

# Wie können Schadstoffeinflüsse in Fließgewässern nachgewiesen werden?

Für das Modul Ökotoxikologie des Modul-Stufen-Konzeptes (MSK) ist an der EAWAG ein neuartiges Konzept erarbeitet worden. Es ist darauf ausgelegt mit möglichst einfachen, billigen und schnellen Verfahren eine grosse Anzahl von Wasserproben auf ihr Gefahrenpotential zu untersuchen. Besonderen Wert wurde darauf gelegt, dass die Wasserproben auf alle heute relevanten toxischen Wirkmechanismen hin untersucht werden. In einer ersten Stufe soll dabei ganz auf den Einsatz von Versuchstieren verzichtet werden. Nur Wasserproben, die ein Gefahrenpotential aufzeigen, werden in einer zweiten Stufe in umfangreicheren Langzeittests, in denen auch Tiere zum Einsatz kommen, weiter untersucht. Dieses Konzept eröffnet neue Perspektiven für eine ökotoxikologische Gewässerbewertung.

Für die Bewertung von Fließgewässern in der Schweiz liegt ein modulartiger Ansatz mit drei Modulblöcken vor (MSK), welches von Armin Peter in dieser EAWAG-News näher vorgestellt wird (Peter, 2000). Über die Möglichkeiten einer ökotoxikologischen Beurteilung von Fließgewässern ist aber noch wenig bekannt. Im Rahmen einer interdisziplinären Arbeitsgruppe an der EAWAG und in Diskussionen mit ausländischen Experten wurde deshalb ein entsprechendes Konzept entwickelt, das hier vorgestellt wird.

Das Bedürfnis für eine ökotoxikologische Beurteilung ergibt sich aus dem ungenügenden Kenntnisstand bezüglich der Auswirkungen vorhandener Stoffe und Gemische unterschiedlichster Chemikalien in unseren Gewässern (**Müller et al. ?**).

Die Konzentrationen vieler Schadstoffe sind zwar in den letzten Jahrzehnten zurückgegangen, aber Untersuchungen an Fischen haben gezeigt, dass auch diese relativ niedrigen Schadstoff-Konzentrationen zu Effekten an den Bewohnern der Fließgewässer führen können. So haben z.B. Gesundheits-Untersuchungen an Fischen eine Reihe von Schäden aufgezeigt (Holm, 2000). Ob diese Schäden jeweils durch einen einzelnen Schadstoff oder durch das Zusammenwirken mehrerer Schadstoffe entstanden sind, ist bislang unklar.

## **Aquatische Toxizitätstests**

Die ersten aquatischen Toxizitätstests wurden in den fünfziger Jahren entwickelt. Seither sind einige Testverfahren auf nationaler und internationaler Ebene standardisiert worden, insbesondere durch die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit (OECD) und die Internationale Normenorganisation (ISO). Seit 10 bis 20 Jahren werden diese Tests ebenfalls bei der Bewertung der Ökotoxizität komplexer Proben aus der Umwelt eingesetzt. Der Vorteil

ökotoxikologischer Tests besteht darin, dass sie die Bioverfügbarkeit und die Wechselwirkungen von Schadstoffen mit berücksichtigen. Man unterscheidet Kurz- und Langzeittests zur Ermittlung akuter bzw. chronischer Effekte.

### **Standardisierte Testsysteme**

Am einfachsten wäre die Verwendung von bereits standardisierten Tests, deren Aussagekraft, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit bereits bekannt ist. In solchen standardisierten Tests werden Organismen wie Bakterien, Algen, Wasserflöhe oder Fische den Wasserproben Minuten, Stunden oder Tage (je nach Organismus) ausgesetzt, die Schädlichkeit der Proben wird am Ende des Versuches anhand vom Tod der Testorganismen, eines verlangsamtem Wachstums oder von Verhaltenstörungen gemessen. Es ist jedoch nachteilig, dass derartige Tests in der Regel Kurzzeittests sind, und deshalb meist nur bei relativ hohen Schadstoff-Konzentrationen ansprechen, wie sie eventuell in Abwässern auftreten können, aber selten in Fließgewässern. Diese Tests sind daher für eine ökotoxikologische Beurteilung von Fließgewässern ungeeignet. Ein weiterer Nachteil dieser Kurzzeittests ist, dass nur die direkte Toxizität gemessen wird, während andere spezifische Wirkmechanismen (z.B. Effekte durch hormonaktive oder krebserregende Substanzen) unerkannt bleiben.

Eine Langzeitbelastung mit niedrigen Schadstoff-Konzentrationen kann aber trotzdem chronische Schäden bei den Gewässerbewohnern hervorrufen. Ökotoxikologische Langzeittests wären für den Nachweis niedriger Schadstoff-Konzentrationen geeignet, sie sind aber aufwändig und teuer und können daher nur vereinzelt durchgeführt werden. Es ist deshalb sinnvoll, diese Tests erst dann einzusetzen, wenn bereits Hinweise vorhanden sind, dass ein Gefahrenpotential vorliegt.

### **Alternative Testsysteme**

Neben diesen standardisierten Tests stehen für eine ökotoxikologische Fließgewässer-Bewertung noch eine Reihe anderer Verfahren zur Verfügung. Dabei können entweder nur Teile der Organismen (Moleküle, Zellen oder Gewebe) untersucht werden, es kann ein Organismus oder eine Population untersucht werden, oder Ökosysteme können simuliert werden.

Die Wirkung von Schadstoffen, die einen Organismus und schlussendlich ein Ökosystem beeinflussen, etablieren sich zuerst auf der molekularen Ebene. So können als erste Effekte Schäden an Proteinen, an der DNA oder an Membranlipiden festgestellt werden. Falls diese Schäden nicht repariert werden, pflanzen sie sich mit zeitlicher Verzögerung auf die höheren Ebenen fort und können in Zellen, Geweben, Organismen und im Ökosystem gemessen werden. Da geschädigte Organismen oft auch geschwächt sind oder ein verändertes

Verhaltensmuster zeigen, kann sich dies auf die Populationen und Lebensgemeinschaften in unterschiedlicher Weise auswirken, z.B. indem Populationen kleiner werden, Krankheiten zunehmen, Räuber-Beute-Beziehungen verändert werden, oder sich das Artenspektrum verschiebt.

### **Molekulare und zelluläre Methoden**

Da molekulare und zelluläre Effekte schnell auftreten können, kann mit ihnen das Gefahrenpotential von Wasserproben frühzeitig abgeschätzt werden. Molekulare und zelluläre Testsysteme sind in der Regel gut reproduzierbar und oft sensitiver als klassische Tests. Die Kosten sind vergleichsweise niedrig und die Tests sind schnell und einfach durchzuführen. Weil Effekte, die auf molekularer Ebene auftreten, sich aber nicht unbedingt auf die höheren Ebenen fortpflanzen, ist es wichtig zu überprüfen, ob sie sich auf einer höheren Ebene manifestieren. Molekulare und zelluläre Testsysteme werden in der aquatischen Ökotoxikologie bisher nur in Forschungsprojekten eingesetzt, während sie in der Säugetiertoxizität seit langem Routine sind. Sie haben den Vorteil, dass nicht nur die direkte Toxizität gemessen wird, sondern auch andere relevante Wirkmechanismen abgedeckt werden können.

### **Neues Konzept für die Fließgewässerbeurteilung**

Auf Grund der obigen Überlegungen und Erkenntnissen ist das folgende Konzept entstanden (Abb. 1):

Die Untersuchung der Wasserproben wird in 2 Stufen vorgenommen. In der ersten Stufe soll anhand von zellulären Tests das toxische Gefahrenpotential der Wasserproben ermittelt werden. In der zweiten Stufe werden die positive Antworten aus der ersten Stufe validiert, das heisst, es wird überprüft, ob sich das toxische Potential auch auf Organismen-Ebene etabliert.

#### *Trigger*

Auslöser für die Untersuchungen können Hinweise auf vorliegende biologische Störungen oder bekannte Einleitungen sein. Diese Hinweise können entweder aus Untersuchungen in den anderen Modulen des MSK kommen oder sie können von Kantonen und Umweltbüros kommen, denen Problemstandorte häufig bekannt sind. Zusätzlich sollen stichprobenartig Proben genommen werden, um Standorte zu identifizieren, an denen Schadstoffe noch keine sichtbaren Schäden hinterlassen haben, die aber gefährdet sind.

### *Stufe 1*

In der ersten Stufe werden die Wasserproben in einer Testbatterie untersucht, die aus verschiedenen molekularen Testsystemen besteht. Mit dieser Testbatterie sollen neben der direkten Toxizität auch alle anderen heute bekannten spezifischen Wirkmechanismen abgedeckt werden. Die einzelnen Tests können nach Entwicklung noch einfacherer oder sensitiverer Methoden ausgetauscht werden, und die Testbatterie kann erweitert werden, falls Testmethoden für andere spezifische Wirkmechanismen entwickelt werden.

Die Testbatterie besteht aus Bakterien, einzelligen Algen, Invertebraten- und Fischzelllinien. Zur Ermittlung des Gefahrenpotentials einer Wasserprobe werden also keine Tiere eingesetzt. Es stellt sich aber auch hier das Problem, dass nur ein Organismus - bzw. die Zelllinie eines Organismus - für viele andere Organismen stehen, welche sich in ihrer Sensitivität gegenüber von Schadstoffen unterscheiden. Es gibt keinen Organismus, der auf alle Schadstoffe am sensitivsten reagiert.

Mit den Bakterien wird die direkte Toxizität der Wasserproben bestimmt. Die einzelligen Algen dienen als Vertreter von Pflanzen und Algen zur Bestimmung von Effekten auf die Photosynthese. Mit den tierischen Zelllinien werden Effekte wie Kanzerogenität, Hormonaktivität oder Schäden am Immunsystem gemessen. Einige dieser Tests sind in der aquatischen Ökotoxikologie bereits angewendet worden, für andere gibt es zwar für Zellkulturen von Säugetieren Testsysteme, aber noch nicht für Zellkulturen aquatischer Organismen. Dies trifft z.B. für die Messung der Effekte auf das Immunsystem zu. Bei der Auswahl der Zelllinien muss darauf geachtet werden, dass die Zellen sensitiv, aber nicht zu schwierig zu kultivieren sind. Welche(r) Vertreter bei den Invertebraten verwendet werden sollen, muss noch diskutiert werden. Da in den meisten Zelllinien nicht die gleiche metabolische Aktivierung von Schadstoffen stattfindet wie in einem Organismus, kann diese Aktivierung durch Zugabe einer Leberextrakt-Fraktion (S9-Fraktion) nachgestellt werden. Diese Methode wird bei Fischzelllinien seit langem erfolgreich angewendet.

Die Erfahrung muss zeigen, wo bei den einzelnen Tests die Grenzen zwischen positiven und negativen Antworten gezogen werden können, d.h. wie stark die Antwort sein muss, um eine Validierung in Stufe 2 auszulösen.

### *Stufe 2*

Im Fall, dass alle Tests der Stufe 1 negativ ausfallen, können die Wasserproben als ungefährlich beurteilt werden, es folgen dann keine weiteren Untersuchungen. Fällt ein Test aber positiv aus, so wird er in der Stufe 2 validiert. Es wird jeweils nur die Organismengruppe weiter untersucht, die in der 1. Stufe eine positive Antwort gegeben hat. So werden unnötige Tierversuche vermieden. Als Vertreter für die jeweiligen Organismengruppen sollen möglichst Arten herangezogen werden, die typisch für das Gewässer sind, in der die

Wasserprobe genommen wurde. Es muss sich aber auf jeden Fall um eine relativ sensitive Art handeln, die im Labor gehalten werden kann. Mit diesen Organismen wird dann in einem Langzeittest der gemessene Effekt der 1. Stufe näher untersucht. Ist die Antwort jetzt negativ, so ist zwar auf zellulärer Ebene ein Gefahrenpotential vorhanden, welches sich aber auf Organismen-Ebene nicht etabliert. Die Wasserproben können als ungefährlich eingestuft werden. Auch hier muss die Erfahrung zeigen, wie stark ein gemessener Effekt in der 2. Stufe sein muss, um ihn als eine positive Antwort zu bewerten.

Bestätigt sich die Toxizität in der 2. Stufe, so muss versucht werden, ob der oder die Schadstoffe identifiziert werden können, denn nur so können geeignete Massnahmen eingeleitet werden. Ist allerdings das Zusammenwirken mehrerer Schadstoffe die Ursache für den gemessenen Effekt, so kann sich eine Identifikation der Schadstoffe sehr schwierig gestalten oder sogar unmöglich sein. In diesem Fall muss pragmatischer vorgegangen werden, z.B. könnte die Reduktion aller vorhandenen Schadstoffe angestrebt werden.

### **Schlussfolgerungen**

Mit diesem Konzept kann das Gefahrenpotential von Wasserproben auf Organismen mit schnellen, billigen und sensitiven Methoden ermittelt werden, wobei auf den Einsatz von Tieren in der ersten Stufe verzichtet wird. Mit diesem Verfahren kann eine Vielzahl von Wasserproben auf alle relevanten Wirkmechanismen untersucht werden. Nur bei Wasserproben, in denen ein Gefahrenpotential entdeckt wird, werden Organismen in Langzeittests untersucht, um die Ergebnisse der ersten Stufe zu validieren.

Mit diesem neuartigen Konzept liegt ein vielversprechender, moderner Ansatz zur ökotoxikologischen Fliessgewässer-Bewertung vor. Als nächster Schritt müssen die beschriebenen offenen Fragen geklärt und in einer Vorstudie soll das Konzept an Fallbeispielen geprüft werden.

Nina Schweigert

Nach ihrem Biologiestudium in Köln und der Diplomarbeit in Uppsala (Schweden), hat sie 2 Jahre an einer meeresbiologischen Station in Roscoff (Frankreich) gearbeitet. Anschliessend hat sie an der EAWAG promoviert. Während des Postdoktorats hat sie am vorliegenden Konzept zur ökotoxikologischen Fliessgewässerbewertung gearbeitet.

Koautoren: Renata Behra, Rik Eggen, Beate Escher und Patricia Holm

Referenzen:

Peter, A. (2000) Artikel aus dieser EAWAG News.

Holm, P. (2000) Artikel aus dieser EAWAG News.

Bucheli, T. D., Gruebler, F. C., Müller, S. and Schwarzenbach, R. P. (1997). Simultaneous determination of neutral and acidic pesticides in natural waters at the low nanogram per liter level. *Anal. Chem.* 69, 1569-1576.

Eventuell:

Öllers, S., Singer, H. P., Fässler, P. and Müller, S. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low ng/l level in surface and waste waters, Submitted to *Journal of Chromatography A*.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1: Schema zum Vorgehen bei einer ökotoxikologischen Fließgewässer-Bewertung. Es gibt 3 verschiedene Trigger, die eine Untersuchung auslösen können. Die Untersuchung der Wasserproben wird in 2 Stufen unterteilt: In der 1. Stufe wird ein Testbatterie mit zellulären Testsystem verwendet. Mit dieser Testbatterie soll das Gefahrenpotential der Wasserproben abgeschätzt werden. Bei einer oder mehreren positiven Antwort(en) in der 1. Stufe, werden in der 2. Stufe die Ergebnisse in Langzeittests validiert. Um unnötige Tierversuche zu vermeiden, werden hierbei wird nur die jeweils gefährdeten Organismengruppen untersucht. Bestätigt sich in der Validierung das Gefahrenpotential der Wasserprobe, so wird versucht, die toxischen Schadstoffe zu identifizieren.

Abb. 2: Bewertungskriterien für die Beurteilung von Ökotoxizitätstests. Je nach betrachteter biologischer Ebene, auf der die ausgewählten Tests angesiedelt sind, sind die Kriterien unterschiedlich stark ausgeprägt (Stärke der Ausprägung entspricht dem Durchmesser der Pfeilspitze). So sind Tests, die auf der Ebene der Zelle angesiedelt sind, sehr sensitiv, sprechen schnell an, sind gut reproduzierbar und automatisierbar, entsprechen den Anforderungen der Tierschutzethik, kosten wenig, haben aber nur eine niedrige Relevanz für das Ökosystem