



Fomin • Oehlmann • Markert

Praktikum zur Ökotoxikologie

Grundlagen und Anwendungen
biologischer Testverfahren



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Aus technischen Gründen bleibt diese Seite leer

Fomin • Oehlmann • Markert

Praktikum zur
Ökotoxikologie

Aus technischen Gründen bleibt diese Seite leer

Fomin • Oehlmann • Markert

Praktikum zur Ökotoxikologie

Grundlagen und Anwendungen
biologischer Testverfahren



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Verfasser:

PD Dr. Anette Fomin, Prof. Dr. Jörg Oehlmann, Prof. Dr. Bernd Markert

Mit einem Beitrag von PD Dr. Hans Toni Ratte

Unter der Mitarbeit von: Dipl.-Biol. M. Duft, Dr. D. Elsner, Dr. H. Moser, Dr. Ch. Pickl, Dr. U. Schulte-Oehlmann, Dr. M. Oetken, Dipl.-Biol. M. Tillmann, Dipl.-Ing. C. Turgut, S. Ziebart

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2003 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

ISBN 978-3-527-32125-4

Vorwort

Die Ökotoxikologie hat als wissenschaftliche Querschnittsdisziplin in den letzten beiden Jahrzehnten nicht nur in deutschsprachigen Hochschulen zielstrebig Einzug gehalten. Auch Behörden, Verwaltung, Forschungseinrichtungen, Industrieunternehmen und in vereinfachter Form auch die gymnasialen Oberstufen haben sich zunehmend mit Fragen zur Wirkungsforschung ökologisch relevanter Chemikalien zu beschäftigen. Ein Grund hierfür ist, dass sich die Gefährdungsabschätzung einer global ansteigenden und kaum mehr zu beziffernden Anzahl von Schadstoffen allein über Konzentrationsbetrachtungen in einzelnen Umweltmedien und ihren Biozönosen als unzureichend erwies. Vielmehr rückten für eine moderne Risikobewertung auch echte Wirkungsbetrachtungen bei Organismen bzw. Populationen auf der biochemischen, genetischen und physiologischen Ebene mehr und mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Zahlreiche hierzu erschienene Lehrbücher geben deutlich Zeichen für das zunehmende Bemühen, die Ökotoxikologie grundlagen- und anwendungsseitig auf einen problemorientierten, wissenschaftlich fundierten Weg zu bringen. Durch die Etablierung der „Society of Environmental Toxicology and Chemistry“ (SETAC) auf internationaler und nationaler Ebene ist es gelungen, unterschiedliche Interessenvertreter aus öffentlichen Forschungs- und Bildungseinrichtungen, Industrie und öffentlicher Verwaltung in jährlichen Tagungen und Kongressen zusammenzubringen und einen Dialog zu ermöglichen. Diese enge Zusammenarbeit hat die Kenntnisse über Schadstoffwirkungen enorm verbessert und zu einer umfangreichen Methodenentwicklung geführt. Um so erstaunlicher ist daher die Tatsache, dass für eine angewandte, experimentelle Wissenschaft eine Anleitung für ein ökotoxikologisches Praktikum auf dem (deutschsprachigen) Buchmarkt nicht zur Verfügung steht. Über die Ursachen mag spekuliert werden, doch steht wohl fest, dass damit eine wesentliche Lücke zumindest in der universitären Ausbildung besteht, die wir nun gemeinsam mit dem ecomed-Verlag, Landsberg, zu schließen versuchen.

Gleichwohl kann und will unser Praktikumsbuch aufgrund der Fokussierung auf die praktischen Aspekte keinen der teilweise hervorragenden Buchtitel auf dem Lehrbuchsektor der Ökotoxikologie ersetzen. Ganz im Gegenteil versteht es sich als notwendige Ergänzung zur theoretischen Aufarbeitung der komplexen und hoch dynamischen Gesamtthematik Ökotoxikologie. Neben der Erfahrung beim Experimentieren mit lebenden Testorganismen und der Fähigkeit zur spezifischen Laboruntersuchung soll darüber hinaus auch zum pfleglichen und nachhaltigen Umgang mit natürlichen Lebensprozessen angeregt werden. Im Vergleich zu einem Lehrbuch treten durch die mehr oder weniger systematische Aufzählung hintereinander gereihter Laborexperimente Gesamtzusammenhänge, wie sie eigentlich im Wesen der ökologischen und ökotoxikologischen Wissenschaften liegen, zwangsläufig in den Hintergrund. Vielmehr sind gerade hierzu die Grundlagen aus Lehre und Praxis zwingend gemeinsam zu betrachten.

Per Definition befasst sich die Ökotoxikologie mit wissenschaftlichen Grundlagen und Methoden, um Störungen von Ökosystemen durch anthropogene stoffliche Einflüsse zu identifizieren, zu beurteilen und zu bewerten. Vorrangiges Ziel ist es, Schäden zu vermeiden, zu erkennen und Handlungsanweisungen für die Sanierung zu erarbeiten. Hierfür wurden in den letzten Jahren wertvolle Methoden und Verfahren entwickelt. Sie sind

teilweise aus Nachbardisziplinen wie zum Beispiel der Ökologie oder aus verwandten Wissenschaftszweigen wie etwa der Physiologie oder Biochemie entlehnt oder weiterentwickelt worden. Häufig war es aufgrund der Neuartigkeit des Arbeitsgebietes aber auch notwendig, vollkommen andere Teststrategien zu etablieren. Mittlerweile liegt zur vorläufigen Bewertung von Einzelstoffen ein anerkanntes Spektrum von Biotestverfahren vor. So hat sich die Datenlage bei den Pflanzenschutzmitteln, ähnlich wie im Bereich wassergefährdender Stoffe, entscheidend verbessert.

Aus dem gesamten Spektrum an Biotestverfahren wird durch die Auswahl einiger weniger in unserem Praktikumbuch nur ein gewisses Fenster heutiger Methoden wiedergegeben, die aber methodisch/didaktisch wie auch inhaltlich exemplarisch für andere stehen. Die Auswahl an Testverfahren unterliegt teilweise der eingeschränkten Expertise der Verfasser bzw. entsprang subjektiven Kriterien der jeweiligen eigenen Forschungsumgebung und inhaltlichen Ausrichtung unserer Arbeitsgruppen. Daher wurden besonders solche Versuche von den Verfassern bevorzugt dargestellt, die von ihnen selbst an verschiedenen deutschen Universitäten in den letzten Jahren erprobt (z. B. Wachstumstest mit *Lemna minor*, Kapitel 14), modifiziert (z. B. Keimungs- und Wurzellängenhemmtest mit *Lepidium sativum*, Kapitel 16) oder eben auch vollkommen neu entwickelt wurden (z. B. Reproduktionstest mit *Potamogeton amplipodum*, Kapitel 10).

Das gesamte Praktikumbuch ist in zwei größere Abschnitte geteilt. Der erste Abschnitt beschäftigt sich in fünf Kapiteln mit generellen Grundlagen ökotoxikologischer Testverfahren. Hierzu gehören gängige Begriffsbestimmungen, Anforderungen an Testverfahren und ihre Durchführung, die Normung von Testverfahren und deren Einbeziehung in entsprechende Umweltgesetze. Die ökologische Relevanz und Wirkung von Schadstoffen in der Umwelt wird an Beispielen der Schwermetalle, der Pflanzenschutzmittel und hormonähnlicher Substanzen dargestellt. Einen besonderen Schwerpunkt bildet die Abhandlung der statistischen Bearbeitung ökotoxikologischer Testverfahren. Dieses Kapitel wurde von Herrn Privatdozenten Hans Toni Ratte, RWTH Aachen, erarbeitet und gibt einen Überblick über Datenanalyse, Datenaufbereitung, gängige statistische Testverfahren und mögliche Fehlerquellen bei der Bearbeitung und Auswertung von Biotestergebnissen. Mit einigen Bemerkungen und Anregungen zur organisatorischen Planung des Praktikums wird der erste Abschnitt abgeschlossen. Neben sicherheitstechnischen und tierschutzrechtlichen Anmerkungen werden einige Ausführungen zur Anfertigung eines Protokolls gemacht sowie der zeitliche Umfang jedes einzelnen beschriebenen Versuchs angegeben.

Der zweite Abschnitt beinhaltet die Beschreibung von 17 Testverfahren mit Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen. Die einzelnen Kapitel sind so organisiert, dass zunächst der Testorganismus charakterisiert wird. Nach einer kurzen Beschreibung der Anwendungsbereiche in der täglichen Praxis werden im praktischen Teil an Hand eines konkreten Experimentes notwendige Hinweise zum Testaufbau, der Testdurchführung und zur Ergebnisauswertung gegeben. Außerdem werden bei zahlreichen Versuchen Zusatzinformationen über methodische Feinheiten und „Insiderwissen“ aufgeführt, die im Text gesondert hervorgehoben sind.

Das Schlusskapitel bildet die Auflistung relevanter Literatur in Form von Lehr- bzw. Fachbüchern zur Ökologie, Ökotoxikologie und Biostatistik sowie eine Übersicht über aktuelle Zeitschriften.

Die Erstellung dieses Buches war nicht ohne Hilfe von Wissenschaftlern und Mitarbeitern verschiedener Institutionen machbar. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Ratte für die Erarbeitung des Statistikkapitels sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen in Zittau, Frankfurt und Hohenheim, die durch ihre Zuarbeit einen wesentlichen Anteil an der Gestaltung der einzelnen Praktikumsversuche hatten. Wir freuen uns besonders, dass zahlreiche Wissenschaftler aus dem In- und Ausland dankenswerterweise Bildmaterial zur Verfügung gestellt haben. Wir möchten uns außerdem bei Herrn Dr. Nusch, Frau Dr. Windgasse und Herrn Dr. Höss für die kritische Durchsicht einiger Kapitel sowie bei Frau Smoczyńska, Frau Dr. Mosig und Herrn Zimmermann für die Erstellung von Computergrafiken sowie für das Korrekturlesen bedanken. Unser Dank gilt dem ecomed-Verlag für die uneingeschränkte Bereitschaft ein deutschsprachiges Lehrbuch auf den Markt zu bringen und insbesondere dem Lektor Herrn Schmid für die unkomplizierte Zusammenarbeit und Unterstützung.

Stuttgart-Hohenheim, Frankfurt/Main, Zittau, Februar 2003

Anette Fomin, Jörg Oehlmann, Bernd Markert

Aus technischen Gründen bleibt diese Seite leer

Inhaltsverzeichnis

Vorwort

1	Einführung in ökotoxikologische Testverfahren	1
1.1	Definition und Einteilung	1
1.2	Prinzip und Durchführung ökotoxikologischer Testverfahren	9
1.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	11
1.4	Anforderungen an Testorganismen	13
2	Normungen und Anwendungen	17
2.1	Nationale und internationale Normungsarbeit	17
2.2	Anwendungsgebiete in der Umweltgesetzgebung	20
2.3	Spezielle Entwicklungen und Anwendungen von Testverfahren	24
3	Eintrag und Wirkungen ausgewählter Schadstoffe	29
3.1	Eintrag von Schadstoffen in Umweltmedien	29
3.2	Wirkungsweise von Schwermetallen, Pestiziden und endokrinen Disruptoren	36
4	Statistik für ökotoxikologische Testverfahren	45
4.1	Der Typ des biologischen Merkmals und das Testdesign sind entscheidend	45
4.2	Datenanalyse und Datenaufbereitung	48
4.3	Hypothesen-Tests – Wann ist etwas signifikant?	51
4.4	Hypothesen-Tests – Wann wird welcher Test angewendet?	54
4.5	Punktschätzung – Ermittlung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen	62
4.6	Zitierte Literatur	64
5	Organisatorische Planung des Praktikums	65
5.1	Sicherheit im Labor	65
5.2	Verwendete Testorganismen	67
5.3	Konzept der Versuche und Anfertigung eines Protokolls	68
5.4	Zeitliche Planung der Praktikumsversuche	69

Tests mit wirbellosen Tieren

6	Akuttoxizitätstest mit <i>Daphnia magna</i>	73
6.1	Charakterisierung des Testorganismus	73
6.2	Anwendungsbereiche	75
6.3	Experiment: Letale Wirkung von Cadmium auf <i>Daphnia magna</i>	76
7	Regenwurmtest mit <i>Eisenia fetida</i>	81
7.1	Charakterisierung des Testorganismus	81
7.2	Anwendungsbereiche	83
7.3	Experiment: Wirkung von schwermetallbelasteten Böden auf die Sterblichkeit und den Reproduktionserfolg von <i>Eisenia fetida</i>	84
8	Sediment-Toxizitätstest mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	91
8.1	Charakterisierung des Testorganismus	91
8.2	Anwendungsbereiche	93
8.3	Experiment: Wirkung von Freilandsedimenten auf Längenwachstum, Fruchtbarkeit sowie Reproduktion von <i>Caenorhabditis elegans</i>	94
9	Verhaltenstest mit <i>Lumbricus rubellus</i>	103
9.1	Charakterisierung des Testorganismus	103
9.2	Anwendungsbereiche	104
9.3	Experiment: Meidungsverhalten von <i>Lumbricus rubellus</i> nach Cadmiumbelastung ..	104
10	Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	111
10.1	Charakterisierung des Testorganismus	111
10.2	Anwendungsbereiche	113
10.3	Experiment: Wirkung von Nonylphenol auf die Fortpflanzungsleistung von <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	113
11	Life cycle-Sedimenttoxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i>	119
11.1	Charakterisierung des Testorganismus	119
11.2	Anwendungsbereiche	120
11.3	Experiment: Wirkung von Tributylzinnchlorid auf den Lebenszyklus von <i>Chironomus riparius</i>	121

12 Häutungstest mit <i>Calliphora erythrocephala</i> auf Steroidhormone	129
12.1 Charakterisierung des Testorganismus	129
12.2 Anwendungsbereiche	132
12.3 Experiment: Wirkung von Methyltestosteron und Ethinylöstradiol auf die Verpuppung von <i>Calliphora erythrocephala</i>	133

Tests mit niederen und höheren Pflanzen

13 Hemmung der Zellvermehrung von <i>Chlorella vulgaris</i>	139
13.1 Charakterisierung des Testorganismus	139
13.2 Anwendungsbereiche	140
13.3 Experiment: Wirkung von Kupfer auf das Zellwachstum von <i>Chlorella vulgaris</i>	141
14 Wachstumshemmtest mit <i>Lemna minor</i>	149
14.1 Charakterisierung des Testorganismus	149
14.2 Anwendungsbereiche	151
14.3 Experiment: Wirkung von 3,5-Dichlorphenol auf das Wachstum und die Frondgröße von <i>Lemna minor</i>	152
15 Toxizitätstest mit <i>Myriophyllum aquaticum</i>	159
15.1 Charakterisierung des Testorganismus	159
15.2 Anwendungsbereiche	160
15.3 Experiment: Wirkung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf Sprosslängenzuwachs und Pigmentgehalt von <i>Myriophyllum aquaticum</i>	161
16 Keimungs- und Wurzellängentest mit <i>Lepidium sativum</i>	167
16.1 Charakterisierung des Testorganismus	167
16.2 Anwendungsbereiche	167
16.3 Experiment: Wirkung von Cadmium auf Keimrate und Wurzellänge von <i>Lepidium sativum</i>	168
17 Kleinkerntest mit <i>Tradescantia spec.</i> (Trad-MCN-Test)	173
17.1 Charakterisierung des Testorganismus	173
17.2 Anwendungsbereiche	174

17.3	Experiment: Wirkung von Arsen auf die Bildung von Kleinkernen in Pollenmutterzellen von <i>Tradescantia spec.</i>	175
18	Staubhaartest mit <i>Tradescantia spec.</i> (Trad-SHM-Test).....	181
18.1	Charakterisierung des Testorganismus.....	181
18.2	Anwendungsbereiche.....	181
18.3	Experiment: Wirkung von Maleinsäurehydrazid auf die Anzahl an Pinkmutationen in Staubhaarzellen von <i>Tradescantia spec.</i>	182
19	Mutationstest mit <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	189
19.1	Charakterisierung des Testorganismus.....	189
19.2	Anwendungsbereiche.....	189
19.3	Experiment: Wirkung von Ethyl-Methansulfonat auf die Anzahl an Mutanten in Embryonen und den Sterilitätsgrad der Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	191

Tests mit Mikroorganismen

20	Leuchtbakterientest mit <i>Vibrio fischeri</i>.....	197
20.1	Charakterisierung des Testorganismus.....	197
20.2	Anwendungsbereiche.....	199
20.3	Experiment: Wirkung von Cadmium auf die Biolumineszenz von <i>Vibrio fischeri</i>	200
21	Gentoxizitätstest mit <i>Salmonella typhimurium</i> (umu-Test).....	207
21.1	Charakterisierung des Testorganismus.....	207
21.2	Anwendungsbereiche.....	208
21.3	Experiment: Wirkung von Gewässerproben auf die Induktion des SOS-Reparatursystems bei <i>Salmonella typhimurium</i>	208
22	Motilitätstest mit <i>Euglena gracilis</i>.....	215
22.1	Charakterisierung des Testorganismus.....	215
22.2	Anwendungsbereiche.....	216
22.3	Experiment: Einfluss von Cadmium auf die Bewegungsaktivität, die Bewegungsgeschwindigkeit und die Zellform von <i>Euglena gracilis</i>	217

23	Weiterführende Literatur zu Ökologie, Ökotoxikologie und Biostatistik	225
23.1	Auswahl von Büchern zur Ökologie	225
23.2	Auswahl von Büchern zur Ökotoxikologie	225
23.3	Auswahl von Büchern zur Biostatistik	226
23.4	Auswahl von Zeitschriften zur Ökotoxikologie	226
24	Stichwortverzeichnis	229
	Die Autoren	239

Aus technischen Gründen bleibt diese Seite leer

1 Einführung in ökotoxikologische Testverfahren

Die Testverfahren, auch Biotests oder Bioassays genannt, werden als kleines Einmalversuchsverfahren der Ökotoxikologie bezeichnet. Man kann mit ihnen in relativ kurzer Zeit erste Anhaltspunkte über die schädliche Wirkung einer Umweltchemikalie oder einer Umweltprobe erhalten und hieraus weiterführende Untersuchungen ableiten. Es ist zu beachten, dass ein Biotest in vielen wissenschaftlichen Disziplinen Anwendung findet und im weitesten Sinne alle Versuchsdurchführungen beinhaltet, bei denen eine zu untersuchende Fragestellung mit Organismen abgeklärt werden soll. So werden fördernde Wirkungen durch Vitamine oder Arzneimittel ebenso durch Biotests geprüft wie substanzvermittelte Wechselwirkungen zwischen Organismen. Im vorliegenden Buch wird der Biotest nur im Zusammenhang mit Schadstoffen betrachtet und daher als ökotoxikologisches Testverfahren bezeichnet.

Der Begriff „Schadstoff“ beinhaltet bereits seine potentiell schädigende Wirkung auf Organismen. Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493–1541), bekannt unter dem Namen Paracelsus, hat gesagt, dass die Menge eines aufgenommenen Stoffes ihn erst zum Schadstoff macht („dosis facit venenum“). So gibt es zahlreiche Beispiele für Stoffe, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich für einen Organismus lebensnotwendig sind, bei Überschreiten dieses Bereiches aber zu toxischen Wirkungen führen. Prinzipiell gilt, dass Ausprägung und Stärke einer Wirkung sowohl vom Stoff als auch vom Organismus abhängen und durch deren vielfältige Wechselwirkungen mit der abiotischen und biotischen Umwelt beeinflusst werden. In der Abbildung 1-1 ist ein ökotoxikologischer Wirkungskomplex dargestellt, der die ver-

schiedenen Abhängigkeiten einer Schadstoffwirkung wiedergibt.

Einen Bezug zum Ort des Auftretens stellt der Begriff der Umweltchemikalie her. Er ist als übergeordnete Bezeichnung für alle in die Umwelt emittierten Stoffe zu verstehen. Allerdings wirkt nicht jede Umweltchemikalie zwangsläufig auch schädigend auf Organismen. Umweltchemikalien können natürlicherweise oder durch menschliche Tätigkeit in die Umwelt gelangen, wobei man bei Letzterem von anthropogenen Stoffen spricht. Zu diesen gehören auch die Xenobiotika, die Fremdstoffe in der Umwelt darstellen, aber nicht unbedingt toxisch wirken müssen.

1.1 Definition und Einteilung

Ein ökotoxikologisches Testverfahren ist eine Methode, mit der unter Standardbedingungen im Labor die toxische Wirkung von Umweltchemikalien auf Organismen wie Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder auch auf komplexere Systeme, zum Beispiel ein Modellökosystem, untersucht werden kann.

Die Palette an Testorganismen in einem Biotest umfasst Mikroorganismen, niedere und höhere Pflanzen sowie niedere und höhere Tiere. Es wird die akute und chronische Toxizität von Schadstoffen und Schadstoffgemischen ermittelt, die sich bei den eingesetzten Organismen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen manifestiert. Die Wirkungskriterien können morphologische, physiologische, biochemische sowie genetische Parameter sein, oder sie

Stoff		Einwirkungen				Biologisches System	
Agens/Agonist		äußere Faktoren		innere Faktoren		Reagens/Rezeptor	
Struktur	Konzentration	abiotische	biotische	biozönotische	individuelle	Integration	Funktion
Haptophore	aktophore Gruppe + Dosis "Gifftigkeit"	Temperatur	Limitation	Stabilität	Alter	Biozönose	Regulation
Affinität		Licht	Competition	Resistenz	Geschlecht		
Effektivität	+ Dosis "Gifftigkeit"	Medium (pH, Matrix)	Predation	Immunität	Gewicht	Organismus	Heilung
			Parasitismus	Vorbelastung	Gesundheit	Organ	Adaptierung
		Aktion: z. B. Membranveränderung, Invasion, Enzymblockade				Zelle	Regeneration
		Reaktion: z. B. Metabolische Transformation, Exkretion, Eliminierung, Deponierung				Organell	Eliminierung
		Zerstörung von Strukturen Hemmung von Funktionen Wiederherstellung Heilung, Tod		akut subakut subletal letal		Membran/Enzym-system	Metabolisierung
		Art		Ausmaß		Molekül	Reaktivität
				Dauer			
Schädigungspotential		Auswirkungen				Schutzpotential	

Abb. 1-1: Ökotoxikologischer Wirkungskomplex zur Wechselbeziehung zwischen Schadstoff bzw. Schadstoffgemisch und Organismus bzw. Organismengruppe (Quelle: leicht verändert nach NüsCH, E. A. (1991); Ökotoxikologische Testverfahren – Anforderungsprofile in Abhängigkeit vom Anwendungszweck. – UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 12–15).

betreffen beispielsweise Verhaltensänderungen von Organismen. Die Einteilungsmöglichkeiten für Biotests sind vielfältig und beruhen auf der getesteten Organismengruppe oder den ermittelten Wirkungskriterien, der experimentellen Anordnung, der Zahl getesteter Arten, der biologischen Wirkung der Umweltchemikalie oder der Dauer des Tests.

Einteilung nach getesteter Organismengruppe und ermittelten Wirkungskriterien

Ökotoxikologische Testverfahren können nach ihrer verwendeten Organismengruppe eingeteilt werden. So spricht man beispielsweise von Bakterientest, Algentest, Daphnientest, Fischtest, Insektentest, Kressetest, Protozoentest, Regenwurmtest oder Schneckenentest. Eine andere Einteilungsmöglichkeit berücksichtigt das zu messende Wirkungskriterium, das in Anlehnung an die englische Bezeichnung „endpoint“ auch als

Endpunkt bezeichnet wird. In diesen Fällen werden die Verfahren zum Beispiel benannt als: Karzinogenitätstest, Mutagenitätstest, Schleimhaut-Reizungstest, Teratogenitätstest, Vitalitätstest, Zehrungstest, Keimungstest, Wachstumstest oder Mehrgenerationentest.

Einteilung nach experimenteller Anordnung

Ökotoxikologische Testverfahren werden häufig als statische Versuche durchgeführt. Bei der statischen Versuchsanordnung erfolgt eine einmalige Zugabe von Nährstoffen und der Testprobe zum Organismus, das heißt, ein Austausch findet nicht statt. Aufgrund dieser Vorgehensweise können Nebenwirkungen auftreten, die das Testergebnis beeinflussen können. Beispielsweise können Stoffwechselprodukte und Umwandlungsprodukte der Schadstoffe auftreten, die ihrerseits Wirkungen auslösen können, oder es können Veränderungen der Konzentration der Schadstoffe durch

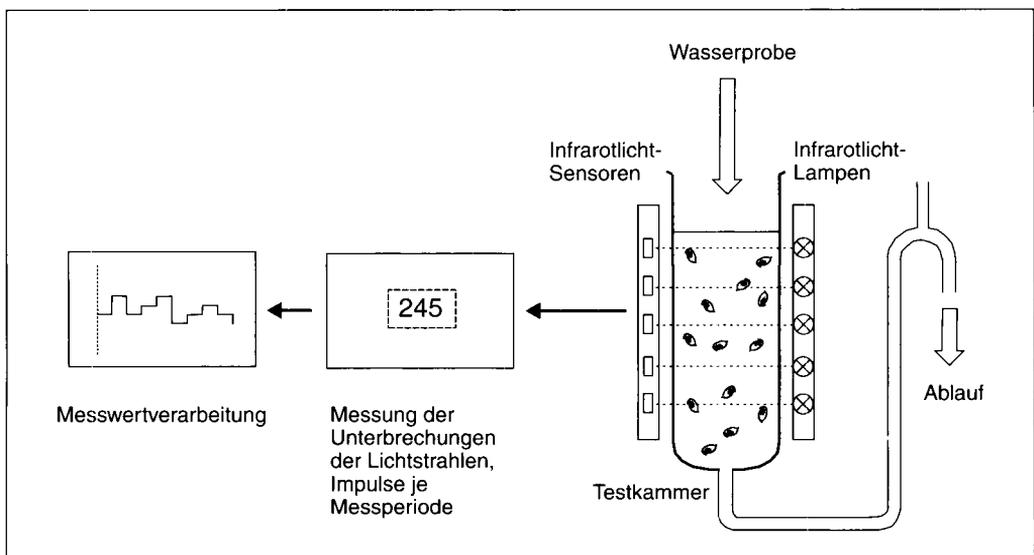


Abb. 1-2: Dynamischer Daphnien-Durchflusstest nach KNIE. Dargestellt ist eine Messkammer, in die Testwasser fließt. Die Schwimmaktivität der Daphnien wird mittels Infrarot-Lichtschranke registriert (Quelle: KNIE, J. (1978): Der dynamische Daphnientest – ein automatischer Biomonitor zur Überwachung von Gewässern und Abwässern. – Wasser und Boden 12, 310–312).

Adsorption an Organismen oder Versuchsgefäßen bzw. durch Abbau stattfinden.

Die genannten Nebenwirkungen werden minimiert, wenn eine semistatische Versuchsdurchführung angewendet wird. Hierbei wird bei aquatischen Testorganismen in größeren Zeitabständen das Testmedium mit den darin enthaltenen Nährstoffen und der Testprobe ausgetauscht. Wird dagegen die zu testende Wasserprobe oder der Schadstoff in einem ständigen Durchfluss im System gehalten, spricht man von dynamischen oder kontinuierlichen Testverfahren. Ein Beispiel hierfür ist der dynamische Daphnientest (Abbildung 1-2), bei dem in eine Testkammer gefiltertes, temperiertes Testwasser fließt und die Schwimmfähigkeit der Daphnien mittels Lichtschranke registriert wird. Dieser Test findet, wie auch weitere dynamische Testverfahren vor allem mit Fischen, in der kontinuierlichen Überwachung von Gewässern Anwendung. Hierbei ist es wichtig, dass die Verfahren sehr schnell ungünstige Situationen anzeigen. Die kontinuierliche Test-

durchführung ist daher häufig mit einer andauernden und zeitnahen Messanzeige gekoppelt, so dass man in diesen Fällen von online-Verfahren spricht. Langjährige Erfahrungen zur Überwachung von Fließgewässern liegen zum Beispiel mit dem *Dreissena*-Monitor vor, bei dem die Schließbewegung und der Öffnungszustand der Zebrauscheln über einen Magneten, der an der Schale der Muschel befestigt ist, als entweder/oder-Reaktion online gemessen wird. Toxische Stoffe im Wasser beeinflussen die Schließbewegung, so dass die online gemessenen Signale Hinweise auf die Anwesenheit dieser Stoffe liefern.

Einteilung nach der Zahl getesteter Arten

Bei vielen ökotoxikologischen Testverfahren wird jeweils nur eine biologische Art verwendet, so dass sie Einzel- oder Single-Spezies-Tests genannt werden. Werden dagegen Mehr-Arten-Testsysteme verwendet, spricht man von Multi-Spezies-Tests. Diese werden nicht wahllos, sondern in

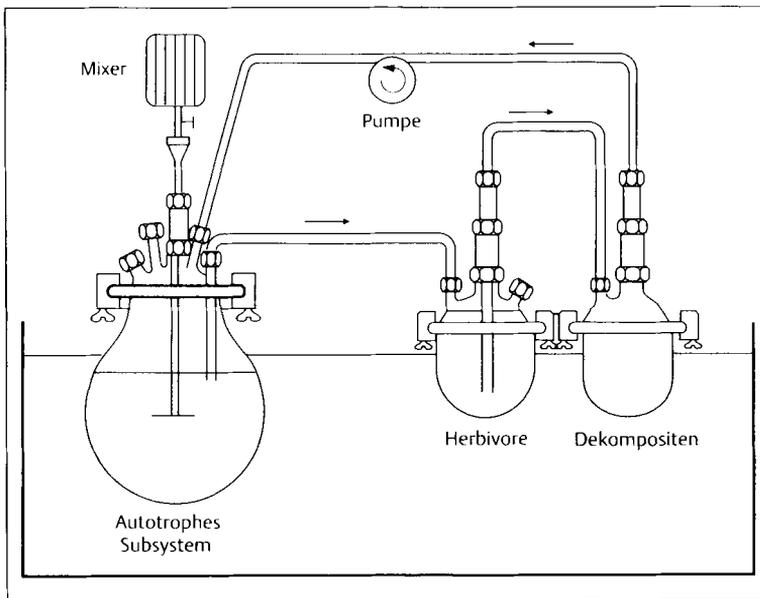


Abb. 1-3: Darstellung eines Mikrokosmos mit autotrophem Subsystem, bestehend aus Produzenten, Konsumenten und Destruenten, die in verschiedenen Gefäßen kultiviert werden und über ein Pumpsystem miteinander verbunden sind (Modifikation des Taub-Mikrokosmos) (Quelle: FENT, K. (1998): Ökotoxikologie. – Thieme, Stuttgart/New York).

Form eines Modellökosystems miteinander kombiniert. Dieser so genannte Mikrokosmos ist ein Ausschnitt bzw. Teil eines Ökosystems im Labormaßstab und besitzt wesentliche Eigenschaften von diesem wie Energiefluss, Stoffkreislauf und Artenvielfalt. In einem Mikrokosmos kann die Wirkung von Schadstoffen und Umweltproben beispielsweise auf die zeitlich unterschiedliche Entwicklung einer Phytozönose, auf Photosynthese- und Atmungsaktivitäten der verschiedenen Testarten oder auf die Bioakkumulation untersucht werden. Ein einfaches Labor-Modellökosystem stellt der Taub-Mikrokosmos dar (Abbildung 1-3). Hier wird eine Algenpopulation als Produzenten mit einer Zooplankton-Population als Konsumenten und Bakterien als Destruenten zusammengestellt. Auf diese Art und Weise können über einen kurzen Zeitraum durch Schadstoffe hervorgeru-

fene Veränderungen im Beziehungsgefüge untersucht werden. Es gibt zahlreiche Erweiterungen der Modellökosysteme, die allerdings hier nicht weiter betrachtet werden sollen.

Einteilung nach der biologischen Wirkung einer Testprobe

Unter der Wirkung wird einerseits die Toxizität, das heißt die Giftigkeit einer Probe verstanden, andererseits stellt auch die Akkumulation eines Stoffes eine Wirkung dar. Man unterscheidet Wirkungstest und Akkumulationstest. Die meisten ökotoxikologischen, vor allem akuten Testverfahren sind Wirkungstests, bei denen als Messparameter physiologische, biochemische oder morphologische Veränderungen von Organismen untersucht werden.

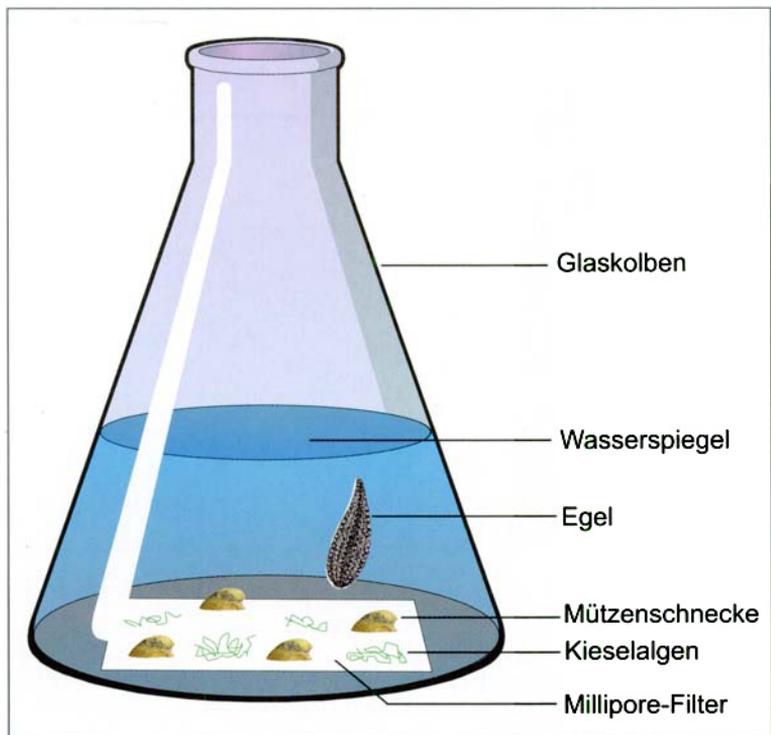


Abb. 1-4: Darstellung einer Labornahrungskette, bestehend aus Kieselalgen (*Nitzschia actinastroides*), der Mützenschnecke als Weidegänger (*Ancylus fluviatilis*) und einem räuberischen Egel (*Glossiphonia complanata*).

Mit Wirkungstests vergleichbare Akkumulationstests an einzelnen Organismen sind bislang kaum entwickelt worden, da die Untersuchung zur Bioakkumulation häufig zu Fehlbewertungen führt, wenn keine ökosystemrelevanten Schadstoffkonzentrationen eingestellt werden. Allerdings werden Akkumulationstests an Labornahrungsketten in Mikrokosmen praktiziert. In der Abbildung 1-4 ist eine Nahrungskette, bestehend aus Kieselalgen, der Mützenschnecke und einem räuberischen Egel, dargestellt. Zunächst werden die Kieselalgen in einer Suspensionskultur mit der Probe belastet. Anschließend werden die Algen auf Membranfilter aufgetragen und dienen der Mützenschnecke als Futter. Diese wiederum werden von den Egel gefressen. Obwohl der Versuch in getrennten Testansätzen abläuft, ermöglicht er die Untersuchung der Bioakkumulation eines Schadstoffes im Verlauf einer Nahrungs-

kette, was als ökologische Magnifikation bezeichnet wird.

Einteilung nach der Dauer des Tests

Ökotoxikologische Testverfahren können zur Bestimmung akuter, subchronischer sowie chronischer toxischer Wirkungen von Schadstoffen dienen. Die Applikation eines Schadstoffs kann dabei einmalig sein und akute Wirkungen auslösen, kann mehrfach, aber nicht dauerhaft erfolgen und subchronische Wirkungen hervorrufen oder kann langanhaltend oder wiederholt durchgeführt werden und zu chronischen Wirkungen führen (Abbildung 1-5).

Aus zeitlicher Sicht treten akute Wirkungen immer innerhalb einer kurzen Zeit auf. Man spricht daher auch von Kurzzeitwirkung. Testverfahren, die akute Wirkungen bestimmen, werden Kurzzeittest genannt.

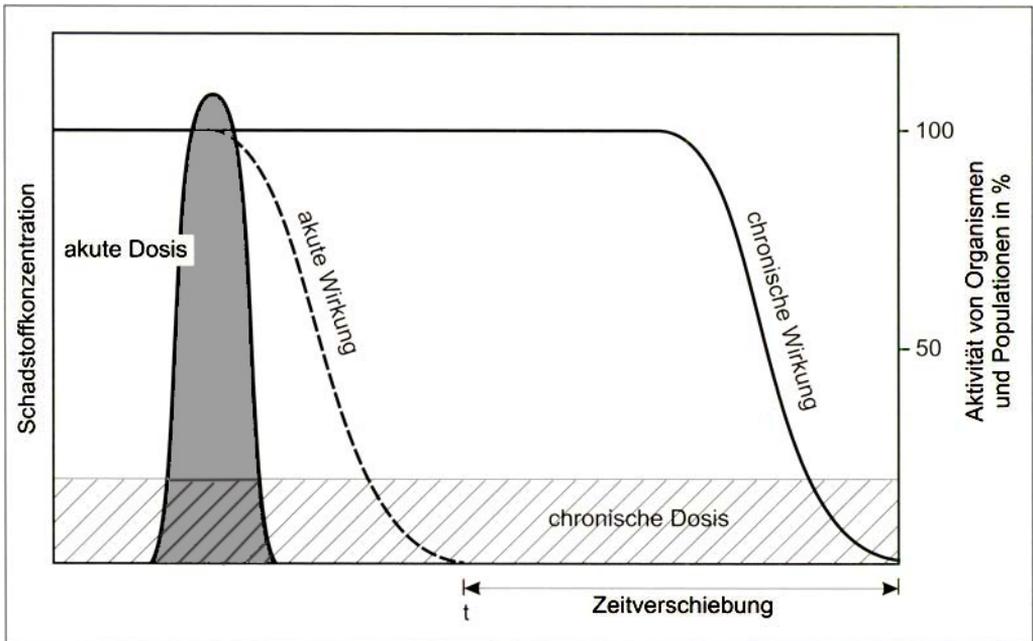


Abb. 1-5: Darstellung der zeitlichen Wirkung von akuten und chronischen Schadstoffkonzentrationen auf Organismen und Populationen (Quelle: MARKERT, B. (1997): Instrumental Element and Multi-Element Analysis of Plant Samples. – Wiley & Sons, Chichester/New York/Brisbane/Toronto/Singapore).

Sie haben meist eine Dauer von 24 bis 96 h.

Wenn der Zeitraum der Wirkung eines Schadstoffs über einer Kurzzeit-, aber noch

deutlich unter einer chronischen (siehe unten) Wirkung liegt, bezeichnet man diese als subchronisch. Man geht bei Tests für subchronische Wirkungen von einem Zeit-

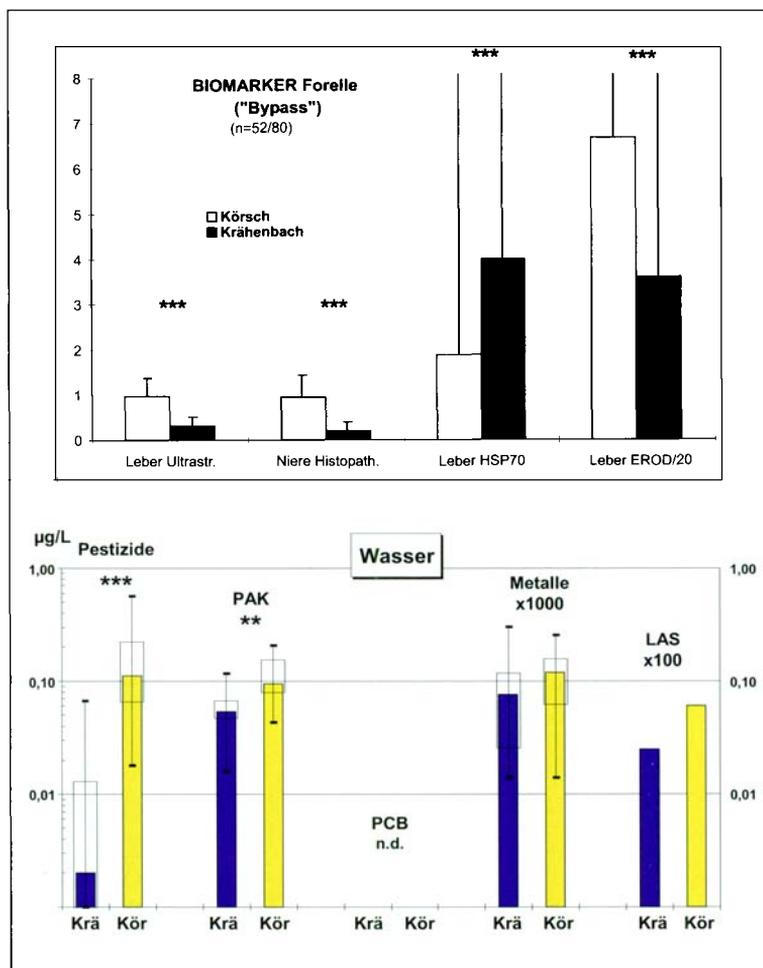


Abb. 1-6: Ultrastrukturelle, histopathologische und enzymatische Reaktionen als Biomarker für Schadstoffbelastungen bei Forellen im Vergleichsbach „Krähenbach“ und im belasteten Bach „Kör sch“ (oben). Gehalte an potentiellen Schadstoffen im Freiwasser des „Krähenbachs“ und der „Kör sch“ (unten). (Quelle: TRIEBKORN, R., ADAM, S., BEHRENS, A., BRAUNBECK, T., GÄNZER, S., HONNEN, W., KONRADT, J., KÖHLER, H.-R., OBEREMM, A., PAWERT, M., SCHLEGEL, T., SCHRAMM, M., SCHÜRMANN, G., SCHWAIGER, J., SEGNER, H., STRMAC, M., MÜLLER, E. (1999): Eignung von Biomarkern zur Fließgewässerbewertung: Zwischenergebnisse aus dem Projekt „Valimar“ (1995–1997). – In: OEHLMANN, J., MARKERT, B. (Hrsg.): Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden. ecomed, Landsberg, 382–398.)

raum zwischen mehreren Tagen und einigen Wochen aus.

Eine chronisch toxische Wirkung eines Schadstoffs tritt bei Organismen erst nach einem längeren Belastungszeitraum auf. Diese Wirkungen werden in chronischen Testverfahren ermittelt, deren Zeitraum sich nach dem eingesetzten Organismus richtet. Eine chronische Toxizität liegt dann vor, wenn Einwirkungen von Schadstoffen über einen Großteil des individuellen Lebens andauern, das bei manchen Kleinorganismen nur einige Wochen lang ist (z. B. 28 Tage bei *Chironomus riparius*). Für Säugetiere und den Menschen beträgt der Zeitraum mindestens 0,5 bis 2 Jahre.

Umfasst ein ökotoxikologischer Test einen vollständigen Lebenszyklus eines Organismus, dann spricht man vom Lebenszyklus-Test oder „Life-cycle-test“. Dieser Test beinhaltet mindestens eine Reproduktionsphase, die vom Ei über das Jugend- und Adultstadium bis zum Eistadium der nächsten Generation führt. Dadurch ist es möglich, die Wirkung einer Umweltchemikalie auf verschiedene Entwicklungsstadien

von Organismen zu untersuchen, wobei sich die Empfindlichkeiten einzelner Stadien sehr unterscheiden können. Eine praktische Anwendung findet der Reproduktionstest mit *Daphnia magna* (siehe Tabelle 2-3).

Biomarker und Biosensor

Vom Begriff des ökotoxikologischen Testverfahrens müssen die Bezeichnungen Biomarker und Biosensor unterschieden werden. Unter einem Biomarker versteht man einen messbaren biologischen Parameter auf suborganismischer, häufig biochemischer Ebene. Die Abgrenzung zwischen Biotest und Biomarker ist insofern schwierig, als Biotests häufig Biomarker als Messparameter für die Wirkung eines Schadstoffs haben. Biomarker reagieren empfindlich auf bestimmte Umweltchemikalien und sind Ausdruck stressbedingter Reaktionen. Beispiele für Biomarker sind Entgiftungsenzyme, Antioxidationsenzyme, metallbindende Proteine, Stressphenole, Stressproteine und DNA-Addukte. Messungen von Biomarkern haben sich bei Freilanduntersuchungen belasteter Gewässer bewährt.

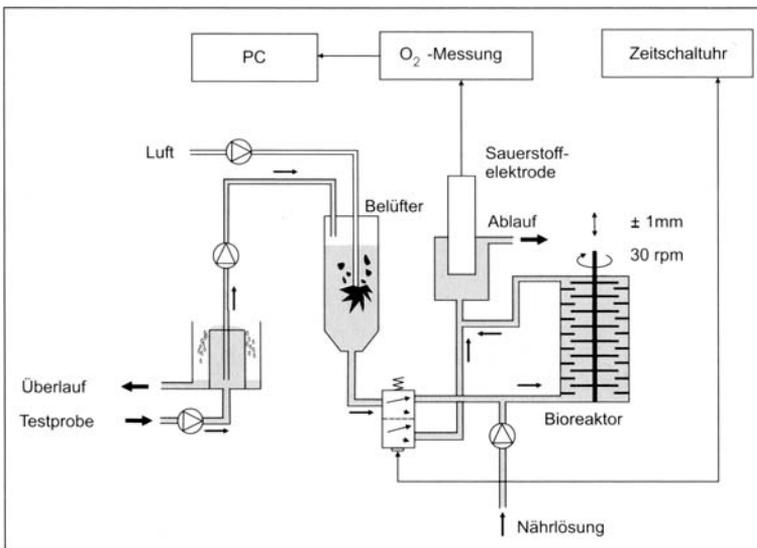


Abb. 1-7: Schematische Darstellung des kontinuierlichen Bakterientoximeters ToxiGuard (Quelle: BLESSING, B., FRITZLANGEN, H., KREBS, F. (1994): Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen in der Gewässerüberwachung. In: PLUTA, H.-J., KNIE, J., LESCHBER, R. (Hrsg.): Bio-monitore in der Gewässerüberwachung. – Fischer, Stuttgart/Jena/New York).

So ist zum Beispiel die Induktion des Bio-transformationsenzym EROD in der Leber von Fischen ein guter Indikator für die Anwesenheit organischer Umweltchemikalien (Abbildung 1-6).

Ein Biosensor ist eine Messanordnung, die durch eine geeignete Kombination eines selektiven biologischen Systems mit einer physikalischen Übertragungseinrichtung die Wirkung von Umweltchemikalien misst. Als biologische Komponente werden Enzyme, Antikörper, Organellen, Zellen, Gewebe oder Bakterien verwendet. Die Übertragungseinheit kann beispielsweise eine potentiometrische oder amperometrische Elektrode sowie ein optischer oder optoelektrischer Empfänger sein. Ein Beispiel hierfür ist das Bakterientoximeter „Toxiguard“ (Abbildung 1-7), bei dem lebende Mikroorganismen als biologische Komponente verwendet werden. Durch eine Elektrode wird der Sauerstoffverbrauch der Bakterienbiozönose gemessen, wobei eine Zunahme des Sauerstoffgehaltes die Anwesenheit toxischer Stoffe anzeigt.

1.2 Prinzip und Durchführung ökotoxikologischer Testverfahren

Die Grundstruktur eines ökotoxikologischen Testverfahrens besteht aus dem Testorganismus, dem Testparameter, den Testbedingungen sowie der Testprobe bzw. dem Testgut. Der Testorganismus ist in den meisten Fällen ein lebender Organismus, kann aber auch nur aus einer funktionellen Einheit bestehen, wie beispielsweise Leberzellen oder isolierte Chloroplasten. Der

Testparameter, auch Wirkungskriterium oder Endpunkt genannt, ist die Antwort des Testorganismus auf die Exposition gegenüber einer Probe. Der Testparameter ist eine sichtbare und/oder messbare Veränderung im Organismus, der mit der Belastung direkt oder indirekt im Zusammenhang steht. Die Testbedingungen kennzeichnen die Prüfsituation. Sie sind dem jeweiligen Organismus angepasst und umfassen u. a. Licht, Temperatur und Nährstoffe. Die Testprobe ist der zu untersuchende Schadstoff oder ein Schadstoffgemisch als Reinsubstanz(en) bzw. als komplexe Umweltprobe, die dem Testorganismus in unterschiedlicher Form appliziert werden kann.

Die Anwendung von ökotoxikologischen Testverfahren erfolgt unter nachvollziehbaren, standardisierten Bedingungen, um störende Faktoren weitgehend auszuschließen bzw. zu minimieren und so ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Der Ablauf eines Testverfahrens erfolgt dabei nach einem einheitlichen Schema (Abbildung 1-8). Dieses beinhaltet, dass die Wirkung einer Probe auf Organismen im Verlaufe einer bestimmten Zeit im Vergleich zu unbelasteten Kontrollansätzen zu bestimmen ist. Dazu wird von der Probe in der Regel eine Verdünnungsreihe hergestellt. Häufig müssen Testsubstanz oder Testgemisch in vorbereitenden Schritten dem Testorganismus angepasst werden. So ist beispielsweise beim Leuchtbakterien-Test ein Aufsalzen der Testprobe notwendig, da ein mariner Organismus verwendet wird, der einen bestimmten Salzgehalt benötigt. Beim Einsatz von tierischen Organismen muss in vielen Fällen der pH-Wert der Testprobe im Neutralbereich liegen, um störende pH-Wert-Effekte auszuschließen.