



Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz

Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie

Erarbeitet von:

Nina Schweigert¹, Rik I.L. Eggen¹, Beate I. Escher¹, Patricia Burkhardt-Holm², Renata Behra¹

¹Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie, EAWAG, Überlandstr. 135, 8600 Dübendorf; ²Fischnetz, EAWAG, Überlandstr. 135, 8600 Dübendorf

(November 2001)

Das Modul Ökotoxikologie des Modul-Stufen-Konzeptes

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	2
2. EINLEITUNG	3
2.1. Allgemeiner Rahmen.....	3
2.1.1. Das Modul-Stufen-Konzept (MSK)	5
2.1.2. Gesetzliche Grundlagen.....	5
2.2. Ökotoxikologie	6
2.2.1. standardisierte Methoden.....	6
2.2.2. weitere Möglichkeiten ökotoxikologischer Wasseruntersuchungen	8
3. DAS KONZEPT FÜR DAS MODUL ÖKOTOXIKOLOGIE.....	14
3.1. Trigger und Probenahmen	15
3.2. Stufe 1: Screening von Wasserproben auf ihr toxisches Potential	16
3.2.1. Auswahl der Vorgehensweise anhand eines Kriterienkataloges	16
3.2.2. Die Screening-Testbatterie der 1. Stufe.....	18
3.3. Stufe 2: Relevanzprüfung.....	21
3.4. TIE (Toxicity-Identification-Evaluation)	22
4. DAS MODUL ÖKOTOXIKOLOGIE IM RAHMEN DES MSK.....	22
5. OFFENE FRAGEN	23
6. AKTIVITÄTEN AN DER EAWAG.....	23
7. DANKSAGUNGEN.....	24
8. REFERENZEN.....	24

1. Zusammenfassung

In diesem Bericht wird ein Konzept vorgestellt, mit dem eine ökotoxikologische Fließgewässerbewertung im Rahmen des Modul-Stufen-Konzeptes (MSK) durchgeführt werden kann. Dieses Konzept wurde an der EAWAG durch eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe ausgearbeitet. Dabei wurde nach einem Kriterienkatalog vorgegangen, in dem, neben der Sensitivität unter anderem auch der Zeitaufwand für den Test, die Handhabbarkeit und die Kosten für die Auswahl von Testsystemen eine entscheidende Rolle gespielt haben. Dadurch soll ein routinemässiger Einsatz ermöglicht werden.

Dieses Konzept sieht eine zweistufige Untersuchung der Wasserproben vor. In der 1. Stufe wird mittels einer zellulären Screening-Testbatterie das toxische Potential der Proben ermittelt. Mit dieser Testbatterie sollen die meisten relevanten toxischen Ant-

worten (z.B. DNA-Schäden oder Photosynthese-Hemmung) abgedeckt werden. In der 2. Stufe werden nur noch Proben untersucht, in denen in der 1. Stufe ein toxisches Potential entdeckt wurde. In dieser 2. Stufe wird anhand von ausgewählten Organismen überprüft, ob das toxische Potential auch in Organismen zu negativen Effekten führt. Die zu testenden Organismen und der Versuchsaufbau sind, je nach identifiziertem toxischem Potential und je nach Probenahmestelle, zu wählen. Das heisst, dass bei einem toxischen Potential im Rhein bei Basel, Fische, Invertebraten oder Algen (je nach toxischer Antwort) eingesetzt werden, die in diesem Gebiet anzutreffen sind. Bestätigt sich die Toxizität der Proben in der 2. Stufe nicht, so werden keine weiteren Massnahmen ergriffen, da davon ausgegangen werden kann, dass die Proben zwar ein toxisches Potential besitzen, welches in den Organismen aber nicht zu Schäden führt. Werden die Organismen in den Tests der 2. Stufe aber geschädigt, so muss versucht werden, dass der oder die Schadstoffe identifiziert werden, um eine Reduktion der Einleitung in das Gewässer zu erreichen. Mit dieser Vorgehensweise können viele Proben gleichzeitig auf ihr toxisches Potential untersucht werden.

Der hier vorgestellte Ansatz kann später auch für die Beurteilung von Umweltproben (z.B. Kläranlagenausläufen, Sickerwasser, Sedimentproben) eingesetzt werden. Die Testmethoden der 1. Stufe können auch für die Chemikalienbewertung herangezogen werden. Zur Klärung der zahlreichen, noch offenen Fragen bei der Umsetzung dieses Konzeptes wird deshalb an der EAWAG zur Zeit eine Machbarkeitsstudie durchgeführt. Dabei wird zuerst die zelluläre Screening-Testbatterie aufgebaut und ausgetestet, in einem zweiten Schritt werden dann auch Verfahren der 2. Stufe ausgetestet.

Bevor das Konzept vorgestellt wird, wird noch ein Überblick über ökotoxikologische Ansätze gegeben. Diese Ansätze werden hinsichtlich ihrer Potentiale und Grenzen und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im Modul Ökotoxikologie des Modul-Stufen-Konzeptes diskutiert.

2. Einleitung

2.1. Allgemeiner Rahmen

Die Schweizer Fliessgewässer haben im Laufe der letzten Jahrhunderte nicht nur einschneidende Veränderungen bezüglich ihrer Hydrologie und Morphologie erfahren, sondern auch in den physikalischen (z.B. Temperatur) und chemischen Eigenschaften (Bonga, 1997; Bundi et al., 1997; Wagner et al., in press). In einem Grossteil der Schweizer Fliessgewässer leiten Kläranlagen ihre geklärten Abwässer ein, in denen noch geringe Konzentrationen Schadstoffe aus Industrie und Haushalt enthalten sind. Eine weitere Schadstoffquelle ist das Regenwasser, welches Chemikalien von

Strassen, Dächern und aus der Landwirtschaft in die Gewässer einschwemmt. Es ist daher sinnvoll, bei einer ökotoxikologischen Untersuchung nicht nur die Ausläufe von Kläranlagen zu untersuchen, sondern auch im Fliessgewässer selbst Proben zu nehmen, da sonst die Effekte von Schadstoffen aus diffusen Quellen und deren Wechselwirkungen mit anderen Schadstoffen unbeachtet bleiben. Desweiteren ist es wichtig, auch die Sedimente auf ihr ökotoxikologisches Potential hin zu untersuchen, da eine ganze Reihe von Chemikalien die Tendenz hat, sich im Sediment anzureichern (Hill et al., 1993). Diese Chemikalien gefährden zum einem die im Sediment lebenden Organismen, zum anderem sind sie aber auch deshalb besonders wichtig, weil sie noch nach langen Zeiträumen aus dem Sediment mobilisiert, wodurch sie noch lange eine potentielle Gefahr für die Fliessgewässer darstellen (Power and Chapman, 1992).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass Chemikalienbelastungen zu starken Schäden in aquatischen Ökosystemen führen können. Deshalb wurde der Eintrag anthropogener Stoffe (z.B. EDTA) durch gesetzliche oder freiwillige Beschränkungen im Abwasser, welches in die Kläranlagen gelangt, deutlich reduziert und zum anderem wurde die Leistung vieler Kläranlagen verbessert. Dadurch konnten die Einträge von Stickstoffen und anderen Schadstoffen massiv gesenkt werden (Bundi et al., 1997). Dennoch gelangen noch Tausende von Haushalts- und Industriechemikalien in die Oberflächengewässer, die dort als ein undefiniertes Gemisch vorliegen. Viele dieser Chemikalien sind mit chemischen Analysen nicht oder nur mit aufwendigen Methoden nachzuweisen. Wenn mehrere Chemikalien mit gleichen Wirkmechanismen vorliegen, können diese zu Schadefekten führen, indem sich ihre Effekte aufaddieren. Das kann auch dann der Fall sein, wenn die Einzelkonzentrationen unterhalb der Wirkschwelle der Einzelstoffe liegen (Tonkes et al., 1998). Auch synergistische Effekte können in Chemikaliengemischen auftreten (Schweigert et al., 2001). Die Frage ist, welchen Einfluss dieses Gemisch von Chemikalien und ihren Metaboliten, bei den heute vorliegenden – vergleichsweise niedrigen – Einzelkonzentrationen, auf die Ökosysteme unserer Fliessgewässer hat. Dass auch die niedrigen Chemikalienkonzentrationen, bei chronischer Exposition, schwerwiegende Schäden in Organismen verursachen können, haben Untersuchungen an Muscheln und Fischen gezeigt (Fent, 1996; Vos et al., 2000). Weil die Schadstoffkonzentrationen in den Gewässern aber meistens so niedrig sind, dass Schäden erst nach langen Expositionen auftreten, wird es unvermeidlich sein, die Wasserproben aufzukonzentrieren. Hierzu sind bereits eine Reihe von Methoden beschrieben und zum Teil an der EAWAG etabliert (Hendriks et al., 1994; Parkerton et al., 2000; Verbruggen et al., 2000; Verbruggen et al., 1999).

Es ist schwer die Einflüsse von Schadstoffen im Ökosystem von anderen Einflüssen zu unterscheiden, hier kann die Ökotoxikologie eine Hilfestellung leisten, indem sie

den Einfluss von Wasserproben auf den Gesundheitszustand von Organismen/Zellen untersucht.

In der Ökotoxikologie gibt es normierte Testverfahren, mit denen die Schadwirkung von Chemikalien und Wasserproben auf Organismen getestet werden können. Bei diesen Standardtests werden die Organismen in der Regel für mehrere Tage (in selteneren Fällen auch Wochen) einer Wasserprobe unter standardisierten Bedingungen ausgesetzt. Am Ende des Experimentes wird die Konzentration des Schadstoffes oder Abwassers bestimmt, bei der 50% der Organismen offensichtliche Schäden aufweisen (EC_{50}) und die Konzentration, bei der keine Effekte zu beobachten sind (NOEC = No Effect Concentration). Mit Hilfe dieser Werte und unter Anwendung von Sicherheitsfaktoren werden die Konzentrationen berechnet, die in der Umwelt nicht überschritten werden dürfen. Zwar gibt es unter den normierten Testsystemen chronische Tests, diese werden aber, bedingt durch den relativ hohen Arbeitsaufwand, bei Umweltproben selten eingesetzt.

In der Forschung werden noch viele andere ökotoxikologische Verfahren verwendet, die aber bei routinemässigen Wasserqualitätsbestimmungen heute noch nicht eingesetzt werden. Einige dieser Methoden werden weiter unten diskutiert.

2.1.1. *Das Modul-Stufen-Konzept (MSK)*

Das MSK wurde für eine Fliessgewässerbewertung in der Schweiz entwickelt (BUWAL, 1998). Es soll einer umfassenden Bewertung der Fliessgewässer dienen. Es ist ein Ansatz, bei dem die Fliessgewässer in neun verschiedenen Modulen bewertet werden: Hydrologie, Ökomorphologie, Chemie, Ökotoxikologie und fünf verschiedene Biologiemodule: Ufervegetation, Makrophyten, Algen, Makrozoobenthos und Fische. Die Stufen bezeichnen die Grösse des zu untersuchenden Gebietes: (F) flächendeckend, d.h. alle Fliessgewässer in einem Gebiet (z.B. Kanton); (S) systembezogen, d.h. ein Fliessgewässer mit seinen Zuflüssen und (A) abschnittsbezogen ein Abschnitt eines Fliessgewässers. Je nach Stufe werden innerhalb der Module mehr oder weniger intensive Untersuchungen durchgeführt.

2.1.2. *Gesetzliche Grundlagen*

In der Gewässerschutzverordnung von 1998 sind die ökologischen Ziele des Gewässerschutzes und die Anforderungen an die Wasserqualität neu definiert worden: Demnach sollen keine künstlichen, langlebigen Stoffe in die Fliessgewässer eingetragen werden und es soll keine Bioakkumulation solcher Stoffe stattfinden. Die Konzentration anthropogener Stoffe soll im Gewässer nahe bei Null liegen und biologische Prozesse sollen nicht beeinträchtigt werden (Gewässerschutzverordnung, 1998). Um die-

se Qualitätsziele überprüfen zu können, sind ökotoxikologische Untersuchungen notwendig. Im nächsten Abschnitt wird sowohl die Ökotoxikologie im Allgemeinen, als auch ökotoxikologische Testverfahren vorgestellt.

2.2. Ökotoxikologie

Die Ökotoxikologie befasst sich mit wissenschaftlichen Grundlagen und Methoden, mit deren Hilfe Störungen von Ökosystemen durch anthropogene stoffliche Einflüsse und durch Strahlen identifiziert sowie bewertet werden (Steinberg et al., 1995). Das Modul Ökotoxikologie des MSK versucht, Methoden zur Verfügung zu stellen, mit denen eine Überprüfung der oben genannten Ansprüche möglich wird.

Ökotoxikologische Tests umfassen Labor- und Freilandversuche, welche die Wirkung eines Schadstoffes oder eines Schadstoffgemisches auf ein Ökosystem oder auf einen Teil eines Ökosystems simulieren.

Die wichtigsten Vorteile ökotoxikologischer Tests im Vergleich zu chemischen Analysen liegen darin,

- (i) dass sie die Effekte aller in der Wasserprobe vorliegenden Chemikalien integrieren. Mit chemische Analysen können nur eine begrenzte Anzahl von Chemikalien analysiert werden.
- (ii) dass die Bioverfügbarkeit (Aufnahme und Bioakkumulation) der Schadstoffe mit berücksichtigt wird. (Ausnahmen hierzu sind molekulare und zum Teil auch subzelluläre Methoden.)
- (iii) dass sie nicht nur das Vorhandensein und die Konzentration eines Schadstoffes aufgezeigt wird, sondern auch seine Wirkung auf Organismen.
- (iv) dass auch die Wirkungen von Abbauprodukten mit untersucht werden. Abbauprodukte werden bei chemischen Analysen nur teilweise berücksichtigt.
- (v) dass Effekte, die durch die Wechselwirkung von Schadstoffen untereinander oder mit natürlichen Stoffen stattfinden (z.B. Synergien und Antagonismen) mit berücksichtigt werden;

2.2.1. standardisierte Methoden

Heute werden ökotoxikologische Methoden für die Bewertung von Oberflächengewässern, Abwässern, Sickerwässern, Sedimentextrakten und bei der Chemikalienbewertung eingesetzt. Für Routineuntersuchungen kommen hauptsächlich standardisierte Verfahren zum Einsatz, während in der Forschung noch eine ganze Reihe anderer Methoden Verwendung findet. Auf diese Methoden wird im Kapitel 2.2.2. näher eingegangen. Bei der Entwicklung des Moduls Ökotoxikologie wurden sowohl die standardisierten, als auch die nicht standardisierten Verfahren berücksichtigt.

Die ersten Bemühungen zur Entwicklung und Standardisierung aquatischer Tests zur Feststellung akuter Toxizität datieren aus den fünfziger Jahren. In den siebziger Jahren wurden in einigen Regierungsrichtlinien die ersten Tests bezüglich Gewässerschutz aufgenommen (Rand et al., 1995). Seither sind einige Testverfahren auf nationaler und internationaler Ebene standardisiert worden, insbesondere durch die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit (OECD) die Internationale Normenorganisation (ISO), die deutsche Industrienorm (DIN) oder die Umweltschutzbehörde der Vereinigten Staaten (U.S. EPA). In Tabelle 1 sind die aquatischen, ökotoxikologischen Testverfahren zusammengestellt, die bis 2000 in die OECD Richtlinien aufgenommen worden sind (OECD, 2000).

Tabelle 1: Von der OECD bis 2000 registrierte Test zur aquatischen Ökotoxikologie (OECD, 2000).

OECD Test-Nr.	Testorganismen	Dauer	Testbezeichnung
201	Algen	72 Stunden	Wachstumshemmungstest
202	Daphnien	48 Stunden	Akuter Immobilisations- und Reproduktionstest
203	Fische	96 Stunden	Akuter Fischttest
204	Fische	14 Tage	Verlängerter Fischtoxizitätstest
209	Klärschlamm	30 min – 3 Stunden	Respirationshemmung in aktivierten Klärschlamm
210	Befruchte Fischeier	> 3-4 Wochen	„early life stage“ Test
211	Daphnien	7 oder 21 Tage (je nach Art)	Reproduktionstest
212	Befruchte Fischeier	3-5 oder 8-10 Tage	Kurzzeit Embryotest
215	Fische	28 Tage	„Juvenile growth test“

Seit 10 bis 20 Jahren werden diese Tests bei der Bewertung der Ökotoxizität komplexer Proben aus der Umwelt (z.B. Abwasser) eingesetzt. Die chronischen Tests kommen zwar bei der ökotoxikologische Risikobewertung von Chemikalien zum Einsatz, bei der Risikobewertung von Umwelt- und Abwasserproben ist dies aber aus Kostengründen fast nie der Fall. In der Schweiz sind keine ökotoxikologischen Untersuchungen der ARA-Ausläufe erforderlich (Gewässerschutzgesetz 1991). In den Niederlanden ist eine ökotoxikologische Bewertung von ARA-Ausläufen geplant (de Graaf

et al., 2000). Dabei können besonders toxische Abwässer erkannt werden und mit Hilfe von chemischen Analysen kann eine Identifikation des oder der Schadstoffe stattfinden. Für niedrige Schadstoffkonzentrationen, wie sie in den Gewässern vorliegen, sind diese akuten Tests aber zu unempfindlich.

In der Forschung werden in den letzten Jahren vermehrt zelluläre Testsysteme, mit Einzellern oder Zelllinien höherer Organismen, entwickelt. Diese Tests sind aber noch nicht validiert und nicht normiert.

2.2.2. weitere Möglichkeiten ökotoxikologischer Wasseruntersuchungen

Ökotoxikologische Testverfahren können nach verschiedene Gesichtspunkten geordnet werden. In diesem Bericht wurden sie nach biologischen Ebenen vom Molekül bis zum Ökosystem geordnet. Die grössten Unterschiede bei ökotoxikologischen Untersuchungen auf den verschiedenen biologischen Ebenen sind einerseits die zunehmende Integration der toxischen Antworten von der molekularen Ebene zum Ökosystem und andererseits die Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit, falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse zu erhalten. Falsch-negative Ergebnisse sind negative Ergebnissen im gewählten Testverfahren, die gleiche Probe gibt aber ein positives Ergebnis auf einer höheren Ebene. Bei falsch-positiven ist es umgekehrt: Im gewählten Testverfahren ergibt sich eine positive Antwort, während auf den höheren Ebenen kein Schadeffekt zu messen ist. Im folgenden Abschnitt werden die Ebenen kurz vorgestellt.

Die Wirkung von Stressfaktoren (u.a. Schadstoffen), die einen Organismus oder sogar ein Ökosystem beeinflussen, etablieren sich zuerst auf der molekularen Ebene. So können als erste Effekte oft Veränderungen in der Struktur von Proteinen, der DNA oder Membranlipiden festgestellt werden. Auf dieser Ebene sollte es möglich sein, alle Schäden zu entdecken, daher sollte es auf der molekularen Eben keine falsch-negativen Ergebnisse geben. Es wäre aber eine sehr grosse Anzahl von Tests notwendig, um alle möglichen toxischen Effekte auf dieser Ebene abzudecken. Deshalb ist eine Integration notwendig, die erreicht wird, wenn die Schäden auf einer höheren Ebene gemessen werden. Eine erste Integration bieten subzelluläre Testsysteme in denen zelluläre Struktureinheiten (wie. z.B. Mitochondrien oder Lysosomen) verwendet werden. Die zelluläre Ebene stellt eine weitere Integrationsstufe dar. So wird z.B. mit der Photosynthesehemmung die Funktionsfähigkeit von Membranen und von den, in die Photosynthese involvierten, Proteinen gemessen.

Bei der Ansammlung von Schäden werden Gewebe und dann der ganze Organismus geschädigt. Da geschädigte Organismen oft auch geschwächt sind oder ein verändertes Verhaltensmuster zeigen, werden sie aus einer Population verschwinden. Durch den Verlust einzelner Individuen wird eine Population geschwächt, besonders ihre

Anpassungsfähigkeit an weitere Stressfaktoren nimmt ab (Largiadèr, 2001). Werden aber nicht nur einzelne Individuen einer Art vom Stressfaktor in Mitleidenschaft gezogen, sondern der Grossteil einer Population, so kann diese Population ihre Rolle im Ökosystem nicht mehr wahrnehmen, wodurch sich Konkurrenzverhältnisse zwischen verschiedenen Arten und auch Räuber-Beute-Beziehungen ändern können. Dies kann zu einer Verschiebung der Artenzusammensetzung im Ökosystem führen.

Da international kein einheitlicher Trend erkennbar ist, ob und wie Oberflächengewässer in Zukunft ökotoxikologischen Untersuchungen unterzogen werden sollen, ist der Entwicklung des Konzeptes für das Modul Ökotoxikologie eine intensive Studie der Literatur und eine Diskussion mit ForscherInnen in In- und Ausland vorausgegangen. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene ökotoxikologische Ansätze erläutert und im Sinne einer Verwendbarkeit in diesem Konzept diskutiert. Die verschiedenen Ebenen werden dabei nacheinander behandelt. Da Biomarker auf verschiedenen Ebenen gemessen werden können, werden sie am Ende gesondert beschrieben.

Ökosystem-Ebene: Der Zustand eines Ökosystems kann dadurch erfasst werden, dass die Artenzusammensetzung verglichen wird entweder mit historischen Daten desselben Ökosystems oder mit Daten eines hydrologisch, ökomorphologisch und chemisch vergleichbaren Ökosystems, welches unverschmutzt ist. Dieser Ansatz wird unter anderem in Grossbritannien (unter dem Namen RIVPACS) verfolgt (Wright et al., 1993). Auch im Rahmen des Modul-Stufen-Konzeptes werden in den Modulen der Biologie Bestandesaufnahmen erhoben und statistisch ausgewertet.

Ein Vorteil von Ökosystemstudien ist, dass die Anreicherung von Schadstoffen über die Nahrungskette automatisch mit in die Bewertung des Ökosystemzustandes mit eingeht, da alle Glieder einer Nahrungskette vorhanden sind. Neben der Artenzusammensetzung können auch weitere strukturelle Parameter eines Ökosystems untersucht werden, dazu gehören z.B. Biomasse, Chlorophyllgehalt und Prozent an Substratdeckung. Auch funktionelle Parameter können bewertet werden, so z.B. die Primärproduktion, die Atmung, Nitrifikation oder die Degradationsrate.

Im Vergleich zu den anderen Untersuchungsebenen, geben die Untersuchungen auf der Ökosystemebene die Realität am besten wieder. Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie Wassertemperatur, Strömungsgeschwindigkeit, Habitatsveränderungen, Räuber-Beute-Beziehungen und Konkurrenzverhalten - um nur einige zu nennen - erlaubt aber kaum eine Diagnose hinsichtlich einer stofflichen Belastung des Ökosystems und das Erkennen eines kausalen Zusammenhanges von Effekten ist sehr schwierig bis unmöglich. So ist bei einer Änderung der Artenzusammensetzung nur schwer ein Rückschluss auf die Ursache zu ziehen. Bei niedrigen Schadstoffkonzentrationen er-

folgen Änderungen sehr langsam und die Effekte sind deshalb oft erst spät wahrnehmbar (in der Regel erst nach Monaten oder sogar Jahren).

Da es das Ziel des Moduls Ökotoxikologie ist, Zusammenhänge zwischen Schadstoffen und Effekten aufzuzeigen und als Frühwarnsystem zu dienen, ist für das Modul Ökotoxikologie ungeeignet. Ökosystemuntersuchungen können aber wichtige Informationen für das Modul Ökotoxikologie liefern, da hierbei Gewässerabschnitte identifiziert werden, deren Zustand nicht dem natürlichen Zustand entspricht. Hier können zusätzliche ökotoxikologische Untersuchungen dann über die Rolle von Schadstoffen Aufschluss geben. Auch kann mit Ökosystemuntersuchungen – wie sie in den Modulen der Biologie durchgeführt werden - überprüft werden, ob sich die Toxizität von Wasserproben auch negativ auf die Ökosysteme auswirken.

Modellökosysteme: Ökosystemstudien können auch an Hand von Modellökosystemen (Kosmen) durchgeführt werden, die im Freiland oder im Labor aufgebaut werden können. Kosmen stellen vereinfachte Ökosysteme dar, in denen ein Teil der Umwelteinflüsse kontrolliert werden kann. Ein weiterer Vorteil von Kosmen gegenüber der Beobachtung eines gesamten Ökosystems ist, dass eine Reihe ähnlicher Systeme untersucht werden kann. Dadurch können Kontrollen eingeführt werden und es können einfacher Zusammenhänge von Effekten und Schadstoffen hergestellt werden. Sind mehrere trophische Stufen vorhanden, können hier auch Rückschlüsse auf die Anreicherung von Schadstoffen über die Nahrungskette gezogen werden. Kosmenstudien bedeuten allerdings einen sehr hohen Arbeitsaufwand und die Untersuchungen dauern in der Regel Wochen bis Jahre (je nach Grösse des Systems und der Fragestellung des Versuchs). Deshalb sind sie für einen routinemässigen Einsatz bei einem grossen Probenaufkommen, wie es im Modul Ökotoxikologie zu erwarten ist, ungeeignet.

Populationen und Organismen: Einzellige Organismen werden in diesem Bericht in dem Abschnitt „Zellen“ diskutiert. Bei kleineren Organismen, wie z.B. Wasserflöhen, werden oft Populationen untersucht, während bei grösseren Individuen, wie z.B. Fische, eher einzelne Individuen untersucht werden. Da sich das Prinzip der Untersuchungen aber kaum unterscheidet, werden hier Populationen und Organismen zusammen abgehandelt. Der Einfachheit halber wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels nur von Organismen gesprochen, womit auch Populationen gemeint sind. Bei den Ebenen Populationen und Organismen kann man drei verschiedene Ansätze unterscheiden: Feldstudien, Laborstudien und das Online-Monitoring.

Feldstudien (aktives Biomonitoring): Für die Untersuchung von Organismen im Feld, werden dazu meistens Käfige oder andere Behältnisse verwendet, die vom Wasser durchströmt werden. Dies hat den Vorteil, dass für Kontrollen und Versuch eine einheitliche Gruppe von Organismen verwendet werden kann und dass die Tiere nicht

ihren Standort wechseln können, um Schadstoffen auszuweichen. Die Organismen bleiben meistens über Wochen oder Monate an ihren Standorten bevor sie zur Analyse ins Labor geholt werden. Die Versuchsbedingungen (Wie Individuendichte und Nahrung etc.) sind für die Organismen allerdings oft unnatürlich und verursachen einen zusätzlichen Stress. Das Ausbringen und Einholen der Organismen bedarf eines hohen Arbeits- und Zeitaufwandes und die anschließenden Untersuchungen im Labor, sind meist ebenfalls arbeitsaufwendig, da oft viele Organismen an einem Standort untersucht werden.

Laborstudien: Wenn die Reaktion von Organismen auf die Wasserqualität im Labor untersucht werden soll, können entweder Organismen verwendet werden, die natürlich am Ort der Probenahme vorkommen, oder es können Organismen verwendet werden, die im Labor gezüchtet worden sind. Die Verwendung von standortspezifischen Arten hat den Vorteil, dass die ökotoxischen Untersuchungen wirklich mit Arten durchgeführt werden, die für das betroffene Ökosystem relevant sind. Dieses Vorgehen wird aber häufig dadurch erschwert, dass über die Biologie dieser Arten oft nicht genügend bekannt ist, wodurch eine artgerechte Hälterung oft schwierig ist. Hinzu kommt, dass auch die Interpretation der Resultate ist aufgrund fehlender Vergleichsdaten sehr schwierig ist, vor allem bei niedrigen Schadstoffkonzentrationen, bei denen keine sehr starken Änderungen zu erwarten sind.

Deshalb wird häufig auf Organismen zurückgegriffen, die leicht im Labor zu hältern sind und deren Biologie besser bekannt ist. Dies hat den Vorteil, dass auch auf standardisierte Protokolle zurückgegriffen werden kann (z.B. auf Tests aus den OECD Richtlinien, s. Tab. 1), was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten und Datenbanken erleichtert. Die akute Toxizitätstests (in der Regel < 1 Woche) sind aber zu unempfindlich für Oberflächengewässer, während chronischen Tests (ihre Dauer überschreitet 10% der Lebenserwartung des Organismus) sehr teuer sind und deshalb für das Modul Ökotoxikologie nicht in Frage kommen.

Online-Monitoring: Beim Online-Monitoring werden meistens einzelne Arten beobachtet, es können aber auch Ausschnitte eines Ökosystems (z.B. Aufwuchsgemeinschaften) untersucht werden. Hierzu werden Organismen einzeln oder in kleinen Gruppen in Behältern gehalten, durch die das zu untersuchende Wasser geleitet wird. Das Verhalten der Organismen (z.B. Atmung oder Schwimmverhalten) wird elektronisch registriert und ausgewertet. Bei starken Verhaltensänderungen kommt es zu Alarmsignalen. Online-Monitoring Systeme sind relativ empfindlich (Gerhardt and Clostermann, 1998) und wurden über Jahre zur Überwachung des Rheins eingesetzt. Dabei wurden die Organismen nach einer Woche ausgewechselt, so dass kaum eine Akkumulation von Schadstoffen stattfinden konnte und auch keine im Hinblick auf chronische Wirkungen verwertbare Ergebnisse erzielt wurden (LAWA-Arbeitskreis,

1999). Die Überwachung der Untersuchungsstationen ist aber sehr arbeitsaufwendig und deshalb wurden die Online-Monitoring Untersuchungen an vielen Stationen (unter anderem in Weil am Rhein) wieder eingestellt. Da im Modul Ökotoxikologie alle Schweizer Fließgewässer untersucht werden sollen, ist es sowohl aus Kostengründen, wie auch aus Gründen des hohen Arbeitsaufwandes nicht möglich an allen Fließgewässern Online-Monitoring Stationen einzurichten und zu unterhalten.

Für alle Untersuchungen, in denen Organismen oder Populationen untersucht werden gilt, dass nur ein kleiner Ausschnitt an Arten untersucht werden kann, und dass die Antworten dieser Arten nur begrenzt repräsentativ sein können für das gesamte Ökosystem. Ein weiterer wichtiger Nachteil ist, dass viele toxische Antworten, die sich nicht innerhalb weniger Tage oder Wochen schädlich auswirken, nicht berücksichtigt werden. Dazu gehören unter anderem Effekte auf das Hormon- und Immunsystem und Schäden am Erbgut.

Zellen: Auch Zellen können in ökotoxikologischen Tests verwendet werden. Es können entweder Zellen höherer Organismen (z.B. Fische) oder einzellige Organismen, wie z.B. einzellige Algen, Hefezellen oder Bakterien verwendet werden. Bei den Zellen höherer Organismen kann es sich um Zellen handeln, die vor jedem Versuch frisch aus dem Organismus isoliert werden (Primärzellen), oder es können Zelllinien eingesetzt werden, die sich über längere Zeit im Labor kultivieren lassen. Bei allen Zellen kann es sich entweder um genetisch unveränderte oder genetisch veränderte Zellen handeln. So können z.B. rekombinante Hefezellen eingesetzt werden, um die hormonaktive Wirkung von Wasserproben aufzudecken. Diese Zellen enthalten ein Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor welches kombiniert ist mit einem Gen für ein Markerprotein. Mit diesen Hefezellen kann in technisch einfachen Systemen die Aktivität des Markerproteins untersucht werden, welche anzeigt, ob die Wasserproben eine östrogene Wirkung haben (Routledge and Sumpter, 1996). Durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden, der sich zur Zeit hauptsächlich auf die zelluläre Ebene beschränkt, können mit Versuchen auf dieser Ebene die Wirkmechanismen eines Schadstoffes genauer untersucht werden. Der Einsatz rekombinanter Mikroorganismen und rekombinanter Zellen höherer Organismen ermöglicht die Untersuchung verschiedener, chronischer Wirkmechanismen (z.B. östrogene, androgene und progestogene Wirkungen (Ackermann, 2000; Gracia-Reyero et al., 2001; Routledge and Sumpter, 1996) oder DNA-Schäden (Schweigert et al., 1999)). Es werden in den nächsten Jahren sehr wahrscheinliche noch weitere Wirkmechanismen hinzukommen.

Versuche mit zellulären Systemen dauern meist wenige Stunden, in Ausnahmefällen Tage. Ein weiterer Vorteil ist, dass keine Tiere eingesetzt werden müssen (zumindest nicht, wenn kultivierbare Zelllinien verwendet werden) und dass die Versuche nur

wenig Laborplatz beanspruchen. Viele dieser Versuche können in sogenannten Mikrotiterplatten durchgeführt werden, wodurch viele Proben in einem einzigen Versuch untersucht werden können. Auch dies ist gute Voraussetzung zur Automatisierbarkeit, was bei einem routinemässigen Einsatz von grossem Vorteil wäre. Die Kosten der Untersuchungen sind beim Einsatz von Mikrotiterplatten gering. Nachteile von Untersuchungen auf der zellulären Ebene sind, dass – wie auch schon auf der Organismenebene – eine Auswahl des zu untersuchenden Organismus getroffen werden muss, bei der zellulären Ebene kommt hinzu, dass auch der Zelltyp ausgewählt werden muss. Auf der zellulären Ebene kann nur ein toxisches Potential von Wasserproben bestimmt werden. Ob die Wasserprobe auf einer biologischen Ebene zu toxischen Effekten führt, muss auf einer höheren biologischen Ebene (z.B. Organismen) überprüft werden.

subzelluläre Ebene: Für Untersuchungen auf der subzellulären Ebene werden Zellbestandteile (z.B. Mitochondrien, Membranvesikel oder Lysosomen) den zu untersuchenden Wasserproben ausgesetzt. Der Vorteil dieser Untersuchungen ist, dass Schäden analysiert werden können, ohne dass sie durch zelluläre Reparatursysteme wieder repariert werden. Dies hat aber auch einen Nachteil: Die Zahl der gemessenen Schäden, ist im Vergleich zur zellulären Ebene, in der die Reparatursysteme aktiv sind, erheblich höher. Um alle möglich toxischen Wirkmechanismen von Chemikalien erfassen zu können, sind auf der subzellulären Ebene sehr viele Testsysteme notwendig. Dies würde den Ausmass einer Screeningtestbatterie, wie sie im Rahmen des Moduls Ökotoxikologie möglich wäre, überschreiten. Tests der subzellulären Ebene eignen sich aber als Frühwarnsystem, um bestimmte Gefahrenpotentiale abzuschätzen (Escher et al., 1997).

molekulare Ebene: Auf dieser Ebene werden die Bausteine der Zelle, z.B. die DNA direkt den Wasserproben ausgesetzt und die Schäden werden anschliessend gemessen. Die grossen Vorteile der molekularen Ebene bestehen darin, dass einerseits die von Schadstoffen hervorgerufenen Schäden sich zuerst auf dieser Ebene etablieren, das heisst auf dieser Ebene als erstes zu messen sind. Da die Bausteine der Zellen (z.B. DNA, Lipide) in allen Organismen relativ ähnlich aufgebaut sind, sind die Schäden auf dieser Ebene auch bei allen Organismen relativ einheitlich. Allerdings gilt auch auf der molekularen Ebene, dass keine Reparatursysteme aktiv sind. Die Anzahl der Testsysteme, die zur Erfassung aller möglichen toxischen Antworten notwendig wäre, wäre noch grösser als auf der subzellulären Ebene, da die molekulare Ebene die niedrigste Integrationsstufe darstellt.

Biomarker: Unter Biomarker verstehen wir molekularbiologische, biochemische und physiologische Reaktionen auf Stressbedingungen. Biomarker werden in diesem Bericht gesondert behandelt, da sie auf verschiedenen Ebenen gemessen werden können.

In den letzten Jahren hat die Anzahl von Biomarkeruntersuchungen in der Ökotoxikologie stark zugenommen, wie auch die Herausgabe der neuen internationalen Zeitschrift „Biomarkers“ zeigt. Untersucht werden können DNA-Addukte, Membranstabilitäten, und die Konzentration oder Aktivität von Proteinen (z.B. metallbindende Proteine oder detoxifizierende Enzyme, wie die Cytochrom P-450 Gruppe), als auch Verhaltensänderungen von Organismen. Von daher können Biomarkeruntersuchungen auch auf einer grossen Breite der biologischen Ebenen durchgeführt werden.

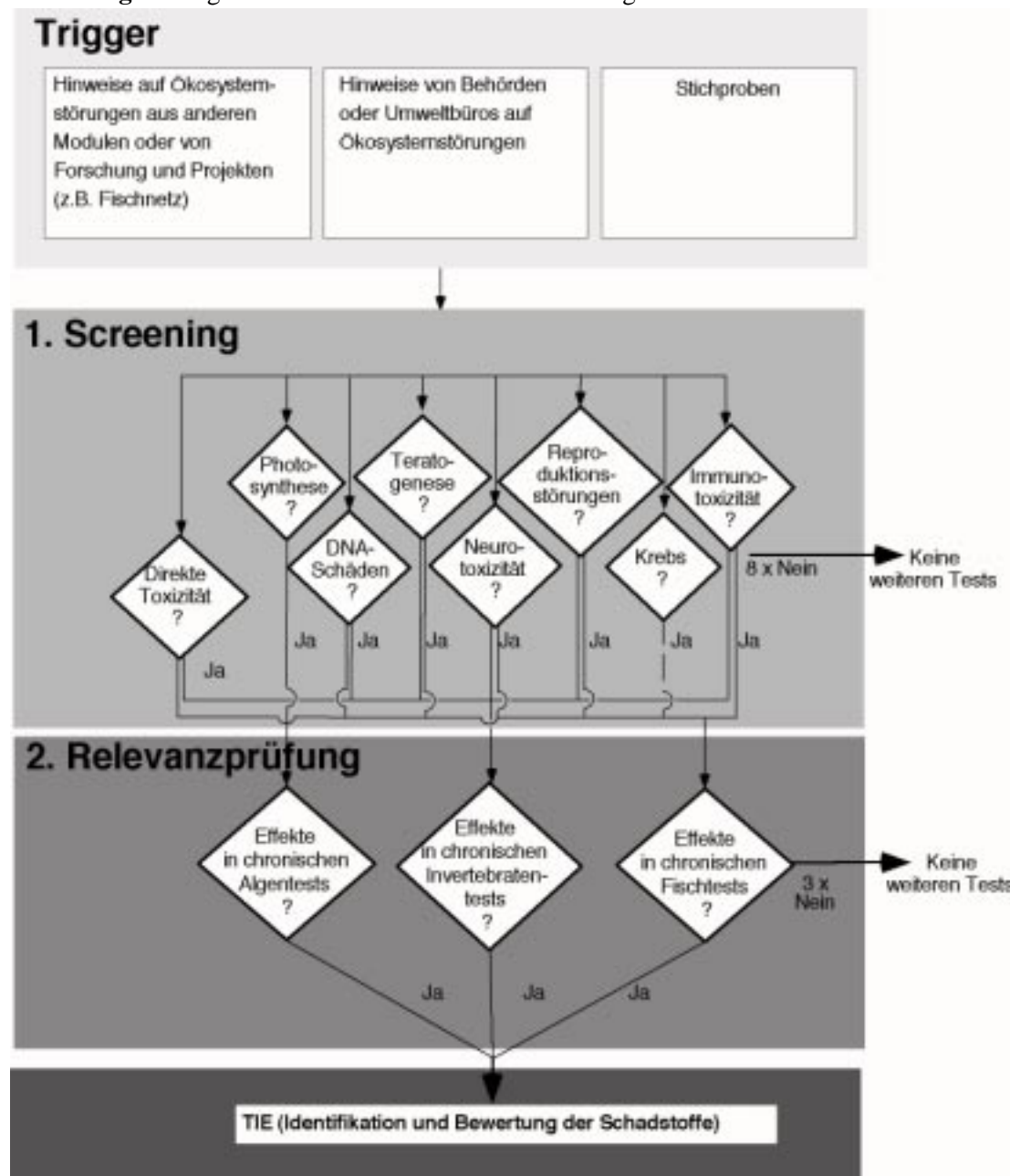
Diese Zusammenfassung möglicher ökotoxikologischer Ansätze soll einen kurzen Einblick in die Ökotoxikologie geben und ist weit davon entfernt vollständig zu sein. Für eine regelmässige Untersuchung von Fließgewässerproben ist es notwendig, dass viele Proben mit schnellen, preisgünstigen aber sensitiven Methoden untersucht werden. Am geeignetsten dafür sind die zellulären Ansätze.

3. Das Konzept für das Modul Ökotoxikologie

In Fließgewässern liegt ein unbekanntes Gemisch von Chemikalien vor, welches in Organismen viele verschiedene toxische Effekte hervorrufen kann. Es gibt leider keinen Schnelltest mit dem die Bandbreite der möglichen toxischen Wirkungen dieses Schadstoffgemisches abgedeckt werden kann. Deshalb macht es auch für das Modul Ökotoxikologie wenig Sinn drei verschiedene Vorgehensweisen für die Stufen F, S und A des MSK zu entwickeln, wo für die Stufe F eine geringe Untersuchungstiefe mit wenigen preisgünstigen und schnellen Tests gefordert ist. Im Modul Ökotoxikologie braucht es als Minimum aber eine Testbatterie, um die wichtigsten toxischen Antworten abzudecken.

Wir schlagen daher vor, dass im Modul Ökotoxikologie alle Wasserproben den gleichen Untersuchungen unterzogen werden. Diese Untersuchungen sind in zwei Stufen anzuordnen (Abb. 1). In der ersten Stufe wird ein Screening durchgeführt, in dem überprüft wird, ob die Wasserproben ein toxisches Potential haben. Es sollen dabei soweit wie möglich alle relevanten toxischen Antworten abgedeckt werden. Wasserproben, die ein toxisches Potential aufweisen, sollen anschliessend in der 2. Stufe weiter untersucht werden. Dabei soll überprüft werden, ob dieses toxische Potential auf einer höheren Ebene, z.B. der Organismen-Ebene, zum Ausdruck kommt.

Abbildung 1. Vorgehensweise beim Modul Ökotoxikologie.



3.1. Trigger und Probenahmen

Die Anwendung ökotoxikologischer Tests bedingt, dass am Standort die Entnahme repräsentativer Proben möglich ist. Bei Wasser und Abwasserproben bieten sich Sammelproben (z.B. Wochenproben) an, bei Sedimentproben ist die Entnahme von Replikaten notwendig, da die Schadstoff-Konzentrationen im Sediment auf engen Raum stark schwanken können (Stemmer et al., 1990). Bei der Probenahme ist eine Zusammenarbeit mit den anderen Modulen, vor allem den Modulen der Biologie und

Chemie wünschenswert, um den Aufwand für die Module so gering wie möglich zu halten. Finden die Untersuchungen in den verschiedenen Modulen an den gleichen Stellen statt, kann dies die Interpretation der Ergebnisse der einzelnen Module stark erleichtern. Die Wasserproben, die direkt im Fließgewässer genommen werden, müssen für ökotoxikologische Untersuchungen wahrscheinlich aufkonzentriert werden. Dazu sind in den letzten Jahre eine Anzahl Methoden entwickelt worden (Hendriks et al., 1994; Parkerton et al., 2000; Verbruggen et al., 2000; Verbruggen et al., 1999).

3.2. Stufe 1: Screening von Wasserproben auf ihr toxisches Potential

In dieser Stufe sollen relevante toxische Antworten abgedeckt werden. Zu den heute bekannten toxischen Antworten zählen: die direkte Zelltoxizität, Photosynthesehemmung, DNA-Schäden, Teratogenese (Keimschäden), Neurotoxizität, Reproduktionsschäden, nicht durch DNA-schädigende Chemikalien verursachter Krebs und Immuntoxizität (s. Abb. 1).

3.2.1. Auswahl der Vorgehensweise anhand eines Kriterienkataloges

Da bei einer routinemässigen Fließgewässerbewertung viele Wasserproben untersucht werden müssen, ist es wichtig, ein Screeningsystem aufzubauen, welches einerseits kostengünstig ist und schnell zu Antworten führt, andererseits aber auch sensitiv ist. In diesem Abschnitt werden die einzelnen Auswahlkriterien kurz diskutiert und in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die **Ökosystemrelevanz** ist am höchsten, wenn die Schadstoffeffekte im Ökosystem selber untersucht werden. Die Ökosystemrelevanz nimmt von der Ebene des Ökosystems hin zur molekularen Ebene immer weiter ab. Testverfahren, die auf zellulären Methoden beruhen haben daher in erster Linie keine sehr hohe Ökosystemrelevanz. Mit ihnen kann aber in Screeningstests das toxische Potential von Wasserproben erfasst werden, welches anschliessend auf einer höheren Ebene untersucht werden kann. Die **Sensitivität** von Testsystemen spielt bei der Auswahl der Vorgehensweise eine entscheidende Rolle. Eine hohe Sensitivität weisen molekulare und subzelluläre Methoden auf, wenn die Effektkonzentration auf die Wirkortkonzentration bezogen wird (Escher et al., 1997; Gülden et al., 2001; Gülden and Seibert, 1997; Schweigert et al., 2000). Da aber eine gründliche Erfassung des toxischen Potentials den Rahmen des Moduls Ökotoxikologie sprengen würde, werden hier nur die praktikableren biologischen Ebenen diskutiert. Der Einfluss von niedrigen Schadstoffkonzentrationen kann einerseits mit chronischen Expositionen von Organismen oder Ökosystemen nachgewiesen werden, da chronische Tests fast immer sensitiver sind als akute Tests (Koller et al., 2000). Durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden in zellulären Testsystemen können chronische Effekte, die durch niedrige Schadstoffkonzentrationen verursacht werden, auch schon innerhalb von Stunden oder wenigen Tagen

in zellulären Systemen nachgewiesen werden (Ackermann, 2000; Gracia-Reyero et al., 2001; Routledge and Sumpter, 1996).

Innerhalb der biologischen Stufen nimmt die **Schnelligkeit** mit der sich Schadstoffeffekte etablieren, vom Ökosystem zum Molekül immer weiter zu (Adams et al., 2000). Dies trifft vor allem bei niedrigen Schadstoffkonzentrationen zu. Während auf der molekularen oder zellulären Stufe die Effekte innerhalb von Minuten oder Stunden (in Ausnahmefällen Tagen) gemessen werden können (Oda et al., 1985; Routledge and Sumpter, 1996; Schreiber, 1994), dauert es im Lebensgemeinschaften Wochen, Monate oder sogar Jahre bis Jahrzehnte bis sich die Effekt messbar etabliert haben (Schindler, 1987; Soldo and Behra, 2000). Für einen hohen Probenumsatz ist es auch wichtig, dass die Untersuchungen so weit wie möglich automatisiert werden können, so dass der Arbeitsaufwand und damit die Kosten niedrig gehalten werden können. Eine **Automatisierbarkeit** ist aber weder bei Ökosystem- oder Modellökosystemuntersuchungen oder Organismenstudien derzeit absehbar. Nur im Online-Monitoring von Organismen ist eine Automatisierbarkeit erreicht worden (Gerhardt and Clostermann, 1998). Da zelluläre Tests oft in Mikrotiterplatten durchgeführt werden können, ist es hier durchaus vorstellbar, dass später eine Automatisierbarkeit möglich wäre. Für die molekulare Ebene, wäre dieses auch denkbar.

Die **Kosten** sind stark abhängig von der zu untersuchenden Ebene. Während gründliche Untersuchungen im Ökosystem oder mit Modellökosystemen Kosten von hunderttausend Franken und mehr verursachen können, kosten akute Organismen tests im Auftragslabor um die tausend Franken. Bei zellulären Tests kann mit deutlich geringeren Kosten gerechnet werden, vor allem wenn mehrere Proben gleichzeitig in Mikrotiterplatten untersucht werden können. Den Kosten für die experimentelle Durchführung stehen die Kosten für die Probenahme gegenüber, welche je nach Entfernung und Zugänglichkeit stark variieren können. Da Probenahmen zeitaufwendig sind (hierbei sind vor allem die Personalkosten zu beachten) können sie die Kosten der experimentellen Teils überschreiten.

Auch die **ethische Gesichtspunkte** haben bei der Wahl der Vorgehensweise eine entscheidende Rolle gespielt. Unter diesem Kriterium schneiden molekulare, subzelluläre und zelluläre Testsysteme positiv ab, wenn dafür nicht immer wieder auf frisch isolierte Zellen höherer Organismen zurückgegriffen werden müssen. Dies kann durch die Verwendung von Mikroorganismen und kultivierbaren Zelllinien höherer Organismen verhindert werden, wie bei der Messung von östrogen-aktiven Substanzen gezeigt werden konnte (Ackermann, 2000; Routledge and Sumpter, 1996). In Tabelle 2 sind die von uns verwendeten Auswahlkriterien für ökotoxikologische Tests zusammengestellt und die einzelnen Untersuchungsebenen vom Ökosystem bis zum Molekül bewertet worden.

Tabelle 2. Auswahlkriterien für die Tests der Screening-Testbatterie der 1. Stufe

<i>Ebene der Tests</i>	<i>Ökosystem-relevanz</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Schnelligkeit</i>	<i>Reproduzierbarkeit</i>	<i>Automatisierbarkeit</i>	<i>Kosten</i>	<i>Ethik</i>
Ökosystem	+++	+/-	-	-	-	sehr hoch	-
Modell- ökosystem	++	++	-	-	-	sehr hoch	-
Population/ Organismen	+	+/-	+/-	+	-	hoch	-
Organ	+	+/-	+/-	+	-	hoch	-
Zelle	+/-	++	+++	++	+++	niedrig	(-) +++ ¹
Subzelluläre Partikel	-	++	+++	+++	+/-	niedrig	(-) +++ ¹
Molekül	-	+++	+++	+++	-	niedrig	(-) +++ ¹

¹ Wenn die Zellen oder Moleküle frisch aus Organismen isoliert werden, ist die Ethik negativ zu bewerten, werden aber Zelllinien verwendet, so ist sie positiv zu bewerten.

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass sich vor allem Tests auf der (sub-)zellulären Ebene zu einem Screening vieler Wasserproben eignen. Mit dem Einsatz einer Testbatterie, in der die verschiedenen möglichen toxischen Wirkungen auf die verschiedenen Organismen untersucht werden, kann das Potential abgeschätzt werden, welches Wasserproben auf Organismen bzw. ein Ökosystem haben könnten. Dieses toxische Potential muss dann mit einem Test auf höherer biologischer Ebene überprüft werden. Entsprechend ist das Modul Ökotoxikologie aufgebaut.

3.2.2. Die Screening-Testbatterie der 1. Stufe

In den nächsten Abschnitten werden Testsysteme vorgestellt, die für eine Anwendung in dieser Screening-Testbatterie in Erwägung gezogen werden. Es soll hier in diesem Zusammenhang betont werden, dass wir bei der Auswahl der Testsysteme diejenigen bevorzugt haben, die sich auf internationaler Ebene in der Praxis oder Forschung etabliert oder durchgesetzt haben. Diese Auswahl ist aber nicht endgültig und kann bei der Entwicklung neuer Testsysteme oder zusätzlichen wissenschaftlichen Erkenntnissen von bestehenden Testsystemen angepasst werden. Die Screening-Testbatterie kann auch erweitert werden, falls toxische Antworten entdeckt werden, die mit der hier vorgestellten Batterie nicht abgedeckt werden.

Einige toxische Antworten, wie Teratogenese (Keimschäden) und Störungen der Immunantwort, sind mit zellulären Testsystemen nicht zu erfassen, da sie auf komplexen Mechanismen beruhen, in denen zell- und organübergreifende Interaktionen eine Rolle spielen.

- **Direkte Zelltoxizität:** Die direkte Zelltoxizität kann durch viele verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Als Testsysteme haben wir den Microtox[®], bzw. Lumistox[®] Test (Link, 1990) und den MetPLATE[™] (Bitton et al., 1994; Bitton and Koopman, 1992) ausgewählt. Der Microtox[®]-Test ist bereits standardisiert (Standardization, 1998a;b;c), dieser Test wird zur Zeit hauptsächlich in Küvetten durchgeführt, es gibt aber Entwicklungsansätze für ein Mikrotiterplattenverfahren. Diese Entwicklung wäre für das Modul Ökotoxikologie wünschenswert. Der Microtox[®]-Test ist bekannterweise sensitiv für organische Schadstoffe, während MetPLATE[™] speziell für Metalle sensitiv ist (Bitton and Koopman, 1992).
- **Photosynthese-Hemmung:** Die Photosynthese dient pflanzlichen Zellen, Algen und einigen Bakterien zur Energiegewinnung. Eine Hemmung der Photosynthese und damit eine verminderte Primärproduktion wirkt sich in der Regel negativ auf ein Ökosystem aus, es ist von daher notwendig die Effekte auf die Photosynthese in dieser Testbatterie mit zu erfassen. Das von uns ausgewählte Testsystem (Puls Amplituden modulierte Fluoreszenz; PAMF) misst die Hemmung der Photosynthese mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz (Schreiber, 1994). Es ist an der EAWAG mit verschiedenen Pestiziden ausgetestet worden und hat sich im Vergleich zu Literaturdaten als eines der sensitivsten Messsysteme erwiesen.
- **DNA-Schäden:** Für die Messung von DNA-Schäden wurde ein bakterielles Testsystem ausgewählt, in dem nicht die DNA-Schäden selber gemessen werden, sondern die Induktion eines DNA-Reparaturmechanismus, mit dem die meisten DNA-Schäden repariert werden. Hierfür schlagen wir aufgrund von Diskussionen mit Gert-Jan de Maagd (RIZA, Niederlande), welcher drei bakterielle Mutagenizitätstest verglichen hat, den umuC Test vor (DIN 38415-3, 1996; Oda et al., 1985). Da die meisten Bakterien nur ein Chromosom besitzen, können Schäden, wie Chromosomenaberration, die Bildung von Micronuclei und der Austausch von Chromosomenstücken, wie sie in Eukaryontenzellen vorkommen können, nicht untersucht werden (Houk, 1992). Deshalb sollte noch ein zusätzlicher Test für diese Eukaryonten-spezifischen DNA-Schäden mit in die Testbatterie aufgenommen werden. Es gibt aber momentan noch keinen Test, der die Ansprüche eines Screeningtests erfüllt und mit dem alle diese Schäden gemessen werden können.
- **Reproduktionsschäden** werden häufig durch hormonaktive Schadstoffe in der Umwelt verursacht (Vos et al., 2000). Für die Untersuchung von östrogenen Wirkungen sind in den letzten Jahren eine Reihe von Screeningtests entwickelt worden. In der aquatischen Ökotoxikologie werden dazu entweder Fisch-

zelllinien oder Hefezellen verwendet (Arnold et al., 1996; Gagne and Blaise, 2000; Gracia-Reyero et al., 2001; Islinger et al., 1999; Routledge and Sumpter, 1996). Ein bereits an der EAWAG erprobtes Hefestestsystem ist der von Routledge und Sumpter entwickelte „YES-Assay“ (yeast estrogen system assay) (Routledge and Sumpter, 1996). Da sich Testsysteme mit Hefezellen und Fischzelllinien nicht sehr in ihrer qualitativen und quantitativen Aussage vergleichbar (Rutishauser et al., 2001), Hefezellen aber einfacher zu handhaben sind und sich im Rahmen des EU-Comprehend Projektes bewährt haben (www.ife.ac.uk/comprehend/), schlagen wir den Einsatz von Hefezellen vor. Auch für die Untersuchung anderer hormoneller Wirkungen sind Screeningtests entwickelt worden. Um die androgene Wirkung von Wasserproben zu messen, ist ein, dem YES-Assay entsprechender Test (YAS-assay), entwickelt worden. Auch dieser Test soll mit in die Testbatterie aufgenommen werden. Die Interaktion von Chemikalien mit dem Progesteronrezeptor von Fischen konnte inzwischen auch gezeigt werden (Thomas, 2000), auch für diese Schadwirkung gibt es bereits einen Hefeassay (Gracia-Reyero et al., 2001). Für weitere hormonelle Wirkungen sind uns zur Zeit noch keine Screeningtest bekannt, aber es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft auch die Interaktion von Schadstoffen mit anderen Hormonrezeptoren in Screeningtests untersucht werden kann.

- Keimschäden (Teratogenese): Für die Untersuchung von Keimschäden stehen, wie bereits erwähnt, keine zellulären Testsysteme zur Verfügung. Tests, die für die Untersuchung der keimschädigenden Wirkung von Schadstoffen eingesetzt werden, verwenden befruchtete Eizellen von Fischen (OECD Richtlinie 210) oder Amphibien (Fort et al., 2000; OECD, 2000). In diesen Tests wird die Entwicklung des Embryos bis kurz vor dem Schlüpfen verfolgt. Der Test kann aber auch nach 48 Stunden beendet werden (Schulte and Nagel, 1994). Da dieser Test darauf beruht, Veränderungen der Embryonen mit dem Mikroskop festzustellen, bedeutet dies einen grösseren Arbeitsaufwand, als es für einen Screeningtest angebracht wäre. Es scheint uns aber trotzdem notwendig, diesen Test mit in die Testbatterie mit aufzunehmen, da Keimschäden für eine Population und für ein Ökosystem schwerwiegende Folgen haben können.
- Immunotoxizität: In der Immunotoxikologie werden Schäden am Immunsystem aufgedeckt, welche den Organismus schwächen. In den letzten Jahren sind auch zelluläre Testsysteme entwickelt worden. Sie sind aber sehr arbeitsaufwendig und deshalb nicht unbedingt für ein Screeningtest geeignet (Anderson and Zeeman, 1995). Mit den verschiedenen Testsystemen können auch nur kleine Ausschnitte der Immunotoxizität abgedeckt werden. Zur Zeit

ist der Einsatz von 4-5 aufwendigen Tests notwendig, um diese toxische Antwort abzudecken (Köllner, 2001). Deshalb werden wir die Immunotoxizität anfänglich noch nicht mit in die Testbatterie der 1. Stufe aufnehmen können.

- Neurotoxizität: Auch für die Neurotoxizität (Störungen im Bereich des Nervensystems) sind uns keine Testsysteme bekannt mit welchem ein Grossteil der neurotoxischen Effekte erfasst werden kann, und welche für einen Einsatz in einer Testbatterie geeignet wären (Hawkins et al., 1995; Kier, 1987; van Delft et al., 1998). Im Oktober 2001 hat das europäische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM) ein Workshop stattgefunden, indem die Möglichkeiten von *in vitro* Methoden zur Erfassung von Neurotoxizität diskutiert worden sind. Ein Testsystem mit embryonalen Hirnzellaggregaten von Ratten soll jetzt in die Vorvalidierungsphase gehen (<http://www.forschung3r.ch/de/publications/bu15.html>), aber für aquatische Organismen sind noch keine Testsysteme soweit entwickelt (Honegger, pers. com.).
- Krebs, ausgelöst durch nicht DNA-schädigende Chemikalien: Zu den krebserregenden Stoffen zählen viele Chemikalien, die DNA-Schäden verursachen, aber es gibt auch Chemikalien, die Krebs verursachen ohne die DNA zu schädigen (Hawkins et al., 1995). Die Mechanismen, die zu diesem sogenannten nicht-genotoxischen Krebs führen, sind bisher kaum verstanden, zur Zeit gibt es auch noch keinen Screeningtest für krebserregende Stoffen, mit dem alle nicht DNA-schädigende Stoffe erkannt werden können (Hawkins et al., 1995; Kier, 1987; van Delft et al., 1998). Da Krebs bei aquatischen Organismen, genau wie beim Menschen, in der Regel erst im fortgeschrittenen Alter auftritt und daher die Reproduktion selten beeinflusst, hat er wenig Auswirkungen auf die Populationsdichte und das Ökosystem. Wir halten daher die Untersuchung auf krebserregende Substanzen nicht für prioritär und werden entsprechende Test vorerst nicht mit in die Screening-Testbatterie mit aufnehmen.

3.3. Stufe 2: Relevanzprüfung

In der 2. Stufe des Moduls Ökotoxikologie sollen die Wasserproben weiter untersucht werden, die in der Screening-Testbatterie zu einer oder mehreren positiven Antworten geführt haben. In dieser 2. Stufe soll überprüft werden, ob die positive Antwort auf der zellulären Ebene auch auf die Organismenebene übertragbar ist, oder ob in Organismen kein Effekt mehr festgestellt werden kann. Mit welchen Organismen und Testverfahren die Versuche der 2. Stufe durchgeführt werden, wird einerseits davon abhängen, welche Tests in der ersten Stufe positiv waren und aus welcher Gegend die

Probe stammt. Sind in der 1. Stufe extrahierte Sedimentproben untersucht worden, so sind hier in der 2. Stufe auch Sedimentorganismen zu verwenden. Generell sollen bei allen toxischen Antworten (ausser Photosynthese-Hemmung) in der 2. Stufe Relevanzprüfungen mit Vertebraten (Fischen) und Invertebraten durchgeführt werden. Man muss sich aber darüber im Klaren sein, dass die Entwicklung von Testsystemen für Vertebraten viel weiter fortgeschritten ist, und dass von daher der Einsatz von Invertebraten-Testsystemen nicht von Anfang an stattfinden kann. Für die Entscheidung über die zu verwendenden Organismen und Testsysteme sind, zumindest in der ersten Zeit, Experten hinzuzuziehen. Eine Verwendung von Organismen, die in den betroffenen Gewässern natürlicherweise anzutreffen sind, ist zu bevorzugen. Es können aber nur Arten verwendet werden, die kultiviert und deren biologischen Ansprüche einigermaßen bekannt sind. Am Anfang wird wahrscheinlich von Fall zu Fall entschieden werden müssen, welche Organismen in dieser Stufe untersucht werden sollen und wie ein Versuch aufzubauen ist, um die toxische Antwort des Screeningtests zu überprüfen. Aus praxisorientierten Gründen ist aber auf die Dauer die Verwendung einiger weniger Arten anzustreben. Die Wahl des Testsystemes wird sich auch unterscheiden, wenn eine akute toxische Antwort überprüft werden soll, oder wenn Effekte auf die Reproduktion zu erwarten sind.

3.4. TIE (*Toxicity-Identification-Evaluation*)

Wenn sich eine toxische Antwort in der 2. Stufe bestätigt hat, so muss der oder die Schadstoff(e), wenn möglich, identifiziert werden, denn nur so kann eine Reduktion der Einleitung erreicht werden. Bei einem TIE werden die Wasserproben in verschiedenen Schritten aufgearbeitet (z.B. durch pH-Veränderung) und fraktioniert (z.B. mit C18-Säulen). Nach den einzelnen Schritten kann die Toxizität mittels des positiven Screeningtests wieder überprüft werden. Die US-amerikanische Umweltbehörde hat ausführliche Empfehlungen zum Vorgehen bei einem TIE veröffentlicht (EPA, 1991;1993a;b). Die einzelnen Fraktionen können zwischendurch mit dem Screeningtest, welcher in der ersten Stufe positiv war, getestet werden. Am Ende muss versucht werden, den Schadstoff mittels chemischer Analysen, zu identifizieren.

4. Das Modul Ökotoxikologie im Rahmen des MSK

Das Modul Ökotoxikologie kann im MSK die Brücke zwischen dem Chemie-Modul und den Modulen der Biologie schlagen, indem leichter Zusammenhänge zwischen der chemischen Belastung und Änderungen im Ökosystem überprüft werden können. Die Module der Biologie können der Ökotoxikologie darüber Daten liefern, in welchen untersuchten Ökosystemen negative Einflüsse erkennbar sind, die keine eindeu-

tige Ursache haben. Das Modul Chemie kann wiederum Hinweise auf das Vorliegen verdächtiger Stoffe liefern, welche als Trigger für ökotoxische Untersuchungen dienen können. Für eine endgültige Identifikation toxischer Stoffe ist die Chemie auch unentbehrlich.

Wenn in Stichproben ökotoxikologische Potentiale aufgedeckt werden, sollte dies in den anderen Modulen der Biologie und Chemie berücksichtigt werden, und intensive chemische und biologische Untersuchungen sollten eingeleitet werden. Eine enge Zusammenarbeit dieser Module ist eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche umfassende Fliessgewässerbewertung durch das MSK.

5. Offene Fragen

Da wir bei der Umsetzung dieses Konzepts noch am Anfang stehen, gibt es auch noch viele offene Fragen, die vor einem routinemässigen Einsatz zu lösen sind. Es stehen zur Zeit noch nicht für alle toxische Antworten Screeningtests zur Verfügung, die in der Testbatterie der 1. Stufe eingesetzt werden können. Sobald aber geeignete Tests entwickelt worden sind, können sie mit in die Testbatterie aufgenommen werden.

Eine Frage, die momentan noch nicht beantwortet werden kann, ist, wie stark die Antwort im Screeningtest sein müssen, um sie als positiv zu bezeichnen und einen Test der 2. Stufe durchzuführen. Diese Frage kann erst beantwortet werden, wenn die einzelnen Testmethoden aufgebaut und die toxischen Antworten aus Stufe 1 mit den Effekten in Stufe 2 hinreichend verglichen worden sind. Auch in der 2. Stufe wird sich die Frage stellen, wie stark die Antwort sein muss, um sie als positiv zu bezeichnen und anschliessend ein TIE durchzuführen. Auch die Auswahl der Organismen und Methoden der 2. Stufe ist derzeit, wie bereits erwähnt, noch offen.

6. Aktivitäten an der EAWAG

An der EAWAG wird jetzt eine Machbarkeitsstudie zum Modul Ökotoxikologie durchgeführt. Das erste Ziel ist die Zusammenstellung und das Austesten der Screening-Testbatterie der 1. Stufe, dazu werden Methoden verwendet, die bereits in der Forschung etabliert sind. Die einzelnen Testverfahren werden mit einzelnen Chemikalien, Chemikaliengemischen und Umweltproben auf ihre Sensitivität und Robustheit geprüft. Es werden Protokolle entwickelt, die eine standardisierte Verwendung der Methoden erlauben. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse der 1. Stufe auf die 2. Stufe soll in Zusammenarbeit mit anderen Instituten (z.B. RIZA in den Niederlanden) stattfinden.

7. Danksagungen

Wir möchten uns bei der EAWAG für die finanzielle Unterstützung zur Erarbeitung dieses Konzeptes bedanken. Weiterer Dank gilt allen Diskussionspartnern, die mit Ideen und konstruktiver Kritik bei der Ausarbeitung mitgeholfen haben.

8. Referenzen

- Ackermann, G. E. (2000). *Assessment of Environmental Compounds with Estrogenic Activity in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in the Rainbow Trout Gonad Cell Line RTG-2*. Ph. D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology
- Adams, S. M., Greeley, M. S. J. and Ryon, M. G. (2000). Evaluating Effects of Contaminants on Fish Health at Multiple Levels of Biological Organization: Extrapolating from Lower to Higher Levels. *Human and ecological risk assessment* 6, 15-27
- Anderson, D. P. and Zeeman, M. G. (1995). Immunotoxicology in Fish. In Rand, G. M. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology - Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* (1125). Washington D.C., London: Taylor and Francis 1125
- Arnold, S. F., Robinson, M. K., Notides, A. C., Guillette, L. J. and McLachlan, J. A. (1996). A Yeast Estrogen Screen for Examining the Relative Exposure of Cells to Natural and Xenoestrogens. *Environ. Health Persp.* 104, 544-548
- Bitton, G., Jung, K. and Koopman, B. (1994). Evaluation of a Microplate Assay Specific for Heavy Metal Toxicity. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 27, 25-28
- Bitton, G. and Koopman, B. (1992). Bacterial and Enzymatic Bioassays for Toxicity Testing in the Environment. *Rev. Environ. Cont. Toxicol.* 125, 1-22
- Bonga, S. E. W. (1997). The Stress Response in Fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625
- Bundi, U., Peter, A., Truffer, B., Wagner, W., Mauch, U. and Scheideger, A. (1997). The Quality of Aquatic Ecosystems as an Indicator for Sustainable Water Management. *Let the Fish speak: The quality of aquatic ecosystems as an indicator for sustainable water management*. Koblenz (Germany) 240
- BUWAL (1998). Modul-Stufen-Konzept. Report Nr.: 26
- de Graaf, P. J. F., Graansma, J., ten Kate, E. V., Tonkes, M. and Maas, H. (2000). Evaluation of Draft Protocol for Application of Acute Toxicity Tests. Report Nr.: FVWO 00.03

- EPA, U. S. (1991). Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Report Nr.: EPA/600/6-91/003
- EPA, U. S. (1993a). Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase Ii. Report Nr.: EPA/600/6-92/080
- EPA, U. S. (1993b). Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase Iii. Report Nr.: EPA/600/6-92/081
- Escher, B. I., Snozzi, M., Häberli, K. and Schwarzenbach, R. P. (1997). A New Method for Simultaneous Quantification of the Uncoupling and Inhibitory Activity of Organic Pollutants in Energy Transducing Membranes. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 405-414
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of Organotin Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1-117.
- Fort, D. J., Stover, E. L., Bantle, J. A. and Finch, R. A. (2000). Evaluation of the Developmental Toxicity of Thalidomide Using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax): Biotransformation and Detoxification. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 20, 35-47
- Gagne, F. and Blaise, C. (2000). Evaluation of Environmental Estrogens with a Fish Cell Line. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 494-500
- Gerhardt, A. and Clostermann, M. (1998). A New Biomonitor System Based on Magnetic Inductivity for Freshwater and Marine Environments. *Environ. Int.* 24, 699-701
- DIN 38415-3 (1996). German Standard Methods for the Examination of Water, Waste Water and Sludge - Sub-Animal Testing (Group T) - Part 3: Determination of the Genotype Potential of Water with the Umu Test (T 3)
- Gewässerschutzverordnung (1998) Code: 814.201.
- Gracia-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M. J., Barceló, D. and Piña, B. (2001). Monitoring of Endocrine Disruptors in Surface Waters by the Yeast Recombinant Assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152-1158
- Gülden, M., Morchel, S. and Seibert, H. (2001). Factors Influencing Nominal Effective Concentrations of Chemical Compounds in Vitro: Cell Concentration. *Toxicol. In Vitro* 15, 233-243.
- Gülden, M. and Seibert, H. (1997). Influence of Protein Binding and Lipophilicity on the Distribution of Chemical Compounds in in-Vitro Systems. *Toxicol. In Vitro* 11, 479-483
- Hawkins, W. E., Walker, W. W. and Overstreet, R. M. (1995). Carcinogenicity Tests Using Aquarium Fish. In Rand, G. M. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology - Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* (1125). Washington D.C., London: Taylor and Francis 1125

- Hendriks, A. J., Maas-Diepeveen, J. L., Noordsij, A. and Van der Gaag, M. A. (1994). Monitoring Response of Xad-Concentrated Water in the Rhine Delta: A Major Part of the Toxic Compounds Remains Unidentified. *Wat. Res.* 28, 581-598
- Hill, I. R., Matthiessen, P. and Heimbach, F. (1993). Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. *Workshop on sediment toxicity assessment*. Renesse, The Netherlands 105
- Houk, V. S. (1992). The Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents. *Mutation Research* 277, 91-138
- Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Volkl, A. and Braunbeck, T. (1999). Measurement of Vitellogenin-Mrna Expression in Primary Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes in a Non-Radioactive Dot Blot/Rnase Protection-Assay. *Sci. Total Environ.* 233, 109-122.
- Kier, L. D. (1987). Comments and Perspective on the Epa Workshop on "the Relationship between Short-Term Test Information and Carcinogenicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 147-157
- Koller, G., Hungerbühler, K. and Fent, K. (2000). Data Ranges in Aquatic Toxicity of Chemicals. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 7, 135-143
- Köllner, B. (2001). Immunfunktion der Forelle. 5. *EESL Statuskolloquium "Pharmaka in der Umwelt"*. Konstanz, Germany
- Largiadèr, C. R. (2001). Die Bedeutung der natürlichen genetischen Diversität von Fischarten und Ihre Gefährdung durch menschliche Einflüsse am Beispiel der Forelle (*Salmo trutta*). *fischnetz-info* 7, 7-8
- LAWA-Arbeitskreis (1999). Einsatzmöglichkeiten des Biomonitorings zur Überwachung von Langzeit-Wirkungen in Gewässern. Report Nr.:
- Link, M. (1990). Biotests in der Abwasseranalytik, neue Möglichkeiten oder Analytik für Anspruchslose. *Laborpraxis* 4, 99-101
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H. (1985). Evaluation of the New System (Umu-Test) for the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens. *Mutation Research* 147, 219-229
- OECD (2000). Eleventh Addendum to the OECD Guideline for the Testing of Chemicals.
- Parkerton, T. F., Stone, M. A. and Letinski, D. J. (2000). Assessing the Aquatic Toxicity of Complex Hydrocarbon Mixtures Using Solid Phase Microextraction. *Toxicol. Lett.* 112, 273-282
- Power, E. A. and Chapman, P. M. (1992). Assessing Sediment Quality. In Burton, G. A., Jr. (Eds.), *Sediment Toxicity Assessment* (440). Boca Raton, London: Lewis Publishers 440

- Rand, G. M., Wells, P. G. and McCarthy, L. S. (1995). Introduction to Aquatic Toxicology. In Rand, G. M. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology* Washington D.C.: Gaylor and Francis Publisher
- Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241-248
- Rutishauser, B., Pesonen, M., Ackermann, G. E., Zehnder, A. J. and Eggen, R. I. (2001). Assessment of Estrogenic Activity in Sewage Treatment Plant Effluents Using Various in Vitro Systems. Comparative Analysis and Inhibition Problems. *11th annual meeting of SETAC Europe: From basic science to decision-making: The environmental Odyssey*. Madrid, Spain, 161
- Schindler, D. W. (1987). Detecting Ecosystem Responses to Anthropogenic Stress. *Can. J. Aquat. Sci.* 44, 6-25
- Schreiber, U. (1994). New Emitter-Detector.Cuvette Assmby for Measuring Modulated Chlorophyll Fluorescence of Highly Diluted Suspensions in Conjunction with the Standard Pam Fluorometer. *Z. Naturforsch.* 49, 646-656
- Schulte, C. and Nagel, R. (1994). Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio Rerio*, as an Alternative to the Acute Fish Test: Preliminary Results. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 22, 12-19
- Schweigert, N., Acero, J. L., von Gunten, U., Canonica, S., Zehnder, A. J. and Eggen, R. I. (2000). DNA Degradation by the Mixture of Copper and Catechol Is Caused by DNA-Copper-Hydroperoxo Complexes, Probably DNA-Cu(II)OOH. *Environ. Mol. Mutagen.* 36, 5-12
- Schweigert, N., Belkin, S., Leong-Morgenthaler, P., Zehnder, A. J. and Eggen, R. I. (1999). Combinations of Chlorocatechols and Heavy Metals Cause DNA Degradation in Vitro but Must Not Result in Increased Mutation Rates in Vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 202-210
- Schweigert, N., Hunziker, R. W., Escher, B. I. and Eggen, R. I. (2001). Acute Toxicity of (Chloro-)Catechols and (Chloro-)Catechol-Copper Combinations in *Escherichia Coli* Corresponds to Their Membrane Toxicity in Vitro. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 239-247.
- Soldo, D. and Behra, R. (2000). Long-Term Effects of Copper on the Structure of Freshwater Periphyton Communities and Their Tolerance to Copper, Zinc, Nickel and Silver. *Aquat. Toxicol.* 47, 181-189
- Standardization ISO 11348-1:1998 (1998a). Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent Bacteria Test) - Part 1: Method Using Freshly Prepared Bacteria

- Standardization ISO 11348-2:1998 (1998b). Water Quality - Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent Bacteria Test) - Part 2: Method Using Liquid-Dried Bacteria
- Standardization ISO 11348-3:1998 (1998c). Water Quality - Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent Bacteria Test) - Part 3: Method Using Freeze-Dried Bacteria
- Steinberg, C., Klein, J. and Brüggemann, R. (Eds.) (1995). *Ökotoxikologische Testverfahren*. Landsberg/Lech: ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.
- Stemmer, B. L., Burton, G. A., Jr. and Sasson-Brickson, G. (1990). Effect of Sediment Spatioal Variance and Collecion Method on Cladoceran Toxicity and Indigenous Microbial Activity Determinations. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1035-1044
- Thomas, P. (2000). Nuclear and Membrane Steroid Receptors and Their Functions in Teleost Gonads. In Norberg, B. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish* (149-156). Bergen: University of Bergen Press 149-156
- Tonkes, M., Pols, H., Warmer, H. and Bakker, V. (1998). Whole Effluent Assessment. Report Nr.: 98.034
- van Delft, J. H. M., Baan, R. and Roza, L. (1998). Biological Effect Markers for Exposure to Carcinogenic Compound and Their Relevance for Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 477-510
- Verbruggen, E. M. J., Vaes, W. H. J., Parkerton, T. F. and Hermens, J. L. M. (2000). Polyacrylate Coated Spme Fibers as a Tool to Simulate Body Residues and Target Concentrations of Complex Organic Mixtures for Estimation of Baseline Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 34, 324-331
- Verbruggen, E. M. J., Van Loon, W. M. G. M., Tonkes, M., Van Duijn, P., Seinen, W. and Hermens, J. L. M. (1999). Biomimetic Extraction as a Tool to Identify Chemicals with High Bioconcentration Potential: An Illustration by Two Fragrances in Sewage Treatment Plant Effluents and Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 33, 801-806
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. (2000). Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71-133.
- Wagner, W., Gawel, J., Furumai, H., De Souza, M. P., Teixeira, D., Rios, L., Ohgaki, s., Zehnder, A. J. B. and Hemond, H. F. (in press). Sustainable Watershed Management: An Interational Multi-Watershed Case Study. *AMBIO* in press

Wright, J. F., Furse, M. T. and Armitage, P. D. (1993). Rivpacs - a Technique for Evaluating the Biological Quality of Rivers in the U.K. European Water Pollution Control 3, 15-25