrierende und regenerierende Marker darstellen. 48 h nach dem Belastungsspeak waren bereits deutlich erhöhte Induktionsantworten der Stoffwechsellenzyme nachzuweisen, die mit adaptiven ultrastrukturellen Veränderungen korreliert werden konnten.

In Early Life Stage und Embryolarval-Tests mit dem Zebraärbling konnte eine teratogene Wirkung des PAH-Cocktail nachgewiesen werden. Ab der 10-fachen Cocktailkonzentration traten sowohl qualitativ als auch quantitativ dosisabhängige Schädigungen der Larven auf, die den Tod der Tiere nach sich zog.

Der Vergleich der verschiedenen chronischen Belastungsversuche bestätigt, dass die Stoffwechsellenzyme in einem vergleichbaren Sensitivitätsbereich mit wichtigen biologischen Endpunkten der Embryotoxikologie wie etwa Behinderung, Missbildung oder Letalität anzusiedeln sind.

In den verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Stoffwechsellenzyme sensitive und schnell integrierende Marker darstellen, die in Kombination mit ultrastrukturellen und histopathologischen Biomarkern einen wichtigen Anteil bei der Charakterisierung von Umweltgiften in unseren Gewässern liefern können.

12. Publikationen und Tagungsbeiträge

Konradt, J., Tribskorn, R., and Braunbeck, T. (1996). Vergleichende biochemische Untersuchungen an Fischen aus belasteten Kleingewässern. In "Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft" (H.-D. Pfannenstiel, ed.), pp. 159. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.

J. Konradt, T. Braunbeck. 1. Tagung der Gesellschaft für Ichthyologie, 9 - 12 Okt. 1997, Düsseldorf. Veränderungen von Stoffwechsellenzymen bei Bachforelle und Bachschmerle unter Einfluß kommunaler und landwirtschaftlicher Abwässer. Vortrag

J. Konradt, T. Braunbeck. SETAC-Deutschland, Aachen 1997, Vergleichende biochemische Untersuchungen an Fischen aus belasteten Kleingewässern. Poster

J. Konradt, T. Braunbeck. SETAC-Europe, Bordeaux, 1998, Changes in enzyme activities of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) and loach (*Barbatula barbatula*) after exposure to agricultural and domestic effluents. Poster

Tribskorn, R., Adam, S., Behrens, A., Braunbeck, T., Gränzer, S., Honnen, W., Konradt, J., Köhler, H.-R., A., O., Pawert, M., Schlegel, T., Schüürmann, G., Schwaiger, J., Segner, H., Strmac, M., and Müller, E. (1998). Eignung von Biomarkern zur Fließgewässerbewertung: Zwischenergebnisse aus dem Projekt "Valimar" (1995-1997). In "Ökotoxikologie- Ökosysteme Ansätze und Methoden" (O. u. Marker, ed.), pp. 382-398. Ecomed, Landsberg.

J. Konradt, T. Braunbeck. SETAC-Europe, Leipzig, 1999, The activity of unspecific metabolic enzymes as a useful tool in biomonitoring. Poster

Schramm, M., Behrens, A., Braunbeck, T., Eckwert, H., Köhler, H.-R., Konradt, J., Müller, E., Pawert, M., Schwaiger, J., Segner, H., and Tribskorn., R. (1999). Cellular, Histological and Biochemical Biomarkers. In "Biomonitoring of polluted water" (A. Gerhardt, ed.), pp. 33-64. Trans Tech Publications, Zürich.

13. Abkürzungsverzeichnis

ACHE	Acetylcholinesterase
ALA	Alaninaminotransferase
B.U.	Beaufay-Unit
CF	Konditionsfaktor
COX	Cytochrom C Oxidase
CS	Citratsynthase
DDD	1,1Bis-(4-chlophenyl)-2,2-dichlorethan
DDE	1,1-Dichlor-2,2bis(p-chlorophenyl)ethylen
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DH°	deutsche Härte
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNOC	Dinitro- <i>o</i> -Kresol
ELS	Early Life Stage
ELT	Embryolarvaltest
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
G6PDH	Glucose-6-P-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
LC	Letal Konzentration
LDH	Lactatdehydrogenase
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
LSI	Leber-somatischer Index
ME	Malatenzym
mU	Milliunit
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid reduziert
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NOEC	NO Observed Effect Concentration
PAH	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PFK	Phosphofruktokinase
RER	Rauhes endoplasmatische Reticulum
SDH	Succinatdehydrogenase
SER	Glattes endoplasmatische Reticulum
SOD	Superoxiddismutase
U	Unit
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

14. Literatur

- Abiola, F. A., Houeto, P., Diatta, F., Badiane, M., and Fayomi, F. (1991). Agricultural organophosphate applicators. cholinesterase activity and lipoprotein metabolism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 351-360.
- Ackrell, B. A. C., Kearney, E. B., and Singer, T. B. (1978). Mammalian succinate dehydrogenase. In "Biomembranes" (S. Fleischer and L. Parker, eds.), pp. 466 pp.
- Ahlers, J., and Diderich, R. (1998). Legislative perspective in ecological risk assessment. In "Ecotoxicology" (G. Schüürmann and B. Markert, eds.), pp. 841-869. J. Wiley & Sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag.
- Behrens, A. and Segner, H. (1999). Eignung von Biotransformationsenzymen zur Differenzierung kleiner Fließgewässer. In „Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden“ (Oehlmann and Markers, eds), pp 376-380. Ecomed.
- Ahlf, W., Dahm, M., Förstner, U., and Wild-Metzko, S. (1991). Biologisches Bewertungskonzept für Sedimente. *Vom Wasser* 76, 215-223.
- Aknes, A. L., and Njaa, L. (1981). Catalase, glutathione-s-transferase and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B, 893 - 896.
- Albaster, J. S., and Lloyd, R. (1980). Water quality criteria for freshwater fish, pp. pp. 297. Butterworth, London.
- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., and Vanegas, C. (1997). Temperature tolerance of *Peneaus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.* 39, 345-353.
- Aldridge, W. N. (1953). The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 53, 62.
- Arias, I. M., Popper, H., Schachter, D., and Schafritz, D. A. (1988). The liver: biology and pathobiology. Raven Press, New York.
- Arnold, H. (1995). Die Wirkung von Pestiziden auf Monitororgane und -zellen bei Fischen: ein Vergleich von subletalen Effekten in Einzelstudien und in Kombinationsexperiment. Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg.
- Arnold, H., Pluta, H.-J., and Braunbeck, T. (1995). Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 33, 17 - 43.
- ATV-Landesgruppe, B. W. (1994). Kläranlagen-Nachbarschaften. F. Hirthammer-Verlag, München.
- Bach, M., Fischer, P., and Frede, H.-G. (1999). Kurzfassung/Anwendungsbestimmungen zum Schutz vor schädlichen Umweltwirkungen durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und ihre Beachtung in der Praxis, UBA-FB 99-050. Umweltbundesamt.
- Baglio, C. M., and Farber, E. (1965). Reversal by adenine of the induced lipid accumulation in the endoplasmatic reticulum of the liver. *J. Cell. Biol.* 27, 591-601.
- Bainy, A. C. D., Saito, E., Carvalho, P. S. M., and Junqueira, V. (1996). Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver, kidney of Nila tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151-162.
- Bath, R. N., and Eddy, F. B. (1980). Transport of nitrite across fish gills. *J. Exp. Zool.* 214, 119-121.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. Z., Wattiaux, R., Jacques, P., and Duve, C. d. (1964). Intracellular distribution of Monoamin Oxidase, Aspartat Amino-transferase, Alanine Amino-transferase, D-Amino Acid Oxidase and Catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* 92, 179 - 184.

- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., and Berthet, J. (1974). Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. *Cell biology* 61, 188 - 200.
- Begum, G., and Vijayaraghavan, S. (1995). *In vivo* toxicity of Demethoate on proteins and transaminases in the liver tissue of fresh water fish *Clarias batrachus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 370 - 375.
- Behrens, A., and Segner, H. (1998). 1 Zwischenbericht zur Phase II.: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Bergmeyer, H. U. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim.
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J. U., and Goksøyr, A. (1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.* 36, 75-98.
- Binder, R. L., and Stegemann, J. (1984). Microsomal electron transport and xenobiotic monooxygenase activities during the embryonic period of development in the killifish, *Fundus heteroclitus*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 432-443.
- Black, J. J., Macubin, A. E., and Johnston, C. J. (1988). Carcinogenicity of benz[a]pyren in rainbow trout resulting from embryo microinjection. *Aquat. Toxicol.* 13, 297-308.
- Bocquené, G., Bellanger, C., Cadiou, Y., and Galgani, F. (1995). Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4, 266-279.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braunbeck, T. (1989). Cytopathologische Veränderungen in der Fischleber durch Umweltchemikalien - Beiträge zu Ökologie. In "Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg.
- Braunbeck, T., Storch, V., and Nagel, R. (1989). Sex-specific reactions of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) after prolonged sublethal exposure to 4-nitrophenol. *Aquat. Toxicol.* 14, 185-202.
- Braunbeck, T., Burkhardt-Holm, P., and Storch, V. (1990a). Liver pathology in eels (*Anguilla anguilla*) from the Rhine river exposed to the spill at Basle in November 1986. In "Limnologie aktuell". Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V., and Nagel, R. (1990b). Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long term exposure to γ -hexachlorocyclohexane. *Ecotox. Environ. Saf.* 19, 355-374.
- Braunbeck, T., V. Storch, and Bresch, H. (1990c). Species-specific reactions of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroanilin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 405-418.
- Braunbeck, T., and Völkl, A. (1991). Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla*) by sublethal exposure to dinitro-*o*-cresol (DNOC): An ultrastructural and biochemical study. *Ecotox. Environ. Saf.* 21, 109-127
- Braunbeck, T., Teh, S. J., Lestere, S. M., and Hinton, D. E. (1992). Ultrastructural alterations in hepatocytes of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Toxicol. Pathol.* 20, 179-196.

- Braunbeck, T. (1994). Detection of environmentally relevant concentrations of toxic organic compounds using histological and cytological parameters: substance-specificity in the reaction of rainbow trout liver? In "Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish" (U. Nations, ed.), pp. 15-29. Fishing News Book
- Braunbeck, T. (1995). Zelltests in der Ökotoxikologie- Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests (L. f. U. Baden-Württemberg, ed.), pp. 1-204. Veröff. PAÖ 11, Karlsruhe.
- Bresch, H. (1982). Investigations of long term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction. *Ecotox. Environ. Saf.* 6, 102-112.
- Bresch, H. (1991). Early life stage test in zebrafish versus growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 641-648.
- Bucher, F. (1990). Organ pattern and natural fluctuations of blood enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 795-799.
- Bucher, F., and Hofer, R. (1990). Effects of domestic wastewater on serum enzyme activities of brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97C, 381-385.
- Burkhard-Holm, P., Oulmi, Y., Schröder, A., Storch, V., and Braunbeck, T. (1999). Toxicity of 4-chloroaniline in early life stages of zebrafish *Danio rerio*: II. Cytopathology and regeneration of liver and gills after prolonged exposure to waterborne 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 85-102.
- Burton, G. A. (1991). Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585-1627.
- Cajarville, M. P., Orbea, A., Marigomez, I., and I.Cancio. (1997). Peroxisome proliferation in the digestive epithelium of mussels exposed to the water accommodated fraction of three oils. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharm Toxicol. Endoc.* 117 (3), 233 - 242.
- Call, D. J., Brooke, L. T., Kent, M. L., Knuth, C., Anderson, C., and Morairity, C. (1983). Toxicity, bioconcentration, and metabolism of the herbicide propanil (3'-4'-dichloropropanilide) in freshwater fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 175-182.
- Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 3-6.
- Casillas, E., Meyers, M. S., Rhodes, L. D., and McCain, B. B. (1985a). Serum chemistry of diseased English sole (*Parophrys vetulus*) from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish. Dis.* 8, 437-449.
- Casillas, E., Myers, M. S., Rhodes, L. D., and McCain, B. B. (1985b). Serum chemistry of diseased English sole (*Parophrys vetulus*) from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish. Dis.* 8, 437-449.
- Chambers, J. E., and Yarbrough, J. D. (1976). Xenobiotic biotransformation systems in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 55C, 77-84.
- Christensen, G. M., Olson, D., and Riedel, B. (1982). Chemical effects on the activity of eight enzymes: A review and a discussion relevant to environmental monitoring. *Environ. Res.* 29, 247 - 255.
- Coedacier, J. L., and Dutto, G. (1999). Effects of chronic exposure to ammonia on alterations of protein and immunoglobulines in sea bass (*Dicentrurus labrax*) serum. *Aquat. Liv. Res.* 12, 247-253.
- Connell, D. (1998). Bioaccumulation of chemicals by aquatic organisms. In "Ecotoxicology" (G. Schüürmann and B. Markert, eds.), pp. 439-450. Inc. and Spektrum Akademischer Verlag.
- Cooperstein, S. J., and Lazarow, A. (1950). A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 189, 665-670.

- Dave, G., and Xiu, R. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, (*Brachydanio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Tox.* .
- Egaas, E., Skaare, J. U., N.O.Svendsen, Sandvik, M., Fals, J. G., Dauterman, W. C., Colliers, T. K. and Netland, J. (1993). A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the *In vitro* phase II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and on plant species. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 C, 141-149.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 - 95.
- Ewing, J. F., and Janero, D. R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 232, 243-248.
- Fent, K., and Meier, W. (1994). Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Toxicol.* 27, 224-231.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M. D., and Andreu-Moliner, E. (1999). Thiobencarb toxicity and plasma ACHE inhibition in the European eel. *J. Environ. Sci. Health* 34, 61-73.
- Fore, S. A., Guttman, S. I., Bailer, A. J., Altfater, D. J., and Counts, B. V. (1995a). Exploratory analysis of population genetic assessment as a water quality indicator. I. *Pimephales notatus*. *Ecotox. Environ. Safety* 30, 24-35.
- Fore, S. A., Guttman, S. I., Bailer, A. J., Altfater, D. J., and Counts, B. V. (1995b). Exploratory analysis of population genetic assessment as a water quality indicator. II. *Campostoma anomalum*. *Ecotox. Environ. Safety* 30, 36-46.
- Frank, M. (1960). Geologische Karte von Baden-Württemberg 1:25000, Erläuterungen zu Blatt 7321 Neuhausen a. d. Filder. In "Baden- Württemberg, Geologisches Landesamt Stuttgart". Landesvermessungsamt Baden-Württemberg.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis, pp. 698 pp. ASM Press, Washington, D.C.
- Fuhrmann, P. (2000). EU-Wasserahmenrichtlinie. *Wasser Spezial* 141, 34-38.
- Funari, E., Zoppini, A., Verdina, A., Angelis, G. D., and Vitozzi, L. (1987) Xenobiotic metabolizing enzyme systems in test fish-I. Comparative studies of liver microsomal monooxygenases. *Ecotox. Environ. Safety* 13, 24 - 31
- Gabryllak, T., Piatkowska, M., Leyko, W. and G. Peres, G. (1983). Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 383-385.
- Gebhardt, and Ness. (1990). Fische. In "BLV Naturführer" (BLV, ed.). BLV, München, Zürich, Wien.
- George, S. G. (1995). In vitro toxicology of aquatic pollutants: use of cultured fish cells. In "Toxicology of aquatic pollution" (E. W. Taylor, ed.), pp. 253-265. Society for experimental biology, Cambridge.
- Gerundo, N., Alderman, D. J., Clifton-Hadley, R. S., and Feist, S. W. (1991). Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. *J. Fish Dis.* 104, 521-532.
- Gestel, C. A. M. v., and Brummelen, T. C. v. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- Ghadially, F. (1988). Ultrastructural Pathology of the cell and matrix. Butterworths, London.
- Gill, T. S., Tewari, H., and Pande, J. (1991). *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniis* (Rosy barb). *Biochem. Physiol.* 100 C, 501-505.

- Gillespie, R. B., and Guttman, S. L. (1989). Effects of contaminants on the frequencies of allozymes in populations of the central stoneroller. *Environ. Toxicol. Chem* 8, 309-317.
- Gillespie, R. B., and Guttman, S. L. (1993). Allozyme frequencies analysis of aquatic populations as an indicator of contaminant induced impacts. In "Environmental toxicology risk assessment" (J. W. Gorusch, F. J. Dwyer, C. G. Ingersoll and T. W. LaPoint, eds.). American Society for testing and materials, Philadelphia.
- Gingerich, W. H. (1982a). Hepatic toxicology in fish. In "Aquatic toxicology" (L. J. Weber, ed.), pp. 55-105. Raven Press, New York.
- Giulio, R. T. D., Habig, C., and Gallagher, E. P. (1993). Effects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol* 26, 1-22.
- Goksøyr, A., Beyer, J., Husoy, A., Larsen, H., Westrheim, K., Wilhelmssen, S., and Klungsøyr, J. (1994). Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sorfjorden, Norway). *Aquat. Toxicol.* 29, 21-35.
- Görge, G., and Nagel, R. (1990). Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotox. Environ. Saf.* 20, 246-255.
- Guiney, P. D., Lech, J. J., and Peterson, R. E. (1980). Distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl during early life stage of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl. Pharmacol.* 53, 521-529.
- Guiney, P. D., Smolowitz, R. M., Peterson, R. E., and Stegemann, J. J. (1997). Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction of cytochrome P-450 1A in vascular endothelium with toxicity in early life stages of lake trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 256-273.
- Hawkes, J. W. (1980). The effects of xenobiotics on fish tissues: morphological studies. *Fed. Proc.* 39, 3230-3236.
- Hektonen, H., Bernhoft, A., Skaare, J. U., and Goksøyr, A. (1993) Responses of hepatic xenobiotic metabolising enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cod (*Gadus morhua*) to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD). *Aquat. Toxicol.* 28, 97-106
- Helma, C., Knasmüller, S., and Schulte-Hermann, R. (1994). Die Belastung von Gewässern mit genotoxischen Substanzen: 1. Methoden zur Prüfung der Gentoxizität. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 6, 277-288.
- Hendricks, J. D., Meyers, T. R., Shelton, D. W., Casteel, J. L., and Bailey, G. S. (1985). Hepatocarcinogenicity of benzo[*a*]pyren to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J. Nat. Cancer Inst.* 74, 839-581.
- Hinton, D. E. (1994). Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In "Aquatic Toxicology", pp. 207-239. Lewis Publisher, Boca Raton.
- Hinton, D. E., Klauning, J. E., and Lipsky, M. M. (1978). PCP-induced alterations in teleost liver: a model for environmental disease in fish. *Mar. Fish. Rev.* , 47-50.
- Holcombe, G. W., Benoit, D. A., Leonard, E. N., and McKim, J. M. (1976). Long term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Bd. Can.* 33, 1731-1741.
- Honnen, W., Frahne, D., and Rath, K. (1997a). Auswirkungen von Umweltchemikalien auf Lebewesen in kleinen Fließgewässern. In "Jahrestagung Fachgr. Umweltchem. Ökotox.". Ges. Dt. Chem, Heidelberg.

- Honnen, W., Frahne, D., Rath, K., and Schwinger, A. (1999a). 2. Zwischenbericht zur Phase 2 des Verbundprojektes " Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien. BMBF.
- Honnen, W., Frahne, D., Rath, K., Schwinger, A., and Blum, T. (1998). 1. Zwischenbericht zur Phase 2 der BMBF-Verbundprojektes: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Honnen, W., Frahne, D., Schlegel, T., Rath, K., Hartmann, M., and Blum, T. (1996). 1. Zwischenbericht zum BMBF-Verbundprojektes: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Honnen, W., Frahne, D., Schlegel, T., Rath, K., Hartmann, M., Schwinger, A., and Blum, T. (1997b). 2. Zwischenbericht des BMBF-Verbundprojektes: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Honnen, W., Rath, K., Schwinger, A., and Triebkorn, R. (1999b). Chemical analysis in small streams: results of a four year monitoring (Valimar 1995-1999). *Proceedings of the 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, May 25-29, Leipzig, Germany* .
- Huang, T. L., Obih, O. O., Jaiswal, R., Hartely, W. R., and Thiyagarajah, A. (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the Spotted Gar Fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the Lower Mississippi river basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* , 688-695.
- Huang, T. L., Szekacs, A., Uematsu, T., Kuwano, E., Parkinson, A., and Hammock, B. D. (1993) Hydrolysis of carbonates, thiocarbonates, carbamates, and carboxylic esters of α -naphthol, and p-nitrophenol by human, rat and mouse liver carboxylesterases. *Pharm. Res.* 10, 639-648
- Huang, T. L., Shiotsuki, T., Uematsu, T., Borhan, B., Li, Q., and Hammock, B. D. (1996) Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of mammalian liver microsomal carboxylesterases. *Pharm.Res.* 13, 1493-1498
- Hughes, G. M., Szegletes, T., and Nemcsok, J. (1997). Study of the effects of brief exposure to an organophosphorus insecticide (methidathion) on blood characteristics of carp (*Cyprinus carpio*). *Acta. Biol. Hung.* 48, 157-166.
- Husøy, A.-M., Meyers, M. S., and Goksøyr, A. (1996). Cellular localisation of cytochrome P450 (CYP 1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by cageing in Sorfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol* 36, 53-74.
- Iglesia, F. D. L., Sturgess, J. M., and Feuer, G. (1982). New approaches for the assessment of hepatotoxicity by means of quantitative functional-morphological interrelationships. In "Toxicology of the liver" (G. Plaa and W. R. Hewitt, eds.), pp. 47-102. Raven Press, New York.
- Irons, R. D., and Sawahata, T. (1985). Phenols, catechols and quinones. In "Bioactivation of foreign compounds" (M. W. Anders, ed.), pp. 259-281. Academic Press, Orlando, FL.
- Jensen, F. B. (1995). Physiological effects of nitrite in teleosts and crustaceans. In "Toxicology of aquatic pollution" (E. W. Taylor, ed.), pp. 169-186. Society for experimental biology, Cambridge.

- Jensen, F. B., Andersen, N. A., and Heisler, N. (1987). Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.* 157B, 533-541.
- Jobling, S., and Sumpter, J. P. (1993). Detergents components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 287, 661-72.
- Junqueira, V. B., Simizu, K., Videla, L., DE, S., and Barros, M. (1986). Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicol.* 41, 193-204.
- Kaur, S., and Ali, B. (1983). The effects of phenobarbital, 3-methyl-cholanthrene and benzo(a)pyrene on the hydrolysis of xenobiotics in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3479 - 3480.
- Kelly, T. J., Czuczura, J. M., Sticksel, P. R., Sverdrup, G. M., Koval, P. J., and Hodanbosi, R. F. (1991). Atmospheric and tributary inputs of toxic substances to Lake Erie. *J. Great Lakes Res.* 17, 504-16.
- Knoph, M. B. (1992). Acute toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Comp. Biochem. Physiol. C* 101, 275-282.
- Köhler, A. (1990). Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichytys flesus* L.) caught at differently polluted estuaries. *Aquat. Toxicol.* 16, 271-294.
- Kornberg, A., and Horecker, B. L. (1955). Glucose-6-phosphat dehydrogenase. In "Methods in Enzymology" (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), pp. 323 - 326. Academic press.
- Kristensen, P. (1994). Sensitivity of embryos and larvae in relation to other stages in life cycle of fish: a literature review. (U. Nations, ed.), pp. 155-173. Fishing News Book.
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish (*Brachydanio rerio*) in fisheries research: A literature review. *J. Fish. Biol.* 10, 121-173.
- Labrot, F., Ribera, D., Denis, M. S., and Narbonne, J. F. (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contaminants: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three nonmammalian species. *Biomarker* 1, 21-28.
- Leeuwen, C. J., Grootelaar, E. M. M., and Niebeek, G. (1990a). Fish embryos as teratogenicity screens: A comparison of embryo toxicity between fish and birds. *Ecotox. Environ. Saf.* 20, 42-52.
- Leeuwen, C. J. V., Adema, D. M. M., and Hermens, J. (1990b). Quantitative structure-activity relationship for fish early live stage toxicity. *Aquat. Toxicol.* 16, 321-334.
- Lester, S. M., Braunbeck, T., Teh, S. J., Stegemann, J. J., Miller, M. R., and Hinton, D. R. (1993). Hepatic cellular distribution of cytochrom P-450 1A1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An immunohisto- and cytochemical study. *Cancer Res.* 53, 3700-30706.
- Lindström-Seppä, P., and Oikari, A. (1989). Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotox. Environ. Saf.* 18, 191-203.
- Linton, T. K., Morgan, I. J., S.D. Reid, and Wood, C. M. (1998a). Long-term exposure to small temperature increase and sublethal ammonia in hard water acclimated rainbow trout: does acclimation occur? *Aquat. Toxicol.* 40, 171-191.

- Linton, T. K., Morgan, I. J., Walsh, P. J., and Wood, C. M. (1998b). Chronic exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to stimulated climate warming and sublethal ammonia: a year-long study of their appetite, growth, and metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 576-586.
- Lipsky, M. M., Klauning, J. E., and Hinton, D. E. (1978). Comparison of acute response to PCB in liver of rat and channel catfish. A biochemical and morphological study. *J. Toxicol. Environ. Health* 4, 107-121.
- Livingstone, D. R., Förlin, L., and George, S. R. (1994). Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In "Water quality and stress indicators in marine and freshwater systems" (D. W. Sutcliffe, ed.), pp. 154-171. Freshwater biological association.
- Lock, R. A., Balm, P. H., and Bonga, S. E. W. (1994). Adaptation of freshwater fish to toxicants: Stress mechanism induced by branchial malfunctioning. In "Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish", pp. 124-134. Fishing News Book.
- Luckenbach, T., Triebkorn, R., Müller, E., and Oberemm, A. (1998). Untersuchungen zur Wirkung anthropogener Gewässerbelastungen auf die Entwicklung von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*). In "Ökotoxikologie- Ökosystemare Ansätze und Methoden" (O. u. Marker, ed.), pp. 399-407. Ecomed, Landsberg.
- Lundebye, A.-K., Curtis, T. M., Braven, J., and Depledge, M. H. (1997). Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (ACHE) activity in the shore crab (*Carcinus maenas*). *Aquat. Toxicol.* 40, 23-36.
- Maccubin, A. E. (1994). DNA adduct analysis in fish: Laboratory and field studies. In "Aquatic Toxicology" (D.C. Marlins and G. K. Ostrander, eds.), pp. 267-294. Lewis Publisher, Boca Raton, London, Tokyo.
- Marlins, D. C., McCain, B. B., Brown, D. W., S.L. Chan, Meyers, M. S., Landahl, J. T., Prohaska, P. G., Friedmann, A. J., Rhodes, L. D., Burrows, D. G., Gronlund, W. D., and Hodgins, H. O. (1984). Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Sci. Technol* 18, 705-713.
- Martinez-Lara, L. E., Torbio, F., Lopez-Barea, J., and A.Barcelona, J. (1996). Glutathione-S-Transferase Isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, 215-220.
- Mather-Mihaich, E., and Di Giulio, R.T. (1986). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin, concentrations in channel catfish exposed to DEF and N-butylmercaptan. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C, 427-432.
- Mather-Mihaich, E., and DiGiulio, R. T. (1991). Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to bleach kraft mill effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 391-397.
- McCain, B. B., Pierce, K. V., Wellings, S. R., and Miller, B. S. (1977). Hepatomas in fish from an urban estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 1-2.
- McCarthy, J. F., Shugart, L.R. (1990). Biomarker of environmental contamination. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida.
- McKim, J. M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish predicting long-term toxicity. *J. Fish Res. Board Can.* 34, 1148-1154.
- McKim, J. M. (1985). Early life stage toxicity tests. In "Fundamentals of aquatic toxicology" (G. M. Rand and S. R. Petrocelli, eds.), pp. 58-95. Hemisphere Publishing, Washington.
- McKim, J. M., Holcombe, G. W., Olsen, G. F., and Hunt, E. P. (1976). Long term effects of methylmercury chloride on three generations of brook trout: toxicity accumulation, distribution and elimination. *J. Fish Res. Bd. Can.* 33, 2726-2736.

- Mentlein, R., M. Suttorp, and Heymann, E. (1984) Specificity of purified monoacylglycerol lipase, palmitoyl-CoA hydrolase, palmitoyl-carnitine hydrolase, and nonspecific carboxylesterase from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 230 - 246
- Mentlein, R., Ronai, A., Robbi, M., Heymann, E., and Deimling, O. v. (1987) Genetic identification of rat liver carboxylesterases isolated in different laboratories. *Biochim. Biophys. Acta* 913, 27-38
- Mitz, S. V., and Giesy, J. P. (1985). Sewage effluent biomonitoring. I. Survival, growth, and histopathological effects in channel catfish. *Ecotox. Environ. Saf.* 10, 22-39.
- Mommsen, T. P., French, C. J., and Hochachka, P. W. (1981). Sites and patterns of protein and amino acid utilization during sprawn migration of salmo. *Can. J. Zool.* 58, 1785 - 1799.
- Moore, M. (1985). Cellular responses to pollutants. *Mar. Poll. Bull.* 16, 134-139.
- Moss, D. W. (1983). Acid phosphatases, orthophosphoric monoester phosphohydrolase. In "Methods in enzymatic analyses III" (H. U. Bergmeyer, ed.), pp. 92-106. Verlag Chemie, Weinheim.
- Nagata, C., Kodama, M., Ioki, Y., and Kimura, T. (1982). Free radicals produced from chemical carcinogens and their significance in carcinogenesis. In "Free radicals and cancer" (R. A. Floyd, ed.), pp. 1-62. M. Dekker, New York.
- Nagel, R. (1994). Complete life cycle test with zebrafish - a critical assessment of the results. In "Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish" (U. Nations, ed.), pp. 188-195. Fishing News Book.
- Neskovic, N. K., Elezovic, I., Karan, V., Polesiksic, V., and Budimir, M. (1993). Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotox. Environ. Safety* 25, 173-182.
- Norberg-King, T. J. (1989). An evaluation of fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1075-1089.
- Nott, J. A., and Moore, M. N. (1987). Effects of polyaromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmatic reticulum. *Histochem. J.* 19, 357-368.
- Nunn, J. W., Livingstone, D. R., and Chipman, J. K. (1995). Effects of genetic toxicants in aquatic organisms. In "Toxicology in aquatic pollution" (E. W. Tylor, ed.), pp. 225-251. Society of experimental biology, Cambridge.
- Ochoa, S. (1955). Malic enzyme. In "Methods in enzymology", pp. 729 - 753.
- Oikari, A., Holmbom, B., Anäs, E., Milunpalo, M., Kruzynski, G., and Castren, 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*). *Aquat. Toxicol.* 6, 219 - 239.
- Oikari, A., and Jiminez, B. (1992). Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activity in sunfish liver by β -naphthoflavone and benz[a]pyrene. *Ecotox. Environ. Saf.* 23, 89-102.
- Oost, R. V. d., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., and Vermeulen, N. P. E. (1996). Bio-monitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): Biomarkers: Pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxic.* 36 (3-4), 189-222.
- Otto, D. M., Lindström-Seppä, P., and Sen, C. K. (1994). Cytochrome P450 enzymes and oxidant-mediated responses in rainbow trout exposed to contaminated sediments. *Ecotox. Environ. Safety* 27, 265-280.
- Para, G., and Yufera, M. (1999). Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* and Senegal sole *Solea senegalensis*). *Aquacult. Res.* 30, 857-863.

- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., and Vernet, G. (1998). Hepatic disorders induced by a sublethal concentration of procymidone (fungicide dicarboximide) in *Brachydanio rerio* (Teleostei: Cyprinidae): Histocytological approach. *Bull. Franc. Pech. Pisc.* 350-351, 547-562.
- Pavlov, D. D., Chuiko, G. M., Gerassimov, Y. V., and Tonkopi, V. D. (1992). Feeding behaviour and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama*) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 563-568.
- Pawert, M., Müller, E., and Triebkorn, R. (1998). Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue Cell* 30, 617-626.
- Peakall, D. (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Personen, M., Cellander, M., Förlin, L., and Andresson, T. (1987). Comparison of xenobiotic biotransformation enzymes in kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91, 75-84.
- Person-LeRuyet, J., and Boeuf, G. (1998). Ammonia. a potential toxic to fish: Applications to turbot. *Bull. Franc. Pec. Pisc.* 350-51, 393-412.
- Person-LeRuyet, J., Delbard, C., Chartois, H., and Delliou, H. L. (1997a). Toxicity of ammonia to turbot juveniles: I. effects oil survival, growth and food utilisation. *Aquat. Liv. Res.* 10, 307-314.
- Person-LeRuyet, J., Galland, R., LeRoux, A., and Chartois, H. (1997b). Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquacult.* 154, 155-171.
- Peter, H., and Heger, W. (1999). Long-term effects of chemicals in aquatic organisms. In "Ecotoxicology" (G. Schüürmann and B. Markert, eds.), pp. 571-586. J. Wiley & Sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag.
- Plaa, G. A. (1986). Toxic responses in liver. In "Casarett and Doull's Toxicology- The basic science of poison" (C. D. Klaassen, M. O. Amdur and J. Doull, eds.). McMillan, New York.
- Randall, D. J., Brauner, C. J., Thurston, R. V., and Neuman, J. F. (1995). Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. In "Toxicology of aquatic pollution" (E. W. Taylor, ed.), pp. 1-16. Society for experimental biology, Cambridge.
- Reddy, M. P., Philip, H. G., and Bashamohideen, M. (1991). Fenvalerate induced biochemical changes in the selected tissue of freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Biochem. Intern.* 23, 1087-1095.
- Regoli, F., Nigro, M., and Orando, E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). .
- Reid, S. D., Linton, T. K., Dockray, J. J., D.G., Donald, M., and Wood, C. M. (1998). Effects of chronic sublethal ammonia an a stimulated summer global warming scenario: protein synthesis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci* 55, 1534-1544.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17, 208-212.
- Richardson, J. (1997). Acute ammonia toxicity for eight New Zealand indigenous freshwater species. *New Zeal. J. Mar. Fre. Res.* 31, 185-190.
- Robbi, M., and Beaufay, H. (1983). Purification and characterisation of various esterases from rat liver. *Euro. J. Biochem.* 137, 293 - 301.
- Rojik, I., Nemcsok, J., and Boross, L. (1983). Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biol. Hung.* 34, 81-92.

- Rudolph, P., and Boje, R. (1986). Ökotoxikologie. Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, pp. 1-166. Ecomed, Landsberg.
- Sachs, L. (1974). Angewandte Statistik, pp. 545 pp. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Sancho, E., Ceron, J. J., and Ferrando, M. D. (2000). Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotox. Environ. Chem.* 46, 81-86.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., and Andreu, E. (1997a). Response and recovery of acetylcholinesterase activity in the European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to fenitrothion. *J. Environ. Sci. Health* 32, 915.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., and Andreu, E. (1997b). Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to fenitrothion. *Ecotox. Environ. Saf.* 38, 205-209.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., and Andreu, E. (1998). *In vivo* inhibition of ACHE activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to technical grade fenitrothion. *Comp. Biochem. Physiol.* 120, 389-395.
- Sastry, K. V., and Subhadra, K. (1985). *In vivo* effects of cadmium on some enzyme activities in tissues of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*). *Environ. Res.* 36, 32-45.
- Schmidt, H., Bernet, D., Wahli, T., Meier, W., and Burkhardt-Holm, P. (1999). Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *J. Fish. Biol.* 54, 585-596.
- Schnurstein, A. (2000). Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring. Dissertation. In "Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg".
- Schoor, W. P., and Couch, J. A. (1979). Correlation of mixed-function oxidase activity with ultrastructural changes in the liver of a marine fish. *Cancer Biochem. Biophys.* 4, 95-103.
- Schramm, M., Müller, E., Eckwert, H., Köhler, H.-R., Strmac, M., Braunbeck, T., and Triebskorn, R. (1996). Ultrastructural and biochemical changes of fish hepatocytes as biomarkers for small stream pollution. *Cell. Biol. Toxicol.* 3, 22-40
- Schramm, M., Müller, E., and Triebskorn, R. (1998) Brown trout (*Salmo trutta f. fario*) liver ultrastructure as biomarker of small stream pollution. *Biomarkers* 3, 93-108
- Schwaiger, J. (1998). 1 Zwischenbericht zur Phase II.: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Schwaiger, J., Bucher, F., Ferling, H., Kalbfus, W., and Negele, R. (1992). A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis-(tris-n-butyltin)oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 1992, 31-48.
- Scott, E. M., and Harrington, J. P. (1990). Comparative studies of catalase and superoxide dismutase activity within salmon fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 95 B, 91 - 93.
- Segner, H., and Braunbeck, T. (1998). Cellular response profile to chemical stress. In "Ecotoxicology" (G. Schüürmann and B. Markert, eds.), pp. 521-569. J. Wiley & Sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag.
- Shaw, J. R., Wood, C. M., Birge, W. J., and Hogstrand, C. (1998). Toxicity of silver to the marine teleost (*Oligocottus maculosus*): Effects of salinity and ammonia. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 594-600.

- Soderberg, R. W. (1985). Histopathology of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to diurnally fluctuating unionized ammonia levels in static water-ponds. *J. Fish.Dis.* 8, 57-64.
- Soldano, S., Gramenzi, F., Cirianni, M., and Vittozzi, L. (1992) Xenobiotic-metabolising enzyme systems in test fish - V. Comparative studies of liver microsomal and cytosolic hydrolases. *Comp. Biochem. Physiol* 101 C, 117-123
- Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petanen, T., Ristola, T., and Oikari, A. (1995). Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquat. Toxicol.* 31 (4), 329-345.
- Spurr, A. R. (1969). A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26, 31-43.
- Srere, P. (1963). Citryl-CoA and the citrate condensing enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 693 - 696.
- Stein, J. E., Reichert, W. L., M. Nishimoto, and Varanasi, U. (1990). Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for an xenobiotic chemical etiology II: biochemical studies. *Sci. Total. Environ.* 94, 51-69.
- Stephensen, E., Svarvarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolffonsson-Erci, M., and Förlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the Southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431-442.
- Streit, B. (1992). Lexikon Ökotoxikologie. VCH, Weinheim.
- Strmac, M. (2000). Dissertation. Zoologie I, Universität Heidelberg
- Strmac, M., and Braunbeck, T. (1999a). Assessment of sediment toxicity to early life stages of fish: Effects of sediment from differently polluted small rivers on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. .
- Strmac, M., and Braunbeck, T. (1999b). Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems. *Tox. in vitro.* .
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., and Liess, M. (2000a). Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* in press.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., and M. Liess. (2000b). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1607-1615.
- Sumpter, J. P., Jobling, S., and Tyler, C. R. (1995). Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. In "Toxicology of aquatic pollution" (E. W. Tylor, ed.), pp. 205-224. Society for experimental biology, Cambridge.
- Szabó, A., Nemcsók, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kása, P., and Hieu, L. H. (1992). The effect of pesticides on Carp (*Cyprinus carpio*, L). Acetylcholinesterase and its biochemical characterisation. *Ecotox. Environ. Saft.* 23, 39-45.
- Thurston, R. V., Russo, R. C., Leudtke, R. J., Smith, C. E., and Meyer, E. L. (1984). Chronic toxicity of ammonia in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113, 56-73.
- Thompson, H. M., and Walker, C. H. (1994) Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. In *Nondestructive biomarkers in vertebrates* (Fossi, C., and Leonzio, C., eds) pp. 37 - 62, Lewis Publisher, Boca Raton, Florida

- Triebskorn, R., Köhler, H., Honnen, W., Schramm, M., Adam, S., and Müller, E. (1997a). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosys. Stress Recovery* 6, 57 - 73.
- Triebskorn, R., Schramm, M., Pawert, M., Adam, S., and Müller, E. (1996a). 1 Zwischenbericht zur Phase I des BMBF-Verbundprojekt: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien. .
- Triebskorn, R., Schramm, M., Pawert, M., Adam, S., and Müller, E. (1996b). 1. Zwischenbericht zum BMBF-Verbundprojektes: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests und Biomarkerstudien zur Bewertung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Triebskorn, R., Schramm, M., Pawert, M., Adam, S., and Müller, E. (1997b). 2 Zwischenbericht zur Phase I: Validierung und Einsatz biologischer, chemischer und mathematischer Tests zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien.
- Vandekar, M. (1980). Minimising occupational exposure to pesticides: Cholinesterase determination and organophosphorus poisoning. *Res. Rev.* 75, 67 - 80.
- Vedel, N. E., Korsgaard, B., and Jensen, F. B. (1998). Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations. *Aquat. Toxicol.* 41, 325-342.
- Vigano, L., Arillo, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., and Melodia, F. (1994). Time course of xenobiotic biotransformation enzyme activities of rainbow trout caged in river Po. *Scien. Total. Environ.* 151, 37-46.
- Whale, G. F., Sheahan, D. A., and Kirby, M. F. (1994). Assessment of the value of including recovery periods in chronic toxicity test guidelines for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In "Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish" (Food and agriculture organisation of the United Nations, ed.), pp. 175-187. Fishing News Book.
- White, P. A., Rasmussen, J. B., and Blaise, C. (1998). Genotoxic substances in the St. Lawrence System I: Extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Sguenay rivers, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 304-316.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., and Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175-82.
- Wilson, R. W., Bergmann, H. L., and Wood, C. M. (1994a). Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminium in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).2: Gill morphology, swimming performance, and aerobic scope. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 536-544.
- Wilson, R. W., Bergmann, H. L., and Wood, C. M. (1994b). Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminium in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Acclimation, specificity, resting physiology, feeding, and growth. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 527-535.
- Winston, G. W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. a mini review. *Comp. Biochem. Physiol.* C100, 173-176.
- Winston, G. W., and DiGiulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Woltering, D. M. (1984). The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a critical review. *Aquat. Toxicol* 5, 1-21.

- Zahn, T., and Braunbeck, T. (1993) Isolated fish hepatocytes as a tool in aquatic toxicology: sublethal effects of dinitro-*o*-cresol and 2,4 dichlorophenol. In *Science of the Total Environment. Supplement* pp. 721-734, Elseviere Science Publishers B.V., Amsterdam
- Zahn, T., and Braunbeck, T. (1995). Cytotoxic effects of sublethal concentrations of malachite green in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxic. in Vitro* 5, 729-741.
- Zahn, T., Hauck, C., Holzschuh, J., and Braunbeck, T. (1995). Acute and sublethal toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A novel approach to environmental risk assessment for chemicals and chemical mixtures. *Zbl. Hyg.* 196, 455-479.
- Zahn, T., Arnold, H., and Braunbeck, T. (1996). Cytological and biochemical response of R1 cells and isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to subacute *In vivo* exposure to disulfoton. *Exp. Toxic. Pathol.* 48, 47-64.

15. Anhang

A-Tab. 1 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 8 bzw. 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/mg Protein

Oktober 95	Labor (13 Wo)	Krähenbach	Körsch	Labor (8 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	100 ± 31,1 n = 16	135 ± 60,4 n = 11	159 ± 94,7 * n = 13	152 ± 49,8 n = 15	163 ± 64,2 n = 12	109 ± 29,7 ** n = 13
Cytochrom c-Oxidase	15,9 ± 3,34 n = 17	20,0 ± 10,5 n = 17	27,7 ± 13,9 ** n = 16	24,9 ± 9,96 n = 17	25,8 ± 10,3 n = 17	20,3 ± 7,92 n = 16
Leber:						
Cytochrom c-Oxidase	35,3 ± 11,8 n = 7	24,6 ± 2,25 n = 4	23,1 ± 10,3 n = 7	44,4 ± 14,9 n = 7	26,3 ± 6,27 * n = 7	37,0 ± 7,64 n = 6
Succinatdehydrogenase	20,0 ± 5,09 n = 7	19,3 ± 5,77 n = 6	15,9 ± 4,61 n = 5	23,9 ± 7,51 n = 7	17,3 ± 4,50 n = 6	21,2 ± 3,60 n = 6
Citratsynthase	2,60 ± 0,59 n = 7	2,71 ± 1,65 n = 6	1,26 ± 0,41 ** n = 4	4,33 ± 2,16 n = 7	2,32 ± 0,50 n = 6	2,23 ± 0,15 n = 6
Saure Phosphatase	5848 ± 2048 n = 7	7532 ± 1481 n = 4	7979 ± 2083 n = 5	8076 ± 1966 n = 6	6616 ± 1534 n = 6	7897 ± 1361 n = 6
Uricase	2,61 ± 0,54 n = 7	5,46 ± 0,85 ** n = 5	0,97 ± 0,31 ** n = 5	5,00 ± 2,17 n = 7	4,08 ± 1,20 n = 6	1,12 ± 0,49 *** n = 6
Katalase	41,7 ± 4,08 n = 7	42,1 ± 5,25 n = 6	36,5 ± 2,29 * n = 5	52,2 ± 9,48 n = 7	35,3 ± 7,98 ** n = 6	38,2 ± 11,8 * n = 6
Alaninaminotransferase	484 ± 170 n = 5	785 ± 341 n = 5	433 ± 150 n = 6	467 ± 259 n = 6	823 ± 194* n = 5	838 ± 253 * n = 6
Phosphofruktokinase	20,9 ± 13,0 n = 6	16,2 ± 2,57 n = 5	14,8 ± 2,27 n = 6	15,7 ± 5,12 n = 7	16,5 ± 6,09 n = 5	17,5 ± 7,53 n = 6
Malatenzym	1,05 ± 0,54 n = 7	0,86 ± 0,33 n = 3	1,23 ± 0,52 n = 6	0,61 ± 0,24 n = 5	1,34 ± 0,60 * n = 5	0,75 ± 0,34 n = 5
Esterase	184 ± 89,0 n = 7	161 ± 84,3 n = 5	58,5 ± 12,2 *** n = 6	208 ± 64,9 n = 6	128 ± 73,0 n = 4	38,3 ± 14,2 *** n = 6

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung für n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001.

A-Tab. 2 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 8 bzw. 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/g Organ

Oktober 95	Labor (13 Wo)	Krähenbach	Körsch	Labor (8 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	51433 ± 19463 n = 12	57274 ± 14225 n = 16	51879 ± 26845 n = 18	53660 ± 7303 n = 22	49967 ± 17677 n = 19	51123 ± 14568 n = 20
Cytochrom c-Oxidase	8345 ± 463 n = 10	7504 ± 1074* n = 17	9149 ± 708* n = 18	8590 ± 932 n = 18	8268 ± 881 n = 18	8679 ± 768 n = 18
Leber:						
Cytochrom c-Oxidase	2204 ± 392 n = 7	1462 ± 57,7 ** n = 6	2141 ± 333 n = 5	2005 ± 278 n = 7	1946 ± 336 n = 6	2188 ± 530 n = 6
Succinatdehydrogenase	1009 ± 142 n = 7	1338 ± 384 n = 6	1131 ± 263 n = 5	1016 ± 184 n = 7	1199 ± 269 n = 6	1557 ± 307 ** n = 6
Citratsynthase	132 ± 24,6 n = 7	179 ± 89,6 n = 6	92,5 ± 28,4 n = 4	176 ± 64,7 n = 7	167 ± 57,1 n = 6	169 ± 47,5 n = 6
Saure Phosphatase	290,7 ± 62,8 n = 7	489,2 ± 34,0 ** n = 4	566,6 ± 110,2 ** n = 5	363,3 ± 61,8 n = 7	463,3 ± 124,6 n = 6	576,5 ± 97,2** n = 6
Uricase	133 ± 21,3 n = 7	341 ± 35,3 ** n = 6	69,0 ± 18,9 ** n = 5	210 ± 59,8 n = 7	279 ± 83,3 n = 6	80,8 ± 26,9 ** n = 6
Katalase	2161 ± 385 n = 7	2918 ± 347 ** n = 6	2644 ± 409 n = 5	2336 ± 799 n = 7	2559 ± 942 n = 6	2954 ± 1182 n = 6
Alaninaminotransferase	102740 ± 43510 n = 5	257330 ± 92990* n = 5	168220 ± 70350 n = 6	123150 ± 55390 n = 6	289570 ± 64930 ** n = 5	383190 ± 153020 ** n = 6
Phosphofruktokinase	3600 ± 845 n = 7	5460 ± 594 ** n = 5	5680 ± 995 ** n = 6	5390 ± 2240 n = 6	5570 ± 2100 n = 5	7550 ± 1460 n = 6
Malatenzym	3300 ± 2490 n = 7	3280 ± 1290 n = 3	4900 ± 2230 n = 5	2650 ± 2510 n = 5	4300 ± 1530 ** n = 5	4020 ± 1280 ** n = 6
Esterase	43550 ± 20590 n = 7	45420 ± 23080 n = 5	21670 ± 3940 * n = 4	60800 ± 27810 n = 5	41250 ± 18510 n = 5	17210 ± 6560 ** n = 5

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/g Organ ± Standardabweichung für n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001.

A-Tab. 3 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Oktober 95	Labor (13 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	112 ± 36,4 n = 8	127 ± 74,3 n = 9	94,6 ± 17,6 n = 9
Cytochrom c-Oxidase	2,63 ± 0,69 n = 10	3,42 ± 2,00 n = 10	2,37 ± 0,63 n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	8,55 ± 2,98 n = 10	8,35 ± 2,86 n = 9	5,37 ± 2,35 *
Succinatdehydrogenase	10,4 ± 4,21 n = 10	13,5 ± 4,70 n = 9	14,7 ± 6,33 n = 10
S aure Phosphatase	2939 ± 1731 n = 10	2628 ± 1235 n = 10	2267 ± 911 n = 10
Uricase	11,2 ± 4,31 n = 10	16,5 ± 3,94 * n = 10	12,7 ± 5,56 n = 9
Katalase	24,8 ± 5,25 n = 10	24,0 ± 2,75 n = 10	28,2 ± 5,81 n = 9
Alaninaminotransferase	421 ± 198 n = 9	460 ± 184 n = 10	311 ± 149 n = 9
Glucose-6-P-Dehydrogenase	n. b.	n. b.	n. b.
Phosphofruktokinase	17,1 ± 11,0 n = 9	34,0 ± 25,3 n = 9	26,7 ± 10,4 n = 10
Malatenzym	n. b.	n. b.	n. b.
Esterase	206 ± 80,9 n = 10	248 ± 148 n = 10	239 ± 98,4 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 4 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / g Organ

Oktober 95	Labor (13 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	48714 ± 6005 n = 9	45639 ± 7312 n = 10	45646 ± 4371 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	1197 ± 108 n = 10	1228 ± 127 n = 10	1155 ± 155 n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	517 ± 179 n = 10	582 ± 299 n = 9	544 ± 252 n = 10
Succinatdehydrogenase	592 ± 174 n = 10	924 ± 421 n = 9	1256 ± 490 ** n = 10
Saure Phosphatase	164598 ± 61106 n = 10	172708 ± 82239 n = 10	193424 ± 81273 n = 10
Uricase	804 ± 417 n = 9	751 ± 245 n = 7	1121 ± 513 n = 9
Katalase	1664 ± 807 n = 10	1588 ± 400 n = 9	2270 ± 791 n = 9
Alaninaminotransferase	147260 ± 71950 n = 10	155320 ± 33650 n = 10	142090 ± 49300 n = 9
Glucose-6-P-Dehydrogenase	n. b.	n. b.	n. b.
Phosphofruktokinase	820 ± 590 n = 9	1040 ± 485 n = 9	1258 ± 503 n = 10
Malatenzym	n. b.	n. b.	n. b.
Esterase	59560 ± 17960 n = 10	75050 ± 13160 n = 10	112520 ± 51360 * n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 5 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 16 bzw. 21 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/mg Protein

Dezember '95	Labor (21 Wo)	Krähenbach	Körsch	Labor (16 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	95,5 ± 31,00 n = 28	66,6 ± 13,5 *** n = 22	84,7 ± 15,8 n = 27	84,6 ± 25,5 n = 10	81,6 ± 17,0 n = 11	68,0 ± 21,4 *** n = 11
Cytochrom c-Oxidase	3,90 ± 1,82 n = 28	3,48 ± 1,20 n = 23	3,838 ± 1,13 n = 28	4,59 ± 1,16 n = 11	3,92 ± 1,11 n = 21	2,45 ± 1,18 *** n = 13
Leber:						
Cytochrom c-Oxidase	13,1 ± 2,65 n = 13	10,0 ± 3,75* n = 12	12,9 ± 2,46 n = 16	22,3 ± 3,38 n = 6	12,9 ± 5,15 ** n = 10	19,3 ± 4,64 n = 8
Succinatdehydrogenase	6,60 ± 2,30 n = 13	4,79 ± 1,00 * n = 12	11,4 ± 2,51 *** n = 16	8,67 ± 3,67 n = 6	5,53 ± 1,53 n = 11	13,5 ± 5,24 * n = 8
Citratsynthase	0,77 ± 0,17 n = 12	0,83 ± 0,41 n = 12	0,99 ± 0,32 * n = 16	1,31 ± 0,51 n = 6	1,05 ± 0,37 n = 9	1,21 ± 0,45 n = 7
Saure Phosphatase	928 ± 378 n = 12	859 ± 160 n = 12	879 ± 153 n = 16	2085 ± 818 n = 6	1385 ± 896 n = 10	1094 ± 392 * n = 8
Uricase	4,11 ± 1,19 n = 11	1,69 ± 1,02 *** n = 12	3,53 ± 1,17 n = 14	6,27 ± 1,16 n = 6	2,00 ± 0,56 ** n = 10	3,63 ± 1,94 * n = 8
Katalase	17,0 ± 4,30 n = 13	15,4 ± 4,99 n = 10	17,7 ± 2,58 n = 15	25,4 ± 1,49 n = 6	19,0 ± 3,38 ** n = 8	21,2 ± 6,00 n = 7
Alaninaminotransferase	383 ± 119 n = 13	351 ± 75,7 n = 12	197 ± 106 *** n = 16	465 ± 183 n = 6	372 ± 118 n = 10	203 ± 65,5 ** n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	43,6 ± 16,7 n = 13	78,9 ± 33,8 ** n = 12	46,2 ± 26,11 n = 16	53,4 ± 30,2 n = 6	111 ± 63,4 * n = 10	45,8 ± 9,96 n = 5
Phosphofruktokinase	8,21 ± 3,19 n = 14	7,47 ± 4,03 n = 11	8,68 ± 1,97 n = 16	8,16 ± 2,1 n = 5	5,48 ± 1,12 * n = 9	10,8 ± 2,74 n = 8
Malatenzym	20,1 ± 6,04 n = 13	21,8 ± 8,11 n = 12	18,0 ± 5,48 n = 16	22,3 ± 4,02 n = 6	22,3 ± 6,61 n = 9	21,0 ± 5,87 n = 8
Hexokinase	2,23 ± 0,64 n = 12	1,63 ± 0,70 * n = 12	1,72 ± 0,40 n = 15	1,90 ± 0,49 n = 5	1,31 ± 0,57 * n = 9	2,25 ± 0,58 n = 8
Esterase	362 ± 139 n = 13	277 ± 84,0 n = 12	64,7 ± 9,10 *** n = 14	260 ± 116 n = 6	336 ± 122 n = 10	46,2 ± 11,7 ** n = 7

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung für n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001.

A-Tab. 6 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 16 bzw. 21 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/g Organ

Dezember '95	Labor (12 Wo)	Krähenbach	Körsch	Labor (16 Wo)	Aich	Körsch
Gehirn:						
Acetylcholinesterase	90490 ± 16533 n = 28	89768 ± 16481 n = 20	71616 ± 14169*** n = 28	67000 ± 9910 n = 11	88756 ± 17485** n = 21	69265 ± 11847 n = 13
Cytochrom c-Oxidase	3565 ± 981 n = 29	4262 ± 749** n = 20	3152 ± 778 n = 28	3657 ± 603 n = 11	4612 ± 914** n = 19	2471 ± 972* n = 13
Leber:						
Cytochrom c-Oxidase	1425 ± 372 n = 15	1019 ± 434 * n = 12	1332 ± 336 n = 16	1781 ± 329 n = 6	1206 ± 557 n = 10	1596 ± 174 n = 8
Succinatdehydrogenase	687 ± 119 n = 15	473 ± 79 *** n = 12	1048 ± 217*** n = 16	661 ± 160 n = 6	542 ± 120 n = 10	1093 ± 239 ** n = 8
Citratsynthase	26,2 ± 12,6 n = 12	77,7 ± 16,2 *** n = 12	101 ± 28,3 *** n = 16	101 ± 36,0 n = 7	90,9 ± 47,5 n = 10	104 ± 41,7 n = 7
Saure Phosphatase	95454 ± 21173 n = 12	87451 ± 25660 n = 12	86857 ± 16190 n = 12	162543 ± 56984 n = 6	117326 ± 59275 n = 8	89221 ± 19818 ** n = 8
Uricase	424 ± 53,3 n = 10	163 ± 96,4 *** n = 11	362 ± 108 n = 13	493 ± 52,5 n = 6	181 ± 57,6 ** n = 10	289 ± 112 ** n = 7
Katalase	1811 ± 201 n = 12	1519 ± 193 ** n = 10	1805 ± 270 n = 16	2031 ± 274 n = 6	1887 ± 559 n = 9	1766 ± 341 * n = 8
Alaninaminotransferase	126530 ± 34180 n = 15	101280 ± 16080 * n = 12	86220 ± 28780 ** n = 13	168650 ± 54240 n = 6	145470 ± 46530 n = 10	83210 ± 32970 ** n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	13530 ± 4250 n = 14	20590 ± 7270 * n = 11	21630 ± 8870 ** n = 15	19070 ± 8320 n = 6	40500 ± 14590 ** n = 10	21330 ± 6590 n = 5
Phosphofruktokinase	2490 ± 783 n = 15	1650 ± 315 *** n = 12	4010 ± 787 *** n = 16	2960 ± 457 n = 5	2570 ± 1390 n = 10	4590 ± 809 ** n = 8
Malatenzym	6460 ± 1180 n = 14	6400 ± 2370 n = 12	8330 ± 2180 * n = 16	8200 ± 776 n = 6	7470 ± 3280 n = 10	8860 ± 1700 n = 8
Hexokinase	542 ± 125 n = 15	489 ± 248 n = 15	810 ± 140 *** n = 12	642 ± 292 n = 6	478 ± 86,6 n = 9	959 ± 222 n = 8
Esterase	1131600 ± 2928 n = 13	82560 ± 31840 * n = 12	30460 ± 5610 *** n = 14	105870 ± 24120 n = 5	125660 ± 37600 n = 10	21040 ± 5750 ** n = 7

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung für n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001.

A-Tab. 7 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 15 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Dezember 95	Labor (15 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	136 ± 23,8 n = 12	104 ± 20,0 ** n = 12	117 ± 9,16 n = 12
Cytochrom c-Oxidase	3,41 ± 0,67 n = 13	3,2 ± 0,95 n = 12	1,20 ± 0,16 *** n = 14
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	22,3 ± 2,68 n = 13	21,3 ± 3,43 n = 10	22,4 ± 4,37 n = 10
Succinatdehydrogenase	9,8 ± 2,05 n = 13	12,9 ± 2,10 ** n = 10	13,3 ± 3,51 * n = 10
Saure Phosphatase	3713 ± 909 n = 13	4758 ± 1065 n = 9	4475 ± 757 n = 10
Uricase	6,01 ± 3,03 n = 11	6,76 ± 1,60 n = 10	5,51 ± 2,45 n = 9
Katalase	19,1 ± 3,70 n = 10	19,1 ± 4,07 n = 10	18,2 ± 2,96 n = 10
Alaninaminotransferase	358 ± 169 n = 13	386 ± 112 n = 10	274 ± 122 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	154 ± 37,1 n = 12	140 ± 27,02 n = 10	165 ± 40,5 n = 10
Phosphofruktokinase	11,9 ± 3,38 n = 13	16,6 ± 3,59 ** n = 10	14,7 ± 3,52 * n = 10
Malatenzym	13,3 ± 4,90 n = 10	10,4 ± 2,18 n = 10	10,8 ± 2,50 n = 10
Esterase	101 ± 37,7 n = 13	101 ± 19,9 n = 10	77,7 ± 24,6 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 8 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 15 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / g Organ

Dezember 95	Labor (15 Wo)	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	66929 ± 6505 n = 13	60821 ± 11380 n = 12	62784 ± 6305 n = 11
Cytochrom c-Oxidase	1562 ± 471 n = 14	1846 ± 263 n = 12	651 ± 203*** n = 14
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	1894 ± 546 n = 11	1476 ± 303 n = 10	1722 ± 357 n = 10
Succinatdehydrogenase	840 ± 298 n = 13	895 ± 174 n = 10	1024 ± 264 n = 10
Saure Phosphatase	321665 ± 138418 n = 13	325243 ± 75278 n = 9	347103 ± 74570 n = 10
Uricase	504 ± 229 n = 11	464 ± 109 n = 10	449 ± 247 n = 9
Katalase	1640 ± 569 n = 11	1340 ± 391 n = 10	1411 ± 300 n = 10
Alaninaminotransferase	121660 ± 56740 n = 11	148920 ± 58990 n = 10	106860 ± 43030 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	5905 ± 1074 n = 12	5230 ± 998 n = 11	6475 ± 1184 n = 10
Phosphofruktokinase	4710 ± 1140 n = 13	6140 ± 909 * n = 10	5890 ± 1780 n = 10
Malatenzym	5220 ± 1700 n = 10	3920 ± 853 * n = 10	4170 ± 790 n = 9
Esterase	34130 ± 13160 n = 13	39460 ± 7570 n = 9	30390 ± 8280 n = 9

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 9 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 12 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Juli 96	Labor	Aich	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	63,3 ± 2,33 n = 6	67,9 ± 9,66 n = 7	74,3 ± 18,4* n = 11
Cytochrom c-Oxidase	1,99 ± 0,13 n = 6	1,99 ± 0,40 n = 6	2,11 ± 0,49 n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	2,60 ± 1,15 n = 7	1,83 ± 0,81 n = 8	3,36 ± 1,72 n = 11
Succinatdehydrogenase	7,12 ± 1,27 n = 6	3,37 ± 1,90*** n = 8	6,61 ± 1,73 n = 10
Citratsynthase	4,04 ± 1,79 n = 7	3,21 ± 1,49 n = 8	3,08 ± 1,19 n = 11
Saure Phosphatase	1486 ± 1320 n = 7	772 ± 227* n = 8	2411 ± 2009 n = 11
Uricase	10,4 ± 1,81 n = 6	6,03 ± 1,46*** n = 8	4,60 ± 1,81*** n = 11
Katalase	53,4 ± 16,1 n = 7	36,7 ± 15,8** n = 8	27,6 ± 15,0*** n = 11
Alaninaminotransferase	369 ± 183 n = 7	391 ± 242 n = 5	357 ± 195 n = 11
Glucose-6-P-Dehydrogenase	194 ± 76,3 n = 7	386 ± 139** n = 8	434 ± 154*** n = 10
Phosphofruktokinase	11,9 ± 5,82 n = 7	44,0 ± 30,3** n = 5	34,6 ± 15,2*** n = 11
Malatenzym	101 ± 39,2 n = 7	117 ± 24,5 n = 5	122 ± 48,4 n = 11
Hexokinase	5,87 ± 2,50 n = 7	17,8 ± 9,00** n = 5	21,4 ± 5,68*** n = 11
Esterase	276 ± 80,5 n = 7	295 ± 84,2 n = 5	325 ± 79,3 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Die Signifikanz der Werte zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001

A-Tab. 10 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 12 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/ g Organ

Juli 96	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	62369 ± 1663 n = 7	66438 ± 6017 n = 8	61920 ± 7172 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	1950 ± 199 n = 7	2114 ± 366 n = 8	1791 ± 254 n = 11
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	49,8 ± 15,5 n = 6	53,2 ± 27,9 n = 6	81,2 ± 45,2* n = 5
Succinatdehydrogenase	167 ± 31,2 n = 6	101 ± 25,7*** n = 6	170 ± 41,2 n = 6
Citratsynthase	83,4 ± 16,8 n = 7	84,2 ± 22,9 n = 8	11,3 ± 6,97*** n = 11
Saure Phosphatase	25367 ± 10828 n = 7	21483 ± 5240 n = 8	34524 ± 8538 n = 11
Uricase	230 ± 45,4 n = 6	172 ± 47,3* n = 8	107 ± 41,9*** n = 8
Katalase	1183 ± 372 n = 6	981 ± 186 n = 6	623 ± 142 n = 6
Alaninaminotransferase	53466 ± 23029 n = 7	39657 ± 10628 n = 5	45526 ± 16203 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	70936 ± 21667 n = 6	80068 ± 12982 n = 6	77867 ± 40075 n = 6
Phosphofruktokinase	4031 ± 3172 n = 7	3737 ± 1136 n = 7	4384 ± 2598 n = 11
Malatenzym	10251 ± 3167 n = 6	14962 ± 3782 * n = 5	15440 ± 6288* n = 6
Hexokinase	856 ± 310 n = 7	1770 ± 532*** n = 5	2590 ± 449*** n = 11
Esterase	44830 ± 17063 n = 6	35127 ± 7645* n = 4	38791 ± 10633* n = 6

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Die Signifikanz der Werte zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05,

A-Tab. 11 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 20 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

September 96	Labor	Aich	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	240 ± 38,5 n = 16	226 ± 38,5 n = 11	205 ± 26,4** n = 11
Cytochrom c-Oxidase	2,99 ± 0,47 n = 16	3,11 ± 1,06 n = 11	2,88 ± 0,54 n = 11
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	20,7 ± 5,76 n = 9	20,0 ± 3,33 n = 10	22,7 ± 4,13 n = 10
Succinatdehydrogenase	10,8 ± 4,25 n = 9	13,3 ± 4,23 n = 9	16,4 ± 4,0** n = 10
Citratsynthase	2,25 ± 0,76 n = 9	2,34 ± 0,709 n = 10	2,54 ± 0,66 n = 10
Saure Phosphatase	10190 ± 3598 n = 9	11348 ± 4267 n = 10	10689 ± 2977 n = 10
Uricase	49,3 ± 21,7 n = 10	18,3 ± 6,71*** n = 10	26,9 ± 13,6** n = 10
Katalase	26,8 ± 9,79 n = 9	33,6 ± 6,15 n = 10	19,1 ± 4,13** n = 10
Alaninaminotransferase	1222 ± 279 n = 10	1501 ± 409 n = 10	1178 ± 238 n = 10
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	238 ± 110 n = 10	234 ± 79,8 n = 10	242 ± 95,8 n = 10
Phosphofruktokinase	6,29 ± 1,04 n = 10	10,7 ± 2,63*** n = 10	9,60 ± 1,52*** n = 10
Malatenzym	n.b.	n.b.	n.b.
Hexokinase	5,49 ± 0,956 n =	6,17 ± 1,59 n =	6,02 ± 0,88 n =
Esterase	92,9 ± 25,7 n = 10	90,0 ± 11,0 n = 10	82,7 ± 25,8 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 12 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 20 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / g Organ

September 96	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	70395 ± 4739 n = 16	65310 ± 8344 n = 11	70477 ± 4584 n = 11
Cytochrom c-Oxidase	1057 ± 357 n = 16	862 ± 127* n = 11	993 ± 193 n = 11
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	779 ± 186 n = 9	716 ± 242 n = 10	919 ± 332* n = 10
Succinatdehydrogenase	451 ± 237 n = 9	534 ± 296 n = 10	742 ± 246** n = 9
Citratsynthase	85,9 ± 32,5 n = 9	81,6 ± 27,0 n = 10	100 ± 38,6 n = 10
Saure Phosphatase	385255 ± 137267 n = 9	528968 ± 399872 n = 10	500324 ± 350023 n = 9
Uricase	530 ± 198 n = 10	244 ± 94,9*** n = 10	269 ± 150*** n = 10
Katalase	565 ± 181 n = 9	601 ± 201 n = 10	473 ± 167 n = 10
Alaninaminotransferase	458499 ± 121789 n = 10	459216 ± 121130 n = 10	367331 ± 92415 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	89307 ± 44878 n = 10	70704 ± 24934 n = 10	75760 ± 31987 n = 10
Phosphofruktokinase	1243 ± 321 n = 10	2082 ± 453*** n = 10	1656 ± 356*** n = 10
Malatenzym	2548 ± 1398 n = 10	2128 ± 846 n = 8	1371 ± 488** n = 10
Hexokinase	2065 ± 410 n = 10	2030 ± 542 n = 8	1876 ± 394 n = 10
Esterase	34505 ± 8369 n = 10	27894 ± 5158 n = 10	26251 ± 9526 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 13 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 7 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Juli '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	17,2 ± 3,81 n = 11	12,9 ± 2,58*** n = 18	15,1 ± 1,16 n = 16
Cytochrom c-Oxidase	0,58 ± 0,13 n = 12	0,63 ± 0,08 n = 18	0,59 ± 0,06 n = 18
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	21,3 ± 5,66 n = 8	19,0 ± 6,46 n = 8	18,0 ± 4,86 n = 8
Succinatdehydrogenase	11,0 ± 1,68 n = 8	10,4 ± 0,92 n = 8	12,5 ± 1,84 n = 8
Citratsynthase	1,11 ± 0,27 n = 8	1,15 ± 0,23 n = 7	1,42 ± 0,49 n = 8
Saure Phosphatase	5,55 ± 1045 n = 8	5,97 ± 2,46 n = 8	5,18 ± 1,11 n = 8
Katalase	42,6 ± 6,27 n = 8	49,13 ± 7,78 n = 6	39,8 ± 6,35 n = 8
Alaninaminotransferase	427 ± 106 n = 8	438 ± 51,5 n = 6	341 ± 87 n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	153 ± 54,6 n = 8	177 ± 66,0 n = 8	98,8 ± 35,1** n = 8
Phosphofruktokinase	39,1 ± 9,07 n = 7	24,2 ± 12,0* n = 6	27,3 ± 10,3 n = 8
Malatenzym	47,2 ± 10,0 n = 8	38,8 ± 9,38 n = 6	25,6 ± 6,18*** n = 8
Hexokinase	39,2 ± 9,07 n = 8	24,2 ± 12,1 n = 6	27,3 ± 10,3 n = 8
Esterase	300 ± 52,4 n = 8	273 ± 92,5 n = 6	100 ± 25,3*** n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

A-Tab. 14 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 7 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug mU/ g Organ

Probennahme: Juli '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	129640 ± 20328 n = 11	93059 ± 14472 *** n = 18	111034 ± 12706 n = 18
Cytochrom c-Oxidase	4388 ± 669 n = 12	4416 ± 623 n = 18	4295 ± 539 n = 18
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	1501 ± 258 n = 8	979 ± 294*** n = 8	1310 ± 425 n = 8
Succinatdehydrogenase	795 ± 180 n = 8	550 ± 107*** n = 8	923 ± 297 n = 8
Citratsynthase	81,1 ± 29,5 n = 8	61,3 ± 20,3 n = 7	99,8 ± 47,8 n = 8
Saure Phosphatase	390 ± 67,2 n = 8	314 ± 131 n = 8	371 ± 96,7 n = 8
Katalase	3116 ± 859 n = 8	2562 ± 527 n = 6	2870 ± 743 n = 8
Alaninaminotransferase	188456 ± 70403 n = 8	252689 ± 190975 n = 6	123615 ± 46575 n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	67585 ± 22305 n = 8	68713 ± 42015 n = 8	34577 ± 12182* n = 8
Phosphofruktokinase	15242 ± 4989 n = 7	8464 ± 3839 n = 6	9008 ± 1582 n = 8
Malatenzym	20615 ± 6381 n = 8	10698 ± 4665 *** n = 6	9036 ± 2760*** n = 8
Hexokinase	13653 ± 4567 n = 8	15505 ± 9336 n = 6	10700 ± 4230 n = 8
Esterase	134110 ± 51738 n = 8	102563 ± 57211 n = 6	36223 ± 14201*** n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

A-Tab. 15 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 7 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor Bezug: mU/ mg Protein

Juli '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	24,2 ± 1,72 n = 8	21,0 ± 3,39 n = 8	20,5 ± 2,59 n = 6
Cytochrom c-Oxidase	0,52 ± 0,03 n = 8	0,47 ± 0,07 n = 8	0,52 ± 0,06 n = 6
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	7,71 ± 1,28 n = 8	8,50 ± 2,74 n = 8	6,85 ± 2,86 n = 8
Succinatdehydrogenase	28,2 ± 2,29 n = 8	18,5 ± 5,39*** n = 8	14,0 ± 4,09*** n = 8
Citratsynthase	0,59 ± 0,13 n = 7	0,78 ± 0,11* n = 7	0,48 ± 0,27 n = 6
Saure Phosphatase	8,03 ± 0,84 n = 8	6,26 ± 2,48 n = 8	7,81 ± 1,02 n = 8
Katalase	17,9 ± 2,80 n = 8	18,2 ± 3,29 n = 8	17,6 ± 3,07 n = 8
Alaninaminotransferase	651 ± 97,6 n = 8	551 ± 91,1 n = 7	359 ± 68,1*** n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	91,9 ± 46,4 n = 7	85,1 ± 35,0 n = 5	57,3 ± 14,7 n = 7
Phosphofruktokinase	41,7 ± 24,9 n = 8	21,4 ± 17,5* n = 8	12,3 ± 7,42** n = 8
Malatenzym	11,6 ± 3,48 n = 8	8,30 ± 2,27 n = 8	5,38 ± 1,37*** n = 8
Hexokinase	n.b.	n.b.	n.b.
Esterase	181 ± 58,7 n = 8	221 ± 37,7 n = 8	123 ± 38,4* n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 16 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 7 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/ g Organ

Juli '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	63652 ± 6608 n = 8	56738 ± 8294 n = 8	52077 ± 6997* n = 6
Cytochrom c-Oxidase	1361 ± 124 n = 8	1291 ± 256 n = 8	1340 ± 186 n = 6
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	719 ± 209 n = 8	681 ± 298 n = 8	828 ± 315 n = 8
Succinatdehydrogenase	1516 ± 316 n = 8	1473 ± 572 n = 8	1694 ± 382 n = 8
Citratsynthase	63,6 ± 33,9 n = 7	95,4 ± 16,2** n = 7	100 ± 36,3** n = 6
Saure Phosphatase	744 ± 160 n = 8	485 ± 204** n = 8	1115 ± 487* n = 8
Katalase	1661 ± 376 n = 8	1458 ± 564 n = 8	2134 ± 319* n = 8
Alaninaminotransferase	234562 ± 131712 n = 8	313009 ± 135292 n = 7	302713 ± 80406 n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	33110 ± 25788 n = 7	44004 ± 14286* n = 5	46431 ± 13074* n = 7
Phosphofruktokinase	13332 ± 7434 n = 8	14619 ± 9867 n = 8	10091 ± 6731 n = 8
Malatenzym	4224 ± 2454 n = 8	4908 ± 2146 n = 8	4542 ± 1645 n = 8
Hexokinase	n.b.	n.b.	n.b.
Esterase	60687 ± 24671 n = 8	141456 ± 72116* n = 8	102095 ± 31439** n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 17 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: November '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	129 ± 35,9 n = 10	98,1 ± 32,5 n = 12	99,7 ± 14,0* n = 9
Cytochrom c-Oxidase	9,32 ± 2,36 n = 15	6,06 ± 1,37*** n = 11	8,12 ± 2,65 n = 9
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	13,5 ± 3,64 n = 10	12,8 ± 2,43 n = 10	11,8 ± 1,98 n = 10
Succinatdehydrogenase	17,1 ± 1,95 n = 10	17,4 ± 2,81 n = 10	16,7 ± 3,61 n = 10
Citratsynthase	0,98 ± 0,36 n = 8	0,99 ± 0,24 n = 10	1,23 ± 0,50 n = 10
Saure Phosphatase	10,0 ± 2,57 n = 8	10,0 ± 2,55 n = 8	9,40 ± 2,13 n = 8
Katalase	32,9 ± 4,91 n = 10	26,6 ± 4,60* n = 10	30,0 ± 3,64 n = 10
Alaninaminotransferase	3977 ± 1169 n = 10	2307 ± 957* n = 9	2222 ± 1148* n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	426 ± 189 n = 10	522 ± 139 n = 10	569 ± 169 n = 10
Phosphofruktokinase	142 ± 35,6 n = 8	86,8 ± 12,1*** n = 8	82,7 ± 45,3** n = 8
Malatenzym	146 ± 32,3 n = 10	89,1 ± 37,2* n = 9	152 ± 32,2 n = 10
Hexokinase	18,6 ± 4,81 n = 10	15,5 ± 6,10 n = 10	10,3 ± 5,1*** n = 10
Esterase	2277 ± 618 n = 10	2036 ± 630 n = 8	601 ± 289 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 18 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug mU/ g Organ

Probennahme: November '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	82864 ± 10082 n = 10	96590 ± 15538* n = 9	83582 ± 26778 n = 8
Cytochrom c-Oxidase	480 ± 63,5 n = 15	451 ± 113 n = 12	515 ± 51,9 n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	497 ± 107 n = 10	506 ± 69,6 n = 10	423 ± 119 n = 9
Succinatdehydrogenase	645 ± 140 n = 10	693 ± 112 n = 10	592 ± 182 n = 10
Citratsynthase	40,6 ± 17,1 n = 7	40,5 ± 15,0 n = 10	41,4 ± 10,3 n = 10
Saure Phosphatase	361 ± 79,2 n = 8	393 ± 121 n = 8	316 ± 77,3 n = 7
Katalase	1251 ± 316 n = 10	1089 ± 328 n = 9	1068 ± 242 n = 9
Alaninaminotransferase	227505 ± 69245 n = 10	126263 ± 64483** n = 9	83713 ± 48423*** n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	22980 ± 8057 n = 10	26589 ± 5878 n = 10	25833 ± 12959 n = 10
Phosphofruktokinase	8028 ± 1763 n = 8	4182 ± 1923*** n = 8	2968 ± 2516*** n = 8
Malatenzym	5662 ± 2222 n = 10	4480 ± 1888 n = 9	6049 ± 2221 n = 10
Hexokinase	1033 ± 179 n = 10	755 ± 455 n = 10	435 ± 273*** n = 10
Esterase	131507 ± 46140 n = 10	116575 ± 43635 n = 8	25557 ± 11518*** n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 19 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug mU/ mg Protein

November '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	289 ± 81,3 n = 9	282 ± 63,2 n = 7	262 ± 97,0 n = 7
Cytochrom c-Oxidase	n.b.	n.b.	n.b.
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	12,0 ± 3,39 n = 9	15,8 ± 5,37 n = 9	14,0 ± 5,86 n = 9
Succinatdehydrogenase	26,9 ± 5,80 n = 9	28,5 ± 6,26 n = 9	25,0 ± 7,91 n = 9
Citratsynthase	0,84 ± 0,41 n = 10	0,45 ± 0,21 n = 10	0,60 ± 0,29 n = 10
Saure Phosphatase	2,88 ± 1,14 n = 9	2,76 ± 2,34 n = 9	1,46 ± 0,52** n = 8
Katalase	11,9 ± 4,62 n = 9	11,5 ± 2,54 n = 9	14,2 ± 8,29 n = 10
Alaninaminotransferase	353 ± 117 n = 10	361 ± 72,9 n = 10	293 ± 60,3 n = 10
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	84,8 ± 27,0 n = 9	89,7 ± 34,8 n = 10	65,6 ± 18,4 n = 10
Phosphofruktokinase	28,4 ± 7,57 n = 10	25,0 ± 8,13 n = 10	18,3 ± 5,22** n = 10
Malatenzym	127 ± 39,6 n = 10	148 ± 53,2 n = 10	101 ± 65,5 n = 10
Hexokinase	3,80 ± 109 n = 10	5,20 ± 188 n = 9	3,64 ± 2,30 n = 9
Esterase	146 ± 25,8 n = 10	157 ± 26,6 n = 10	109 ± 10,2*** n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 20 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/ g Organ

November '97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	54207 ± 12269 n = 9	62578 ± 12501 n = 8	56641 ± 8759 n = 7
Cytochrom c-Oxidase	n.b.	n.b.	n.b.
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	398 ± 150 n = 10	358 ± 148 n = 10	376 ± 95,2 n = 10
Succinatdehydrogenase	951 ± 337 n = 9	743 ± 264 n = 10	707 ± 207 n = 10
Citratsynthase	32,2 ± 22,5 n = 10	12,3 ± 7,11 n = 9	17,2 ± 7,86 n = 10
Saure Phosphatase	111 ± 69,9 n = 9	64,6 ± 35,9 n = 9	39,0 ± 11,6** n = 8
Katalase	394 ± 179 n = 9	283 ± 91,6 n = 9	378 ± 161 n = 8
Alaninaminotransferase	151848 ± 46175 n = 10	133965 ± 61459 n = 9	105778 ± 27450* n = 10
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	33906 ± 13343 n = 10	32802 ± 15005 n = 9	22964 ± 5430* n = 10
Phosphofruktokinase	12540 ± 3201 n = 10	9581 ± 5362 n = 10	6857 ± 3006** n = 10
Malatenzym	5638 ± 1765 n = 10	5022 ± 2068 n = 10	3119 ± 2068* n = 10
Hexokinase	1663 ± 416 n = 10	1838 ± 707 n = 9	1512 ± 1199 n = 10
Esterase	65276 ± 12889 n = 10	56848 ± 20613 n = 9	40174 ± 11055** n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 21 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 12 wöchiger Regeneration im Labor nach vorheriger Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/ mg Protein

Regeneration Nov.'97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	120 ± 28,8 n = 10	100 ± 19,9 n = 10	94,2 ± 18,5* n = 10
Cytochrom c-Oxidase	3,10 ± 0,61 n = 10	2,19 ± 0,44** n = 10	2,04 ± 0,44*** n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	4,86 ± 2,17 n = 9	6,29 ± 2,03 n = 10	6,64 ± 1,90 n = 10
Succinatdehydrogenase	8,95 ± 4,99 n = 10	12,8 ± 3,12* n = 10	11,1 ± 2,53 n = 10
Citratsynthase	1,41 ± 0,443 n = 8	1,81 ± 0,37 n = 9	1,50 ± 0,375 n = 10
Saure Phosphatase	617 ± 142 n = 7	669 ± 170 n = 8	623 ± 128 n = 10
Katalase	48,5 ± 13,6 n = 9	44,6 ± 13,3 n = 10	51,2 ± 11,1 n = 10
Alaninaminotransferase	1958 ± 419 n = 10	1844 ± 868 n = 10	2054 ± 818 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	176 ± 52,7 n = 10	156 ± 76,6 n = 10	163 ± 25,4 n = 10
Phosphofruktokinase	65,5 ± 41,9 n = 10	64,4 ± 37,5 n = 10	80,5 ± 49,1 n = 10
Malatenzym	610 ± 223 n = 9	408 ± 177 n = 9	534 ± 464 n = 10
Hexokinase	10,5 ± 5,1 n = 9	9,8 ± 4,6 n = 8	13,7 ± 6,1 n = 10
Esterase	4146 ± 1096 n = 10	4604 ± 2181 n = 10	4393 ± 1315 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 22 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 12 wöchiger Regeneration im Labor nach vorheriger Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU/g Organ

Regeneration Nov.'97	Labor	Krähenbach	Körsch
Gehirn:			
Acetylcholinesterase	8434 ± 1781 n = 10	8766 ± 1006 n = 10	8297 ± 1108 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	214 ± 27,0 n = 10	191 ± 16,9 n = 10	178 ± 16,6 n = 10
Leber:			
Cytochrom c-Oxidase	159 ± 34,5 n = 9	205 ± 76,7 n = 9	229 ± 46,9** n = 10
Succinatdehydrogenase	325 ± 94,1 n = 9	373 ± 131 n = 10	396 ± 107 n = 10
Citratsynthase	49,5 ± 19,1 n = 9	51,6 ± 14,0 n = 9	53,1 ± 15,2 n = 10
Saure Phosphatase	21027 ± 5806 n = 7	19352 ± 7064 n = 8	22232 ± 7876 n = 8
Katalase	1653 ± 437 n = 10	1339 ± 585 n = 10	1778 ± 277 n = 10
Alaninaminotransferase	59748 ± 21211 n = 10	58269 ± 30869 n = 10	51433 ± 19388 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	17650 ± 9448 n = 9	15362 ± 9178 n = 10	15024 ± 5341 n = 10
Phosphofruktokinase	6196 ± 1992 n = 10	7860 ± 3986* n = 9	8345 ± 1068*** n = 9
Malatenzym	63779 ± 26719 n = 9	76122 ± 19057*** n = 9	83562 ± 7580*** n = 9
Hexokinase	291 ± 178 n = 9	309 ± 211 n = 8	364 ± 219 n = 10
Esterase	120702 ± 25960 n = 10	123931 ± 57278 n = 10	109468 ± 30499 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

A-Tab. 23 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 50 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Mai' 98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	84,3 ± 25,1 n = 10	109 ± 30,5**	72,9 ± 16,9 n = 10	88,0 ± 46,0 n = 8	97,8 ± 23,3 n = 4
Cytochrom c-Oxidase	1,73 ± 0,72 n = 10	2,06 ± 0,64 n = 10	1,55 ± 0,423 n = 9	2,16 ± 1,07 n = 8 ^{oo}	2,12 ± 0,46 n = 10 ^o
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	9,03 ± 2,67 n = 10	6,20 ± 2,19*	3,52 ± 1,16***	8,78 ± 2,88 n = 9	10,4 ± 3,26 n = 8 ^o
Succinatdehydrogenase	17,3 ± 7,08 n = 9	14,2 ± 7,25 n = 10	7,52 ± 2,85**	13,8 ± 7,03 n = 8	10,5 ± 3,06* n = 8 ^{ooo}
Citratsynthase	3,81 ± 2,94 n = 8	2,93 ± 2,36 n = 9	0,43 ± 0,18**	4,78 ± 3,38 n = 7 ^{ooo}	5,748 ± 2,01 n = 8 ^{ooo}
Saure Phosphatase	761 ± 261 n = 8	728 ± 283 n = 8	694 ± 559 n = 8	925 ± 314 n = 9	2242 ± 1009*** n = 6 ^{ooo}
Katalase	51,3 ± 15,9 n = 10	44,5 ± 10,1 n = 10	21,8 ± 5,78**	65,1 ± 26,3 n = 9	41,9 ± 19,4 n = 8
Alaninaminotransferase	490 ± 338 n = 10	435 ± 224 n = 7	604 ± 185*	596 ± 285 n = 8	580 ± 272 n = 5
Glucose-6-P-Dehydrogenase	490 ± 298 n = 10	635 ± 378 n = 8	383 ± 156 n = 8	923 ± 636 n = 8 ^o	996 ± 623 n = 5 ^{oo}
Phosphofruktokinase	18,4 ± 9,3 n = 9	10,9 ± 5,36 n = 7	12,1 ± 4,27 n = 8	n.a.	n.a.
Malatenzym	259 ± 108 n = 10	309 ± 130 n = 8	135 ± 36,6**	424 ± 289 n = 8 ^{oo}	617 ± 477* n = 5
Hexokinase	20,5 ± 11,5 n = 10	17,47 ± 11,63 n = 7	11,3 ± 6,48 n = 8	40,79 ± 26,97 n = 8	22,1 ± 3,62 n = 5
Esterase	6127 ± 3582 n = 10	6973 ± 2835 n = 8	1160 ± 1089***	11651 ± 8483 n = 8 ^o	17081 ± 8480* n = 5 ^o

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: *p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^op < 0,05, ^{oo} p < 0,01, ^{ooo}p < 0,001

A-Tab. 24 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 50 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Mai' 98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	72456 ± 12954 n = 10	119093 ± 19926***	79520 ± 9356 n = 10	105897 ± 47507* n = 8 ^o	101127 ± 33688 n = 4
Cytochrom c-Oxidase	1440 ± 234 n = 10	2276 ± 744***	1614 ± 279 n = 10	2043 ± 654*** n = 8	2351 ± 525*** n = 10
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	423 ± 176 n = 10	527 ± 295 n = 10	337 ± 132 n = 9	864 ± 479* n = 9	986 ± 340*** n = 8 ^{oo}
Succinatdehydrogenase	940 ± 460 n = 8	1004 ± 297 n = 10	717 ± 533 n = 9	1014 ± 344 n = 9	1084 ± 342 n = 8
Citratsynthase	148 ± 48,2 n = 8	240 ± 169 n = 9	35,5 ± 14,1*** n = 9	498 ± 258*** n = 9 ^{oo}	725 ± 134*** n = 8 ^{ooo}
Saure Phosphatase	47659 ± 24181 n = 7	51843 ± 9841 n = 8	58879 ± 43070 n = 9	84963 ± 43093 n = 9 ^o	102184 ± 36339 n = 6 ^o
Katalase	3042 ± 1311 n = 9	3535 ± 905 n = 10	1912 ± 779 n = 9	4889 ± 2734 n = 9	4780 ± 2020 n = 8
Alaninaminotransferase	114655 ± 96559 n = 10	106923 ± 65121 n = 7	137779 ± 88599 n = 8	191677 ± 153480 n = 8	257636 ± 186238 n = 6
Glucose-6-P-Dehydrogenase	17199 ± 8362 n = 10	22850 ± 11501 n = 8	22943 ± 13626 n = 8	22907 ± 13291 n = 8	20194 ± 9194 n = 5
Phosphofruktokinase	648 ± 284 n = 9	494 ± 125 n = 6	716 ± 351 n = 7	n.b.	n.b.
Malatenzym	9504 ± 3132 n = 10	11169 ± 1811 n = 8	8177 ± 3927 n = 8	10905 ± 6663 n = 8 ^{ooo}	11354 n = 5 ^{oo}
Hexokinase	782 ± 486 n = 10	684 ± 443 n = 7	599 ± 345 n = 8	1339 ± 717 n = 8	1218 ± 777 n = 7
Esterase	214091 ± 110942 n = 10	257523 ± 46436 n = 8	60544 ± 36955***	283715 ± 119638 n = 8	321095 ± 180438 n = 5

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^o p < 0,05, ^{oo} p < 0,01, ^{ooo}p < 0,001

A-Tab. 25 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Juli '98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	151 ± 73,9 n = 9	107 ± 85,2 n = 9	162 ± 42,8 n = 17	274 ± 107* n = 8 ^{ooo}	205 ± 60,4 n = 10 ^{oo}
Cytochrom c-Oxidase	5,22 ± 2,15 n = 9	4,45 ± 2,33 n = 9	17,8 ± 5,12 *** n = 18	21,8 ± 10,6*** n = 7 ^{ooo}	16,1 ± 6,62 n = 10 ^{ooo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	15,0 ± 3,44 n = 10	15,2 ± 2,80 n = 8	12,3 ± 2,69 n = 5	10,5 ± 2,24** n = 10 ^{ooo}	9,67 ± 3,86** n = 9 ^{ooo}
Succinatdehydrogenase	5,62 ± 2,31 n = 9	4,08 ± 2,30 n = 8	8,85 ± 3,20 * n = 9	10,8 ± 4,94** n = 8 ^{ooo}	13,1 ± 3,42*** n = 8 ^{ooo}
Citratsynthase	0,98 ± 0,30 n = 10	1,17 ± 0,34 n = 8	0,72 ± 0,37 n = 10	0,73 ± 0,31 n = 10 ^{oo}	1,24 ± 1,08 n = 8
Saure Phosphatase	4134 ± 3216 n = 10	3187 ± 1654 n = 8	2699 ± 2581 n = 7	2275 ± 1437 n = 8	779 ± 358** n = 9 ^{ooo}
Katalase	68,6 ± 13,3 n = 10	52,8 ± 11,0*** n = 8	47,6 ± 9,92** n = 10	44,8 ± 9,5*** n = 10 ^o	39,4 ± 11,5*** n = 9 ^o
Alaninaminotransferase	9221 ± 5438 n = 9	11387 ± 8777 n = 8	7643 ± 6010 n = 7	3757 ± 3964* n = 9 ^o	898 ± 552*** n = 8 ^{ooo}
Glucose-6-P-Dehydrogenase	2039 ± 1118 n = 9	1264 ± 544 n = 8	2183 ± 902 n = 10	740 ± 548** n = 10 ^o	742 ± 279*** n = 10 ^o
Phosphofruktokinase	264 ± 148 n = 10	315 ± 228 n = 9	520 ± 324 n = 10	72,1 ± 44,7* n = 7 ^o	29,4 ± 18,7*** n = 10 ^{ooo}
Malatenzym	840 ± 563 n = 9	724 ± 558 n = 8	634 ± 267 n = 8	430 ± 366* n = 10 ^{oo}	347 ± 127*** n = 10 ^{oo}
Hexokinase	38,5 ± 18,5 n = 9	45,2 ± 28,5 n = 7	123 ± 55,7*** n = 10	32,9 ± 27,4 n = 7	6,1 ± 5,4*** n = 8 ^{ooo}
Esterase	5349 ± 2397 n = 9	6857 ± 2887 n = 8	1320 ± 478*** n = 10	3198 ± 2811 n = 9 ^o	2196 ± 712** n = 10 ^{ooo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: *p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^op< 0,05, ^{oo}p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 26 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Juli '98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	188542 ± 38150 n = 10	176123 ± 24233 n = 12	74644 ± 10425*** n = 22	110903 ± 28067*** n = 10 ^{ooo}	129306 ± 26073*** n = 10 ^{oo}
Cytochrom c-Oxidase	6955 ± 1148 n = 10	5954 ± 1740 n = 10	8393 ± 933*** n = 22	8172 ± 1980** n = 10 ^{ooo}	9163 ± 2136*** n = 10 ^{ooo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	540 ± 164 n = 10	442 ± 308 n = 8	419 ± 125 n = 9	258 ± 182*** n = 10	652 ± 468 n = 10
Succinatdehydrogenase	205 ± 106 n = 10	152 ± 141 n = 8	330 ± 99,4*** n = 10	554 ± 369** n = 8 ^{ooo}	616 ± 226*** n = 8 ^{ooo}
Citratsynthase	35,2 ± 16,0 n = 9	30,6 ± 19,1 n = 8	25,6 ± 16,6 n = 10	36,5 ± 18,8 n = 10	41,3 ± 15,1 n = 8
Saure Phosphatase	141 ± 96,5 n = 10	48,6 ± 19,5* n = 8	41,4 ± 34,7** n = 7	96,0 ± 48,7 n = 8	35,5 ± 19,4*** n = 9
Katalase	2493 ± 788 n = 10	1504 ± 982 * n = 8	1678 ± 496** n = 10	2206 ± 693 n = 10	1747 ± 356 n = 9
Alaninaminotransferase	364256 ± 124825 n = 10	408559 ± 93728 n = 10	164260 ± 78016 n = 9	52635 ± 43190 n = 9	44095 ± 30709 n = 9
Glucose-6-P-Dehydrogenase	83528 ± 21495 n = 10	52515 ± 9202 n = 10	52752 ± 13622 n = 10	32682 ± 30309 n = 9	29378 ± 11357 n = 10
Phosphofruktokinase	13581 ± 6271 n = 9	10367 ± 3806 n = 9	11919 ± 4518 n = 10	3638 ± 2347 n = 9	1349 ± 984 n = 10
Malatenzym	32661 ± 9217 n = 10	26787 ± 5723 n = 10	14619 ± 4598 n = 10	12939 ± 8881 n = 9	13796 ± 7334 n = 10
Hexokinase	1743 ± 422 n = 10	1630 ± 250 n = 9	2940 ± 632 n = 10	1201 ± 1031 n = 8	311 ± 255 n = 8
Esterase	263881 ± 81433 n = 10	279783 ± 79965 n = 10	32734 ± 12408 n = 10	97202 ± 91673 n = 9	97946 ± 53044 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^op< 0,05, ^{oo}p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 25 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) von Freilandfängen aus der Körsch. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Mai. '98	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:		
Acetylcholinesterase	24,9 ± 7,04 n = 8	21,8 ± 4,82 n = 8
Cytochrom c-Oxidase	0,279 ± 0,023 n = 8	0,202 ± 0,062 n = 8
Leber:		
Cytochrom c-Oxidase	7,71 ± 1,28 n = 8	8,50 ± 2,72 n = 8
Succinatdehydrogenase	28,2 ± 2,29 n = 7	18,5 ± 5,39*** n = 8
Citratsynthase	0,78 ± 0,11 n = 7	0,59 ± 0,132* n = 7
Saure Phosphatase	8030 ± 840 n = 8	6261 ± 2481 n = 8
Katalase	17,9 ± 2,8 n = 8	18,2 ± 3,29 n = 8
Alaninaminotransferase	75,2 ± 50,9 n = 8	162 ± 124 n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	20,9 ± 15,1 n = 8	15,6 ± 8,70 n = 8
Phosphofruktokinase	2,14 ± 1,36 n = 8	1,81 ± 0,35 n = 4
Malatenzym	3,04 ± 2,20 n = 8	2,12 ± 0,76 n = 7
Hexokinase	1,42 ± 1,77 n = 8	1,41 ± 0,56 n = 7
Esterase	207 ± 101 n = 8	339 ± 294 n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen Körsch-Standorten wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001;

A-Tab. 26 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) von Freilandfängen aus der Körsch. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Mai. '98	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:		
Acetylcholinesterase	69109 ± 10387 n = 8	56362 ± 10883* n = 9
Cytochrom c-Oxidase	755 ± 222 n = 8	632 ± 364 n = 9
Leber:		
Cytochrom c-Oxidase	1532 ± 682 n = 8	3132 ± 2210* n = 8
Succinatdehydrogenase	3419 ± 1884 n = 8	6544 ± 4096** n = 8
Citratsynthase	115 ± 79,5 n = 7	186 ± 84,7* n = 7
Saure Phosphatase	156851 ± 95820 n = 7	175611 ± 121762 n = 7
Katalase	3924 ± 2672 n = 7	7112 ± 5569 n = 8
Alaninaminotransferase	28998 ± 7464 n = 8	170268 ± 137629** n = 8
Glucose-6-P-Dehydrogenase	7826 ± 5166 n = 8	17450 ± 13826 n = 8
Phosphofruktokinase	n.b.	n.b.
Malatenzym	1714 ± 1554 n = 8	3893 ± 3024*** n = 8
Hexokinase	1026 ± 930 n = 8	4361 ± 3140 *** n = 7
Esterase	86658 ± 61780 n = 8	256326 ± 210545*** n = 8

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Körsch-Standorten wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001;

A-Tab. 27 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der (*Barbatula barbatula*) nach 9 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Korsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Juli '98	Labor	Krähenbach	Korsch	Freiland Korsch A	Freiland Korsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	383 ± 219 n = 8	202 ± 142** n = 7	498 ± 318 n = 21	154 ± 99,5*** n = 9 ^{ooo}	497 ± 169 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	15,6 ± 10,9 n = 8	4,42 ± 1,19*** n = 7	12,1 ± 12,0*** n = 21	9,814 ± 2,78 n = 9	15,8 ± 6,18 n = 10 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	14,9 ± 2,26 n = 8	10,1 ± 6,55 n = 8	13,5 ± 3,38 n = 10	10,5 ± 4,51 n = 7	13,6 ± 4,62 n = 10
Succinatdehydrogenase	9,82 ± 2,65 n = 7	12,1 ± 6,28 n = 8	17,6 ± 4,38*** n = 10	25,3 ± 16,8*** n = 7	24,0 ± 15,4*** n = 10
Citratsynthase	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Saure Phosphatase	928 ± 530 n = 8	1052 ± 560 n = 8	930 ± 172 n = 10	2533 ± 1816 n = 7 ^{ooo}	2105 ± 1682* n = 9 ^{oo}
Katalase	23,6 ± 7,27 n = 7	24,1 ± 12,2 n = 8	22,7 ± 6,15 n = 9	33,1 ± 7,39 n = 6 ^o	30,5 ± 10,4* n = 7 ^o
Alaninaminotransferase	521 ± 354 n = 7	1040 ± 652* n = 6	747 ± 488 n = 9	480 ± 148 n = 8	1429 ± 640** n = 7 ^{oo}
Glucose-6-P-Dehydrogenase	189 ± 159 n = 8	167 ± 99,2 n = 6	194 ± 110 n = 7	152 ± 58,2 n = 7	176 ± 53,1 n = 7
Phosphofruktokinase	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Malatenzym	12,05 ± 13,9 n = 8	14,8 ± 5,49 n = 6	12,6 ± 8,89 n = 9	4,58 ± 3,11 n = 7 ^{ooo}	5,44 ± 3,09 n = 6 ^{oo}
Hexokinase	4,87 ± 2,21 n = 7	11,8 ± 5,21** n = 6	9,77 ± 3,58 *** n = 8	3,30 ± 1,04 n = 8 ^{ooo}	7,7 ± 2,95* n = 6
Esterase	336 ± 190 n = 8	412 ± 162 n = 6	297 ± 196 n = 9	221 ± 46,9 n = 8	456 ± 55,0*** n = 7

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass gegenüber Freiland: ° p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001

A-Tab. 28 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der (*Barbatula barbatula*) nach 9 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Korsch sowie im Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Juli '98	Labor	Krähenbach	Korsch	Freiland Korsch A	Freiland Korsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	140435 ± 27580 n = 8	150360 ± 9272 n = 7	120819 ± 25798** n = 22	104869 ± 33726** n = 11	110888 ± 15654** n = 10
Cytochrom c-Oxidase	4523 ± 608 n = 8	4444 ± 257 n = 6	3661 ± 833*** n = 24	3402 ± 250*** n = 11	3454 ± 293*** n = 10
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	825 ± 366 n = 9	626 ± 203 n = 8	746 ± 291 n = 10	329 ± 113*** n = 7 ^{ooo}	706 ± 404 n = 10
Succinatdehydrogenase	897 ± 400 n = 9	835 ± 461 n = 7	1020 ± 527 n = 10	810 ± 430 n = 7	1175 ± 845 n = 10
Citratsynthase	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Saure Phosphatase	84284 ± 55252 n = 8	71971 ± 51898** n = 7	53198 ± 22692** n = 9	78674 ± 43052 n = 7	82997 ± 46522 n = 8
Katalase	2218 ± 802 n = 8	1748 ± 1191 n = 8	1362 ± 665* n = 9	940 ± 341*** n = 7	1864 ± 1041 n = 9
Alaninaminotransferase	331761 ± 119298 n = 10	327 010 ± 78452 n = 7	239612 ± 152219*** n = 9	192856 ± 93144*** n = 8 ^{ooo}	312263 ± 207437 n = 10 ^{ooo}
Glucose-6-P-Dehydrogenase	37253 ± 35255 n = 8	61925 ± 37313* n = 8	89862 ± 19773 *** n = 7	138598 ± 31428*** n = 7 ^{ooo}	59682 ± 24226* n = 8 ^{oo}
Phosphofruktokinase	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Malatenzym	3235 ± 1562 n = 10	5117 ± 768 ** n = 7	3159 ± 1006 n = 9	2422 ± 932** n = 7 ^o	18938 ± 286 *** n = 9 ^{ooo}
Hexokinase	2913 ± 943 n = 9	3859 ± 758 * n = 7	4010 ± 2101 *** n = 9	1318 ± 603** n = 8 ^{ooo}	2498 ± 1270 n = 10 ^{ooo}
Esterase	166542 ± 50912 n = 10	143727 ± 21080 n = 7	96168 ± 49305 ** n = 9	88010 ± 35203*** n = 8 ^o	113893 ± 71002* n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass gegenüber Freiland: ° p < 0,05, °°p < 0,01, °°°p < 0,001

A-Tab. 29 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 23 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: November '98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	82,0 ± 13,7 n = 10	67,8 ± 7,51 * n = 8	68,7 ± 25,0 n = 10	85,9 ± 22,0 n = 10	68,9 ± 11,8 * n = 10
Cytochrom c-Oxidase	7,98 ± 1,79 n = 10	5,23 ± 1,87 ** n = 8	7,85 ± 2,63 n = 10	8,15 ± 3,29 n = 10 ^{oo}	7,15 ± 0,83 n = 10 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	6,30 ± 1,56 n = 10	6,74 ± 1,46 n = 8	6,52 ± 1,90 n = 10	6,10 ± 2,39 n = 10	5,03 ± 0,96 * n = 10 ^o
Succinatdehydrogenase	11,4 ± 3,40 n = 10	9,30 ± 0,53 * n = 8	9,84 ± 2,56 n = 10	8,22 ± 1,36 * n = 10	3,89 ± 1,29 ** n = 10 ^{ooo}
Citratsynthase	0,67 ± 0,25 n = 10	1,35 ± 0,31 *** n = 8	1,19 ± 0,27 ** n = 10	0,37 ± 0,16 * n = 10 ^{ooo}	0,19 ± 0,07 *** n = 10 ^{ooo}
Saure Phosphatase	837 ± 160 n = 10	908 ± 214 n = 8	836 ± 133 n = 10	784 ± 199 n = 10	874 ± 112 n = 10
Katalase	58,3 ± 14,4 n = 10	50,5 ± 19,9 n = 8	41,5 ± 13,9 * n = 10	32,2 ± 8,53 *** n = 10 ^o	39,8 ± 6,77 ** n = 10
Alaninaminotransferase	2471 ± 428 n = 10	4106 ± 1435* n = 8	4578 ± 2098** n = 10	3282 ± 2547 n = 10	3565 ± 1970** n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	369 ± 204 n = 10	351 ± 212 n = 8	522 ± 232 n = 10	639 ± 382 n = 8 ^o	753 ± 291** n = 10 ^{oo}
Phosphofruktokinase	110 ± 68,9 n = 10	104 ± 53,5 n = 8	166 ± 83,3 n = 10	137 ± 89,9* n = 8	131 ± 40,9 n = 10
Malatenzym	187 ± 55,9 n = 10	97,8 ± 56,7** n = 8	411 ± 153*** n = 10	210 ± 157 n = 8 ^o	270 ± 165 n = 10 ^o
Hexokinase	26,6 ± 19,7 n = 10	40,1 ± 21,1* n = 8	26,5 ± 9,4 n = 10	27,5 ± 13,6 n = 8	42,4 ± 27,3** n = 10
Esterase	5465 ± 4404 n = 10	5586 ± 2570 n = 8	2382 ± 1266** n = 10	5260 ± 3645 n = 8	5035 ± 1168 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: *p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^op< 0,05, ^{oo} p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 30 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 23 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Nov. '98	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	83049 ± 13349 n = 10	81126 ± 15900 n = 8	66205 ± 9274* n = 10	82011 ± 13952 n = 10	84225 ± 16602 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	7938 ± 697 n = 10	7135 ± 527* n = 8	7571 ± 880 n = 10	8595 ± 879 n = 10 ^{oo}	8689 ± 821* n = 10 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	277 ± 35,4 n = 10	293 ± 69,4 n = 8	337 ± 75,6 * n = 10	247 ± 91,3 n = 8	229 ± 28,8 ** n = 10
Succinatdehydrogenase	493 ± 158 n = 158	416 ± 100 n = 8	481 ± 147 n = 10	380 ± 214 n = 8	337 ± 95,6 * n = 10
Citratsynthase	43,7 ± 15,0 n = 10	58,3 ± 11,9 n = 8	65,8 ± 19,3 * n = 10	16,6 ± 5,95*** n = 10 ^{ooo}	9,42 ± 5,86 *** n = 10 ^{ooo}
Saure Phosphatase	38543 ± 11117 n = 10	40619 ± 13683 n = 8	44070 ± 8788 n = 10	33072 ± 12995 n = 8	40982 ± 10453 n = 10
Katalase	92,8 ± 26,6 n = 10	152 ± 79,2 * n = 8	99,3 ± 32,0 n = 10	90,9 ± 42,9 n = 8	105 ± 41,9 n = 10
Alaninaminotransferase	91799 ± 25244 n = 10	148299 ± 20001*** n = 8	145919 ± 48774* n = 10	116706 ± 59765 n = 10	89654 ± 38562 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	10572 ± 3996 n = 10	10578 ± 4118 n = 8	16837 ± 5499 n = 10	9221 ± 5913 n = 8	14922 ± 4114 n = 10 ^o
Phosphofruktokinase	3153 ± 1184 n = 10	3810 ± 2455 n = 8	5107 ± 1370* n = 10	4297 ± 2092 n = 10	3361 ± 1237 n = 10
Malatenzym	7098 ± 2585 n = 10	8334 ± 3036 n = 8	13531 ± 3405** n = 10	8114 ± 4896 n = 8	7413 ± 2640 n = 10
Hexokinase	706 ± 236 n = 10	1353 ± 727 n = 8	878 ± 233 n = 10	852 ± 416 n = 8	822 ± 290 n = 10
Esterase	155010 ± 62406 n = 10	199380 ± 85596 n = 8	74544 ± 26649 *** n = 10	150751 ± 98783 n = 8	127610 ± 54735 n = 10 ^o

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ^o p< 0,05, ^{oo} p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 31 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Mai'99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	532 ± 148 n = 8	664 ± 158 n = 8	357 ± 103 n = 8	412 ± 152 n = 8 ^{oo}	582 ± 240 n = 8
Cytochrom c-Oxidase	56,1 ± 20,9 n = 8	44,0 ± 8,61 n = 8	27,6 ± 10,0 ** n = 8	36,1 ± 11,4* n = 8	52,6 ± 21,3 n = 6
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	19,3 ± 2,77 n = 10	21,6 ± 1,97* n = 10	18,1 ± 3,58 n = 10	14,0 ± 4,09** n = 10 ^{oo}	23,35 ± 7,82 n = 10
Succinatdehydrogenase	24,4 ± 4,14 n = 10	19,4 ± 1,55** n = 10	20,7 ± 2,41 n = 10	23,6 ± 8,31 n = 10	20,86 ± 2,51 n = 10
Citratsynthase	1,27 ± 0,24 n = 10	1,98 ± 0,52*** n = 10	1,56 ± 0,34* n = 10	1,53 ± 0,81 n = 8	1,77 ± 0,46* n = 10
Saure Phosphatase	6351 ± 1398 n = 10	6491 ± 1486 n = 10	6620 ± 1882 n = 10	6974 ± 987 n = 10	6142 ± 1467 n = 10
Katalase	57,3 ± 9,68 n = 10	45,8 ± 7,53** n = 10	43,34 ± 7,53*** n = 10	52,19 ± 11,41 n = 10	44,8 ± 6,8** n = 10
Alaninaminotransferase	24449 ± 466 n = 10	4091 ± 881 n = 10	4244 ± 1444** n = 9	5953 ± 3835 n = 10	4292 ± 2547 n = 10
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	681 ± 203 n = 10	1236 ± 425** n = 10	1309 ± 918* n = 9	1519 ± 855** n = 10	788 ± 320 n = 10 ^o
Phosphofruktokinase	28,2 ± 10,0 n = 10	136 ± 43,3 n = 10	83,1 ± 47,5** n = 9	145 ± 144 n = 10	142 ± 68,1*** n = 10
Malatenzym	90,2 ± 54,6 n = 9	349 ± 67,2*** n = 9	264 ± 83,6*** n = 9	317 ± 253 n = 9	386 ± 160*** n = 9
Hexokinase	27,8 ± 14,3 n = 10	73,1 ± 20,6*** n = 10	56,5 ± 21,4** n = 9	74,2 ± 50,6* n = 10	60 ± 32,5** n = 10
Esterase	625 ± 190 n = 10	626 ± 211 n = 10	179 ± 74,6*** n = 9	904 ± 447 n = 10	912 ± 515 n = 9
Superoxiddismutase	23,8 ± 4,98 n = 10	28,0 ± 3,45** n = 10	21,8 ± 2,26 n = 10	24,55 ± 8,07 n = 10	25,86 ± 4,44 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Tieren der Versuchsbäche und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, **p<0,01;***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ° p< 0,05, °° p< 0,01, °°°p< 0,001

A-Tab. 32 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Mai' 99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	29640 ± 6848 n = 8	38008 ± 8547 n = 8	24134 ± 9904 n = 8	33736 ± 17325 n = 8 ^o	40107 ± 20001 n = 8
Cytochrom c-Oxidase	3086 ± 929 n = 8	2074 ± 464 n = 8	2112 ± 1340 n = 8	2914 ± 1437 n = 8	4426 ± 2626 n = 8
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	492 ± 74,5 ± 10	614 ± 104** n = 10	610 ± 129* n = 10	956 ± 498* n = 10	784 ± 143*** n = 10 ^{oo}
Succinatdehydrogenase	615 ± 60,2 n = 10	557 ± 131 n = 10	723 ± 220 n = 10	1453 ± 426** n = 10 ^{oo}	794 ± 377 n = 10
Citratsynthase	33,1 ± 9,8 n = 10	55,6 ± 13,1** n = 10	52,2 ± 11,9** n = 10	48,6 ± 27,9 n = 10	61,3 ± 13,2*** n = 10
Saure Phosphatase	163394 ± 47745 n = 10	180399 ± 36544 n = 10	232067 ± 102443 n = 10	495394 ± 254556** n = 9 ^{oo}	224270 ± 100292 n = 10
Katalase	1477 ± 351 n = 10	1455 ± 356 n = 9	1528 ± 553 n = 10	3533 ± 1716** n = 10 ^{oo}	1698 ± 748 n = 10
Alaninaminotransferase	72056 ± 19501 n = 10	150835 ± 30323*** n = 10	154800 ± 93549* n = 10	300450 ± 242428* n = 9	216212 ± 167278* n = 9
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	18210 ± 4827 n = 12	45342 ± 14608*** n = 10	42324 ± 15022*** n = 10	49505 ± 32657 n = 10	45994 ± 19655** n = 10
Phosphofruktokinase	850 ± 441 n = 10	5082 ± 1713 n = 10	2569 ± 1567 n = 10	15090 ± 3967 n = 10	8770 ± 4577** n = 10
Malatenzym	2504 ± 1257 n = 10	13009 ± 3125*** n = 10	9793 ± 6310*** n = 10	20078 ± 17097 n = 9	22915 ± 11870*** n = 9
Hexokinase	800 ± 332 n = 10	2682 ± 615*** n = 10	1970 ± 958** n = 10	2943 ± 2346 n = 10	3917 ± 1836*** n = 10
Esterase	17809 ± 4180 n = 10	20840 ± 5752 n = 10	6503 ± 3160*** n = 10	31655 ± 18381 n = 10	54737 ± 29454** n = 9 ^o
Superoxiddismutase	617 ± 183 n = 10	792 ± 120** n = 10	744 ± 156 n = 10	1837 ± 1195** n = 10 ^{oo}	993 ± 542** n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Tieren der Versuchsbäche und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland: ° p< 0,05, °° p< 0,01, °°°p< 0,001

A-Tab. 33 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU/ mg Protein

Probennahme:	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Juli'99					
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	211 ± 78 n = 9	152 ± 49 n = 9	217 ± 81 n = 10	318 ± 137 n = 7 ^{oo}	255 ± 154 n = 10 ^{oo}
Cytochrom c-Oxidase	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	20,99 ± 7,83 n = 10	32,54 ± 12,02* n = 10	9,96 ± 2,13*** n = 10	8,22 ± 3,04*** n = 10 ^{ooo}	7,37 ± 2,28*** n = 10 ^{ooo}
Succinatdehydrogenase	20,66 ± 5,30 n = 10	18,58 ± 10,02 n = 10	13,85 ± 8,87* n = 9	13,26 ± 3,61** n = 8	25,4 ± 4,69* n = 10
Citratsynthase	1,79 ± 0,55 n = 8	3,16 ± 1,06** n = 7	0,78 ± 0,32*** n = 10	1,56 ± 0,45 n = 10 ^{ooo}	1,85 ± 0,43 n = 10 ^{oo}
Saure Phosphatase	13146 ± 2618 n = 10	23910 ± 8762*** n = 10	11345 ± 3606 n = 10	6891 ± 2232*** n = 9 ^{oo}	6314 ± 2703*** n = 8 ^{oo}
Katalase	67,7 ± 25,1 n = 10	81,3 ± 27,5 n = 10	52,7 ± 16,9 n = 10	52,1 ± 21,8 n = 10 ^{oo}	63,3 ± 12,2 n = 10
Alaninaminotransferase	7073 ± 5952 n = 9	7135 ± 3602 n = 9	5172 ± 1290 n = 9	3901 ± 2472 n = 10 ^o	1604 ± 891*** n = 9 ^o
Glucose-6-P-Dehydrogenase	170 ± 79,9 n = 8	500 ± 250*** n = 9	266 ± 69,4* n = 10	218 ± 166 n = 10 ^{oo}	85,1 ± 27,3* n = 10 ^{ooo}
Phosphofruktokinase	323 ± 79,4 n = 8	341 ± 112 n = 10	192 ± 90,6** n = 9	98,5 ± 88,2*** n = 9 ^{oo}	76,1 ± 50,6*** n = 10 ^{ooo}
Malatenzym	2266 ± 1288 n = 8	10054 ± 3811*** n = 10	6279 ± 2703** n = 9	3774 ± 2233 n = 10 ^{oo}	2792 ± 1178*** n = 10 ^{ooo}
Hexokinase	60,6 ± 33,2 n = 9	56,1 ± 21,4 n = 10	43,0 ± 28,4 ± n = 9	28,7 ± 26,9* n = 7 ^o	21,04 ± 9,8*** n = 10 ^{ooo}
Esterase	3468 ± 2291 n = 8	11189 ± 3859*** n = 10	1559 ± 1476** n = 10	4086 ± 3029 n = 10 ^{ooo}	1444 ± 646** n = 10 ^{ooo}
Superoxiddismutase	88,2 ± 31,6 n = 10	132 ± 49,4* n = 10	51,3 ± 14,2*** n = 10	40,6 ± 13,6*** n = 10 ^{ooo}	36,6 ± 5,07*** n = 10 ^{ooo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001

A-Tab. 34 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Juli'99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	85054 ± 42840 n = 10	93122 ± 21774 n = 10	99045 ± 23395 n = 10	100888 ± 16288 n = 8	98012 ± 15965 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	589 ± 92 n = 10	624 ± 148 n = 10	471 ± 116 n = 10	753 ± 423 n = 10	408 ± 113** n = 10 ^{ooo}
Succinatdehydrogenase	623 ± 210 n = 10	545 ± 372 n = 10	544 ± 251 n = 9	880 ± 392* n = 8	961 ± 255** n = 10 ^{oo}
Citratsynthase	51,5 ± 24,3 n = 8	46,7 ± 21,5 n = 7	37,4 ± 16,2 n = 10	138 ± 61,0*** n = 10 ^{ooo}	69,2 ± 18,6 n = 10 ^{oo}
Saure Phosphatase	403774 ± 131317 n = 10	495623 ± 181926 n = 10	541768 ± 190897 n = 10	568893 ± 163412* n = 9	244254 ± 123035* n = 8 ^{oo}
Katalase	2343 ± 883 n = 10	1891 ± 716** n = 10	1411 ± 428*** n = 10	4681 ± 1885*** n = 10 ^{ooo}	2341 ± 335 n = 10 ^{ooo}
Alaninaminotransferase	144078 ± 84219 n = 9	315510 ± 137553 n = 9	311380 ± 128673*** n = 10	303161 ± 257053 n = 10	69104 ± 44781 n = 9
Glucose-6-P-Dehydrogenase	4705 ± 3106 n = 8	22533 ± 12329 n = 9	15357 ± 4914*** n = 10	11573 ± 8203* n = 10 ^o	3274 ± 1594** n = 10 ^{ooo}
Phosphofruktokinase	9724 ± 6455 n = 9	14897 ± 3156 n = 10	9483 ± 2375 n = 9	5495 ± 4019 n = 10 ^{ooo}	3040 ± 2108 n = 10 ^{oo}
Malatenzym	56982 ± 29444 n = 8	449095 ± 155589 n = 10	369513 ± 99712*** n = 9	318035 ± 210233** n = 10	116287 ± 55468*** n = 10
Hexokinase	1356 ± 720 n = 9	2748 ± 635 n = 10	2352 ± 887 n = 9	1670 ± 879 n = 10	886 ± 439 n = 10
Esterase	95705 ± 53798 n = 8	548928 ± 176895 n = 10	59648 ± 16443 n = 10	231990 ± 119140*** n = 10 ^{ooo}	55471 ± 20966*** n = 10 ^{ooo}
Superoxiddismutase	2524 ± 509 n = 10	2539 ± 648 n = 10	2385 ± 567 n = 10	3485 ± 1404 n = 10	1365 ± 203*** n = 10 ^{ooo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°° p < 0,001

A-Tab. 33 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der (*Barbatula barbatula*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / Protein

Probennahme: Mai'99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	1285 ± 586 n = 9	1092 ± 812 n = 8	936 ± 610 n = 8	915 ± 340 n = 9	798 ± 255 n = 10°
Cytochrom c-Oxidase	9,63 ± 2,55 n = 9	6,90 ± 4,40 n = 8	4,19 ± 3,09** n = 8°°°	4,96 ± 1,35 n = 10	8,55 ± 2,81* n = 8°°°
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	10,36 ± 4,46 n = 10	14,9 ± 4,6* n = 10	13,8 ± 2,73 n = 9	11,9 ± 5,83 n = 10	20,3 ± 9,86* n = 10
Succinatdehydrogenase	14,1 ± 3,24 n = 10	19,8 ± 5,14** n = 10	13,6 ± 2,97 n = 9	14,4 ± 3,49 n = 10	22,6 ± 7,78* n = 10°
Citratsynthase	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Saure Phosphatase	21625 ± 10129 n = 6	37015 ± 14373 n = 9	22976 ± 8518 n = 9	25500 ± 9205 n = 10	30798 ± 15620 n = 10
Katalase	20,3 ± 9,3 n = 9	24,2 ± 6,79 n = 10	18,5 ± 5,33 n = 10	11,4 ± 5,28* n = 10°	18,8 ± 7,71 n = 10
Alaninaminotransferase	1814 ± 842 n = 9	2853 ± 1662 n = 9	777 ± 187*** n = 10	1087 ± 240* n = 10	1183 ± 479* n = 10°
Glucose-6-P-Dehydrogenase	350 ± 225 n = 10	322 ± 230 n = 9	212 ± 72 n = 7	131 ± 28* n = 10	118 ± 32 n = 10
Phosphofruktokinase	39,5 ± 23,9 n = 8	31,9 ± 19,0 n = 8	12,3 ± 5,42** n = 7	17,26 ± 6,12* n = 8°	19,03 ± 10,83** n = 9
Malatenzym	56,2 ± 26,8 n = 8	58,7 ± 27,3 n = 9	18,4 ± 10,1** n = 9	8,13 ± 3,2** n = 10°°°	13,0 ± 6,48*** n = 10
Hexokinase	9,32 ± 3,99 n = 8	13,6 ± 7,11 n = 9	4,88 ± 2,07* n = 10	4,16 ± 1,59 n = 8	5,39 ± 2,21* n = 7
Esterase	396 ± 144 n = 10	560 ± 246 n = 10	210 ± 46*** n = 10	266 ± 104 n = 8	433 ± 180 n = 8
Superoxiddismutase	18,0 ± 5,25 n = 9	16,32 ± 4,1 n = 10	17,06 ± 6,95 n = 9	12,9 ± 4,1* n = 10	20,5 ± 3,93 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass Körsch gegenüber Freiland: ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°°p < 0,001

A-Tab. 34 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der (*Barbatula barbatula*) nach 24 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Mai'99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	100592 ± 35334 n = 9	79185 ± 57561 n = 8	57716 ± 21913 n = 8	49223 ± 18989* n = 9	42081 ± 16078** n = 10
Cytochrom c-Oxidase	675 ± 130 n = 9	468 ± 311 n = 8	390 ± 383*** n = 8	317 ± 195** n = 10	435 ± 184* n = 8
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	747 ± 487 n = 10	882 ± 264 n = 10	839 ± 340 n = 9	675 ± 280 n = 10	600 ± 360 n = 10°
Succinatdehydrogenase	904 ± 277 n = 10	1142 ± 174 n = 10	777 ± 324 n = 9	878 ± 361 n = 10	694 ± 328 n = 10
Citratsynthase	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Saure Phosphatase	1507 ± 884 n = 6	1986 ± 708 n = 10	1311 ± 750 n = 10	1675 ± 579 n = 10	966 ± 533 n = 10
Katalase	1213 ± 534 n = 9	1458 ± 503 n = 10	1161 ± 547 n = 10	772 ± 473* n = 10°°	701 ± 289* n = 10°
Alaninaminotransferase	769571 ± 289081 n = 10	890740 ± 143291 n = 9	596844 ± 198522* n = 10	376535 ± 224648 n = 10	382752 ± 247655 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	123623 ± 79677 n = 10	97948 ± 35975 n = 9	119125 ± 76761 n = 10	48541 ± 25483 n = 10	39164 ± 19040 n = 10°
Phosphofruktokinase	20922 ± 9943 n = 8	11393 ± 3938** n = 8	7798 ± 2095** n = 7	6005 ± 2682** n = 8	8912 ± 4069** n = 9
Malatenzym	26446 ± 11546 n = 9	20592 ± 8451 n = 10	13748 ± 8735 n = 9	2936 ± 1236** n = 10°°°	5232 ± 2963** n = 10°
Hexokinase	4167 ± 1988 n = 10	4477 ± 1603 n = 9	3643 ± 1876 n = 10	1640 ± 970* n = 8°	1888 ± 794* n = 7
Esterase	185524 ± 94382 n = 10	228675 ± 92669 n = 10	152692 ± 44010 n = 10	135824 ± 121964 n = 8	129523 ± 75550 n = 8
Superoxiddismutase	74,2 ± 32,8 n = 9	54,4 ± 19,3 n = 10	75,3 ± 31,8 n = 9	65,4 ± 30,0 n = 10	53,3 ± 22,2 n = 10

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass Körsch gegenüber Freiland: ° p < 0,05, °° p < 0,01, °°°p < 0,001

A-Tab. 35 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 23 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: Nov '99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	1504 ± 647 n = 10	3069 ± 781** n = 10	2069 ± 733 n = 10	1557 ± 387 n = 10 ^{oo}	1131 ± 273 n = 10 ^{oo}
Cytochrom c-Oxidase	9,95 ± 4,84 n = 10	38,36 ± 11,73*** n = 10	24,23 ± 11,80** n = 10	24,10 ± 5,15*** n = 10 ^{oo}	20,26 ± 2,68*** n = 10 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	20,99 ± 7,83 n = 10	32,54 ± 12,02* n = 10	9,96 ± 2,13*** n = 10	8,22 ± 3,04*** n = 10 ^{oo}	7,37 ± 2,28*** n = 10 ^{oo}
Succinatdehydrogenase	12,0 ± 3,21 n = 10	12,27 ± 3,30 n = 10	11,38 ± 1,71 n = 10	9,47 ± 3,69 n = 10	11,38 ± 1,54 n = 10
Citratsynthase	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Saure Phosphatase	5411 ± 1767 n = 10	4915 ± 1938 n = 10	6675 ± 1109 n = 10	5149 ± 2023 n = 10	8428 ± 1158*** n = 10 ^{oo}
Katalase	31,07 ± 11,11 n = 10	28,29 ± 7,77 n = 10	29,39 ± 3,62 n = 10	22,48 ± 9,11 n = 10	39,96 ± 5,36 n = 10
Alaninaminotransferase	3297 ± 1020 n = 10	1806 ± 666** n = 10	3863 ± 3192 n = 10	10934 ± 7416* n = 10 ^{oo}	4812 ± 3508 n = 10 ^{oo}
Glucose-6-P-Dehydrogenase	1567 ± 709 n = 10	958 ± 221* n = 10	1688 ± 1087 n = 10	2700 ± 2047 n = 10	2230 ± 1795 n = 10
Phosphofruktokinase	158 ± 76,5 n = 10	109 ± 30,6 n = 10	203 ± 97,0 n = 10	514 ± 295* n = 10 ^{oo}	414 ± 254** n = 10 ^{oo}
Malatenzym	442 ± 218 n = 10	204 ± 80** n = 10	457 ± 307 n = 10	1081 ± 764 n = 10 ^{oo}	558 ± 386 n = 10
Hexokinase	24,03 ± 11,9 n = 10	27,7 ± 10,22 n = 10	40,29 ± 20,39 n = 10	85,68 ± 49,6** n = 10 ^{oo}	120 ± 107 n = 10
Esterase	1111 ± 371 n = 10	647 ± 187** n = 10	677 ± 176** n = 10	3054 ± 2748 n = 10 ^{oo}	2356 ± 1663 n = 10 ^{oo}
Superoxiddismutase	28,54 ± 6,11 n = 10	26,66 ± 6,04 n = 10	27,03 ± 4,67 n = 10	28,16 ± 8,97 n = 10	43,78 ± 6,22*** n = 10 ^{oo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen dem Labor und den Versuchsbächen wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland^o p< 0,05, ^{oo} p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 36 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) nach 23 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: Nov. 99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Krähenbach	Freiland Aich C
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	74351 ± 8566 n = 10	81750 ± 12465 n = 10	61272 ± 21083 n = 10	90357 ± 18454* n = 10	85465 ± 20646 n = 10
Cytochrom c-Oxidase	479 ± 214 n = 10	1085 ± 296 *** n = 10	625 ± 119 n = 10	1356 ± 174*** n = 10 ^o	1372 ± 89*** n = 10 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	205 ± 70 n = 10	197 ± 71 n = 10	598 ± 135*** n = 10	479 ± 118*** n = 10 ^{ooo}	309 ± 67** n = 10 ^{oo}
Succinatdehydrogenase	452 ± 123 n = 10	478 ± 71 n = 10	1035 ± 289*** n = 10	880 ± 191*** n = 10 ^{ooo}	414 ± 63 n = 10
Citratsynthase	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Saure Phosphatase	215921 ± 5264 n = 10	272997 ± 65559* n = 10	665165 ± 308690*** n = 10	442873 ± 98897*** n = 10 ^{oo}	287983 ± 67567* n = 10
Katalase	1155 ± 374 n = 10	1106 ± 205 n = 10	2707 ± 707*** n = 10	2166 ± 778** n = 10 ^{oo}	1462 ± 299* n = 10 ^o
Alaninaminotransferase	78178 ± 5108 n = 10	40290 ± 15718* n = 10	78767 ± 40107 n = 10	141442 ± 72286 n = 10 ^{oo}	97589 ± 77041 n = 10
Glucose-6-P-Dehydrogenase	26187 ± 6992 n = 10	21136 ± 4536 n = 10	34693 ± 10528 n = 10	28677 ± 12747*** n = 10	21656 ± 10296*** n = 10
Phosphofruktokinase	2849 ± 1545 n = 10	2517 ± 1005 n = 10	5602 ± 3135* n = 7	6452 ± 3320** n = 10 ^{oo}	4134 ± 1670* n = 10 ^o
Malatenzym	7623 ± 3396 n = 10	4604 ± 1934 n = 10	9144 ± 3091 n = 10	8968 ± 4719 n = 10 ^o	6630 ± 2605 n = 10
Hexokinase	408 ± 152 n = 10	494 ± 241 n = 241	993 ± 507* n = 10	998 ± 343** n = 10 ^{oo}	2181 ± 1546* n = 10 ^{oo}
Esterase	20671 ± 9453 n = 10	14061 ± 2768* n = 10	18412 ± 7825 n = 10	313331 ± 17285 n = 10 ^{oo}	23237 ± 7967 n = 10 ^{oo}
Superoxiddismutase	1085 ± 260 n = 10	1057 ± 239 n = 10	2444 ± 680*** n = 10	2658 ± 529*** n = 10 ^{ooo}	1606 ± 341** n = 10 ^{ooo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ g Organ ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen dem Labor und den Versuchsbächen wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001; Bypass Krähenbach gegenüber Freiland^o p< 0,05, ^{oo} p< 0,01, ^{ooo}p< 0,001

A-Tab. 37 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der (*Barbatula barbatula*) nach 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie im Labor. Bezug: mU / mg Protein

Probennahme: November ' 99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	4186 ± 1782 n = 10	4255 ± 1700 n = 10	3387 ± 1142* n = 10	2610 ± 910 n = 6	5141 ± 1545 n = 6
Cytochrom c-Oxidase	20,03 ± 10,68 n = 10	19,35 ± 6,55 n = 10	14,67 ± 9,43 n = 10	16,23 ± 5,22 n = 6	27,6 ± 6,7 n = 6 ^{oo}
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	3,99 ± 1,96 n = 10	2,76 ± 1,56 n = 10	2,58 ± 1,86 * n = 10	4,69 ± 1,36 n = 6	3,03 ± 0,79 n = 6
Succinatdehydrogenase	9,92 ± 2,4 n = 10	9,35 ± 2,66 n = 10	8,23 ± 2,8 n = 10	8,45 ± 2,05* n = 6	7,06 ± 1,56** n = 9 ^{ooo}
Citratsynthase	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Saure Phosphatase	21284 ± 4787 n = 10	22460 ± 8727 n = 10	17500 ± 10671 n = 10	12087 ± 7374* n = 10 ^{oo}	10455 ± 2905** n = 10 ^o
Katalase	8,76 ± 5,69 n = 10	7,19 ± 6,40 n = 10	4,71 ± 3,55 n = 10	6,14 ± 1,91 n = 6	19,09 ± 3,85** n = 9 ^{oo}
Alaninaminotransferase	4468 ± 2041 n = 10	4042 ± 1828 n = 10	6995 ± 2723 n = 10	1943 ± 743* n = 6 ^o	2748 ± 1376 n = 9
Glucose-6-P-Dehydrogenase	220 ± 106 n = 10	244 ± 130 n = 10	279 ± 172 n = 10	92 ± 27,01* n = 6 ^o	180 ± 81 n = 9
Phosphofruktokinase	180 ± 170 n = 10	176 ± 156 n = 10	173 ± 41,06 n = 10	85,14 ± 69,24 n = 6	136 ± 105 n = 9
Malatenzym	206 ± 95 n = 10	148 ± 78 n = 10	298 ± 244 n = 10	37 ± 25** n = 6 ^o	94 ± 75* n = 9
Hexokinase	46,73 ± 24,36 n = 10	57,86 ± 32,49 n = 10	86,52 ± 58,42* n = 10	70,09 ± 38,59 n = 6	31,91 ± 16,52 n = 9 ^o
Esterase	3023 ± 886 n = 10	3102 ± 687 n = 10	2709 ± 559 n = 10	2741 ± 1256 n = 10	2648 ± 1463 n = 9
Superoxiddismutase	30,56 ± 5,54 n = 10	35,19 ± 15,42 n = 10	34,22 ± 10,24 n = 10	22,55 ± 5,05* n = 6 ^{oo}	19,77 ± 6,23** n = 10 ^{oo}

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass gegenüber Freiland: ^o p < 0,05, ^{oo} p < 0,01, ^{ooo} p < 0,001

A-Tab. 38 Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme der Bachschmerle (*Barbatula barbatula*) nach 13 Wochen Exposition gegenüber den belasteten Bächen Krähenbach und Körsch sowie dem Labor. Bezug: mU / g Organ

Probennahme: November ' 99	Labor	Krähenbach	Körsch	Freiland Körsch A	Freiland Körsch E
Gehirn:					
Acetylcholinesterase	102871 ± 24282 n = 10	99430 ± 18041 n = 10	89451 ± 26105 n = 8	138636 ± 28766 n = 6 ^{oo}	103215 ± 24928 n = 6
Cytochrom c-Oxidase	489 ± 136 n = 10	442 ± 62 n = 10	431 ± 353 n = 8	858 ± 148* n = 6 ^{oo}	565 ± 144 n = 6 ^o
Leber:					
Cytochrom c-Oxidase	129 ± 89 n = 10	76 ± 55 n = 10	85 ± 60 n = 8	235 ± 43 n = 6 ^{ooo}	153 ± 73 n = 6
Succinatdehydrogenase	208 ± 73 n = 10	332 ± 139* n = 10	257 ± 61 n = 8	474 ± 87 n = 6 ^{oo}	339 ± 147* n = 6
Citratsynthase	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Saure Phosphatase	586771 ± 146124 n = 10	772349 ± 206113 n = 10	471808 ± 216247 n = 8	588587 ± 329983 n = 6	453927 ± 109012 n = 6
Katalase	301 ± 196 n = 10	390 ± 300 n = 10	248 ± 180 n = 8	285 ± 149 n = 6	510 ± 247 n = 6
Alaninaminotransferase	95404 ± 29511 n = 10	60411 ± 16462* n = 10	101087 ± 40362 n = 8	64994 ± 16383* n = 6 ^{oo}	76013 ± 32897 n = 6
Glucose-6-P-Dehydrogenase	5519 ± 2433 n = 10	3380 ± 941* n = 10	3565 ± 1531 n = 8	3535 ± 2153 n = 6	4228 ± 1580 n = 6
Phosphofruktokinase	3285 ± 2898 n = 10	1560 ± 749 n = 10	2360 ± 1309 n = 7	2636 ± 1709 n = 6	2714 ± 1714 n = 6
Malatenzym	5133 ± 2087 n = 10	2955 ± 1049* n = 10	3093 ± 1353* n = 8	1261 ± 613*** n = 6 ^{oo}	1830 ± 1053*** n = 6 ^o
Hexokinase	439 ± 204 n = 10	442 ± 62 n = 10	431 ± 353 n = 8	2300 ± 919** n = 6 ^{ooo}	941 ± 520* n = 6 ^{ooo}
Esterase	74233 ± 38045 n = 10	72566 ± 15663 n = 10	53731 ± 20424 n = 8	52899 ± 21344 n = 6	60805 ± 24126 n = 10
Superoxiddismutase	889 ± 376 n = 10	1183 ± 363 n = 10	972 ± 206 n = 8	1143 ± 216 n = 6	835 ± 227 n = 6 ^o

Daten als Mittelwerte der Enzymaktivität in mU/ mg Protein ± Standardabweichung in n Proben. Signifikanzunterschiede zwischen den Versuchsbächen und dem Labor wurden mit dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test ermittelt: * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001; Bypass gegenüber Freiland: ^o p < 0,05, ^{oo} p < 0,01, ^{ooo} p < 0,001