

Stressorinduzierte ökotoxikologische Effekte
und Genexpressionsveränderungen bei
Chironomus riparius

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Gertraud Wirzinger
aus Johannesburg/Südafrika

Frankfurt am Main 2008
(D 30)

vom Fachbereich der Johann Wolfgang
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:
.....

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	5
2.1 Untersuchte abiotische Faktoren und chemische Substanzen	5
2.1.1 Salinität und Temperatur	5
2.1.2 Psychopharmaka	6
2.1.3 Pestizide	8
2.1.4 Synthetische Hormone	9
2.1.5 Insektizide	12
2.1.6 Schwermetalle	13
2.1.7 Industriechemikalien	15
2.2 Ökotoxikologische Untersuchung	17
2.2.1 Versuchsorganismus	17
2.2.2 Lebenszyklustest	19
2.2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse	22
2.2.4 Rückstandsanalytik	25
2.3 Molekularbiologische Untersuchung	25
2.3.1 Gewinnung und Isolierung der RNA	27
2.3.2 Herstellung der cDNA-Banken	28
2.3.3 Herstellung und Anwendung des ChiroChips	28
2.3.4 Auswertung der Daten	31
3 Ergebnisse	35
3.1 Ökotoxikologische Untersuchung	35
3.1.1 Salinität und Temperatur	35
3.1.2 Psychopharmaka	38
3.1.3 Pestizide	42
3.1.4 Synthetische Hormone	44
3.1.5 Insektizide	48
3.1.6 Schwermetalle	49
3.1.7 Industriechemikalien	53
3.1.8 Zusammenfassung	54

3.2	Molekularbiologische Untersuchung	63
3.2.1	Tributylzinn	63
3.2.2	Blei	63
3.2.3	Carbamazepin	68
3.2.4	Fluoxetin	72
3.2.5	17 α -Methyltestosteron	75
3.2.6	17 α -Ethinylöstradiol	75
3.2.7	Zusammenfassung	79
4	Diskussion	80
4.1	Ökotoxikologische Untersuchung	80
4.1.1	Salinität und Temperatur	80
4.1.2	Psychopharmaka	86
4.1.3	Pestizide	93
4.1.4	Synthetische Hormone	97
4.1.5	Insektizide	101
4.1.6	Schwermetalle	105
4.1.7	Industriechemikalien	111
4.1.8	Zusammenfassung	115
4.2	Molekularbiologische Untersuchung	117
4.2.1	Allgemeines	117
4.2.2	Tributylzinn	122
4.2.3	Blei	125
4.2.4	Carbamazepin	128
4.2.5	Fluoxetin	130
4.2.6	17 α -Methyltestosteron	132
4.2.7	17 α -Ethinylöstradiol	134
4.2.8	Zusammenfassung	136
4.3	Ökotoxikologie und Mikroarrays – Bewertung und Ausblick	137
5	Zusammenfassung	141
6	Literaturverzeichnis	143
	Danksagung	177
	Verzeichnis der Publikationen	178
	Lebenslauf	180
	Anhang	181

Abkürzungsverzeichnis

aa-dUTP	Aminoallyl-Desoxy-Uridintriphosphat
Abb.	Abbildung
ANOVA	Einfache Varianzanalyse (Analysis of Variances)
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
cAMP	3'-5'-cyclic adenosinemonophosphate (Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CAS-Nummer	Chemical Abstracts Service-Nummer
CBZ	Carbamazepin
Cd	Cadmium
cDNA	komplementäre DNA
CI	Confidence Interval
d	Tage
DBT	Dibutylzinn
DDD	defined daily dosis
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EC _x	Konzentration, bei der bei x-% der Tiere ein Effekt auftritt
EE ₂	Ethinylöstradiol
EmT ₅₀	medianer Schlupfzeitpunkt der Imagines
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase
ES	Endosulfan
EST	Expressed sequenced tags
EU	Europäische Union
FX	Fluoxetin
g	Gravitationskraft
GTC-Methode	Guanidin-Thio-Cyanat-Methode
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
JH	Juvenilhormon
JHMT	Juvenilhormonsäure-Methyltransferase
KI	Konfidenzintervall
L1	1. Larvenstadium
L4	4. Larvenstadium
LC ₁₀	Konzentration, die für 10% der Tiere tödlich ist
LC ₅₀	Konzentration, die für 50% der Tiere tödlich ist
LCT	Lebenszyklustest

LMK	Lösemittelkontrolle
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
Log Kow	logarithmierter Oktanol-Wasser-Partitionskoeffizient
LU	Luteolin
MBT	Monobutylzinn
MP	Methopren
MET	Methyltestosteron
mRNA	Messenger-RNA
NOEC	No Observed Effect Concentration
NP	4-Nonylphenol
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Cooperation and Development)
OP	4- <i>tert</i> -Octylphenol
OZV	Organozinnverbindungen
Pb	Blei
PCR	Polymerasekettenreaktion
PWR	Populationswachstumsrate
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
Sn	Zinn
SSC-Puffer	Standard-Saline-Citrat-Puffer
SSRI	Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor
Tab.	Tabelle
TBT	Tributylzinn
TBT-Cl	Tributylzinnchlorid
TDS	total dissolved solids (Gesamtheit der gelösten Feststoffe)
TG	Trockengewicht
TSS	total soluble salts (Gesamtheit der gelösten Salze)
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Lebenszyklus der Zuckmücke (nach BRODERSEN & ANDERSEN, 2000).	18
Abb. 2.2	Versuchsaufbau beim Lebenszyklustest. LMK = Lösemittelkontrolle.	21
Abb. 2.3	Vorgehensweise bei der Mikroarray-Herstellung.	26
Abb. 2.4	Spottingmuster des Mikroarrays.	29
Abb. 2.5	Hybridisierung der gegenüber Ethinylöstradiol exponierten <i>Chironomus</i> -Larven.	30
Abb. 2.6	Expression der Gene von <i>Chironomus riparius</i> .	33
Abb. 3.1	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und verschiedenen Salinitäten.	36
Abb. 3.2	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und verschiedene Temperaturen.	37
Abb. 3.3	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Carbamazepin.	39
Abb. 3.4	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Fluoxetin.	41
Abb. 3.5	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Tributylzinn.	43
Abb. 3.6	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Methyltestosteron.	45
Abb. 3.7	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Ethinylöstradiol.	47
Abb. 3.8	Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit <i>Chironomus riparius</i> und Blei.	52
Abb. 3.9	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber Psychopharmaka.	55
Abb. 3.10	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber Pestiziden.	57
Abb. 3.11	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber synthetischen Hormonen.	58
Abb. 3.12	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber Insektiziden.	59
Abb. 3.13	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber Schwermetallen.	61
Abb. 3.14	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von <i>Chironomus riparius</i> gegenüber Industriechemikalien.	62

Abb. 4.1	<i>Chironomus riparius</i> und Pestizidexposition. Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Endpunkten Gewicht der Weibchen und Eigelege pro Weibchen.	94
Abb. 4.2	<i>Chironomus riparius</i> und Schwermetallexposition. Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Endpunkten Gewicht der Weibchen und Eigelege pro Weibchen.	111
Abb. 4.3	Medianer Schlupfzeitpunkt EmT ₅₀ [d] von unbelasteten <i>Chironomus riparius</i> (Kontrolle und Lösemittelkontrolle) im Jahresverlauf.	116
Abb. 4.4	Zuordnung der differentiell exprimierten Gene von <i>Chironomus riparius</i> zu den regulierenden biochemischen Prozessen nach einer Exposition gegenüber Schadstoffen.	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Physikalische Eigenschaften von Carbamazepin und Fluoxetinhydrochlorid.	6
Tab. 2.2	Physikalische Eigenschaften von Endosulfan und Tributylzinnchlorid.	9
Tab. 2.3	Physikalische Eigenschaften von 17 α -Methyltestosteron und 17 α -Ethinylöstradiol.	11
Tab. 2.4	Physikalische Eigenschaften von Luteolin und Methopren.	13
Tab. 2.5	Physikalische Eigenschaften von Cadmiumsulfat und Bleinitrat.	14
Tab. 2.6	Physikalische Eigenschaften von 4-Nonylphenol und 4- <i>tert</i> -Octylphenol.	16
Tab. 2.7	Parameter für den Lebenszyklustest und den 14-d-Test.	19
Tab. 2.8	Nominalkonzentrationen der untersuchten Substanzen bzw. Ansätze der untersuchten abiotischen Faktoren.	20
Tab. 3.1	Gemessene Tributylzinnkonzentrationen in $\mu\text{g Sn/kg TG}$.	44
Tab. 3.2	Gemessene Cadmiumkonzentrationen in mg/kg TG .	50
Tab. 3.3	Gemessene Bleikonzentrationen in mg/kg TG .	51
Tab. 3.4	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Tributylzinn.	64
Tab. 3.5	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Blei.	66
Tab. 3.6	Unbekannte differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Carbamazepin.	68
Tab. 3.7	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Carbamazepin.	69

Tab. 3.8	Unbekannte differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Fluoxetin.	72
Tab. 3.9	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber Fluoxetin.	73
Tab. 3.10	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber 17 α -Methyltestosteron.	76
Tab. 3.11	Differentiell exprimierte Gene von <i>Chironomus riparius</i> bei Exposition gegenüber 17 α -Ethinylöstradiol.	77
Tab. 3.12	Differentiell exprimierte Klone und Gene von <i>Chironomus riparius</i> nach einer Exposition gegenüber verschiedenen Schadstoffen.	79
Tab. 4.1	Effektkonzentrationen für Salinität, angegeben in Promille [‰]	83
Tab. 4.2	Effektkonzentrationen für Carbamazepin, angegeben in mg/kg	89
Tab. 4.3	Effektkonzentrationen für Fluoxetin, angegeben in mg/kg	91
Tab. 4.4	Effektkonzentrationen für Tributylzinn, angegeben in μ g Sn/kg	97
Tab. 4.5	Proteine von <i>Chironomus riparius</i> , die aufgrund einer Exposition bei mehreren Substanzen differentiell reguliert sind.	120

Abstract

The effects of abiotic stressors and substances of different pollutant classes on life cycle parameters and gene expression of *Chironomus riparius* were investigated. The goal was to develop a screening method based on a DNA microarray („ChiroChip“). The ChiroChip is the first known microarray with cDNA of chironomids.

The most sensitive life cycle parameters for all substances with significant differences to the controls were mortality, the percentage of fertile egg masses, the mean female emergence time as well as the dry weight of the males. Temperature changes of $\pm 6^\circ\text{C}$ compared to a normal temperature of 20°C lead to highly significant effects in all parameters. A LC_{10} was only calculable for salinity (0.66‰, CI: 0.26 – 1.68‰). Due to non-linear concentration-response-curves an EC_{50} was only calculable for the mean emergence time of female midges exposed to cadmium (0.53 mg/kg, CI: 0.29 – 0.97 mg/kg). Although the tested substances had no immediate toxic effects, effects on development and reproduction of the population cannot be excluded.

In the experiments with methyltestosterone, ethinylestradiol, carbamazepine, fluoxetine, lead and tributyltin (which also included molecular endpoints), the most sensitive life cycle parameters were mortality, the percentage of fertile egg masses, the mean female emergence time as well as the population growth rate. Carbamazepine (CBZ) retarded the emergence of the females. 10 mg CBZ/kg lead to a higher mortality, less egg masses, which were more frequently unfertile and caused a reduced population growth rate. Fluoxetine (FX) retarded the emergence of both sexes. 0.9 mg FX/kg lead to a higher mortality, less egg masses with a higher portion being unfertile and caused a reduced population growth rate. The females were smaller in the highest concentration (5.9 mg/kg).

The effects of tributyltin (expressed as $\mu\text{g Sn/kg}$) were a higher mortality and a reduced population growth rate at $100 \mu\text{g Sn/kg}$ as well as a retarded female emergence. At $160 \mu\text{g Sn/kg}$ there were less egg masses, which were more frequently unfertile. Males exposed to 120 und $160 \mu\text{g Sn/kg}$ were smaller than the controls. Exposure to lead (Pb) caused a higher mortality and more unfertile egg masses at 6.5 mg/kg . Males were smaller after exposure to 0.65 mg Pb/kg and larger at 6.5 mg Pb/kg . The number of fertile egg masses per female was reduced after exposure to 3.25 and 6.5 mg Pb/kg .

Midges exposed to methyltestosterone (MET) had higher survival rates and showed an earlier emergence of both sexes. Concentrations of 27 µg MET/kg and higher lead to fewer unfertile egg masses, smaller males and to higher population growth rates. An earlier emergence of both sexes as well as higher population growth rates were also found after exposure to ethinylestradiol (EE₂). At a concentration of 9 µg EE₂/kg the number of unfertile egg masses was reduced.

Exposure of chironomid larvae to methyltestosterone, ethinylestradiol, carbamazepine, fluoxetine, lead and tributyltin lead to the differential regulation of nine (methyltestosterone) to 49 (carbamazepine) genes. During investigation of the expressed proteins it was remarkable that known stress proteins (glutathione-S-transferase or cytochrome P450) were seldom differentially regulated. Various processes were affected by a changed gene expression. An exposure to methyltestosterone lead to the impairment of only three identified biological processes while the other substances interfered with seven to eight processes. Protein and energy metabolism were the main influenced processes. Oxygen transport was impaired by all substances tested, but with different percentages compared to all influenced processes. Oxygen transport was the main process influenced by methyltestosterone (84.6%) and barely influenced after exposure to fluoxetine (10.5%). Because the gene expression of globins was affected by substances specifically, this endpoint may be implemented as biomarker for the monitoring of surface waters. Tubulin and actin were often differentially regulated after exposure to stressors – tributyltin and carbamazepine in this study, antidepressants and estrogens in others. Hence, they may also be suited as biomarkers for chemical stress.

Investigations on the concentration-dependent gene expressions as well as the differential regulation of genes in untreated larvae and other life cycle stages have to be conducted before the implementation of the ChiroChip as screening instrument for chemical research and biomonitoring. Furthermore, the existing data must be verified by quantitative real time PCR and the research of the function of the expressed genes must be intensified.

1 Einleitung

Die klassische Ökotoxikologie beschäftigt sich hauptsächlich mit den Auswirkungen von Substanzen auf das Überleben, die Entwicklung und Reproduktion von Organismen. Viele standardisierte ökotoxikologische Methoden vertrauen auf die Messung der Effekte im ganzen Organismus, um Endpunkte (z.B. LC_{50}/EC_{50} , NOEC- oder LOEC-Werte), die auf diesen Effekten beruhen, ableiten zu können. Hierzu werden typischerweise Indikator- oder Stellvertreterarten verwendet. Diese Methoden sind sinnvoll, um Chemikalien mit potentiellen Risiken zu identifizieren, geben aber kaum Hinweise auf den Wirkmechanismus der Chemikalien. Dieses Verständnis ist jedoch notwendig, um die aktuellen Fragestellungen der Ökotoxikologie beantworten zu können, wie zum Beispiel die Vorhersage der Schadstoffeffekte in den phylogenetischen Gruppen in Ökosystemen, Extrapolation von Effekten von einer biologischen Organisationsstufe auf andere Ebenen, und die Vorhersage des Einflusses der zeitlichen Variation der Schadstoffeinflüsse.

Seit dem 1. Juni 2007 ist die europäische REACH-Verordnung (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) in Kraft. Die Verordnung schafft ein einheitliches System für sämtliche Chemikalien. Die Hersteller und Importeure sind verpflichtet, sowohl umfassende Daten über die Eigenschaften der Stoffe zu erheben, die sie in Mengen von mind. 1 t/a herstellen oder einführen, als auch der einzurichtenden Europäischen Agentur für chemische Stoffe in einem Registrierungsdossier anhand der Stoffinformationen nachzuweisen, dass ihre Verwendung sicher ist.

Es wird geschätzt, dass für die Implementierung von REACH zusätzlich etwa 17 Mio. Tiere nur für Reproduktionstoxizitätstests benötigt werden (HÖFER ET AL., 2004). Aufgrund der benötigten Informationen werden hohe Kosten für die Toxizitätsstudien auf Hersteller und Importeure zukommen. Die (öko-)toxikologische Untersuchung jeder Substanz kostet 2-4 Mio. Dollar und dauert einige Jahre (NEUMANN & GALVEZ, 2002). Dadurch, und auch aufgrund der Ausweitung der ökotoxikologischen Substanztestung und der zukünftigen Anwendung von Biotests für das Monitoring aquatischer Ökosysteme, werden dringend günstige und weniger zeitintensive Screening-Verfahren benötigt, um das anfallende Probenaufkommen bewältigen zu können. Zur Zeit werden etwa 70 000 chemische Substanzen kommerziell angewendet (NEUMANN & GALVEZ, 2002). Das Europäische Chemikalienbüro schätzte, dass für 86% der Chemikalien, die in Mengen von über 1 000 t/a produziert oder eingeführt werden, kein Basisdatensatz an Substanzinformation zur Verfügung steht (ALLANOU ET AL., 1999).

In den letzten Jahren hat sich das Augenmerk der Ökotoxikologie verstärkt auf die Einbindung molekularbiologischer Methoden gerichtet (HOYT ET AL., 2003, ROBERTS ET AL., 2005, MOENS ET AL., 2006, LEE ET AL., 2006a, IGUCHI ET AL., 2007). Chemikalien und andere Umweltstressoren können bei etablierten Biomarkern (z.B. Metallothioneine, Hitzeschockproteine, Cytochrom P450) Genexpressionsveränderungen hervorrufen (GOVINDA ET AL., 2000). Mit den neuen molekularbiologischen Methoden möchte man untersuchen, ob auf dieser Ebene frühzeitige Effekte im Organismus nachgewiesen werden können, ehe sie als phänotypische Veränderungen sichtbar werden. Eine Studie von GÜNDEL ET AL. (2007) gibt erste Antworten auf diese Fragestellung. Eine 2%-ige Ethanollösung (EC_{100}) verursachte bei Zebrafisch-Embryonen deutliche phänotypische Effekte, wohingegen bei einer 0,5%-igen Ethanollösung (EC_{10}) alle Embryonen intakt waren (GÜNDEL ET AL., 2007). Unter den differentiell exprimierten Proteinen der gegenüber der 2%-igen Lösung exponierten Embryonen waren aber 80% der Proteine betroffen, die schon bei der 0,5%-igen Lösung eine veränderte Genexpression zeigten.

Bei REACH spielt der Ersatz von experimentellen ökotoxikologischen Tests eine große Rolle. Durch intelligentes Testdesign und alternative Methoden können die Zahl der Tierversuche und die Kosten für Chemikalientests reduziert werden. Das Einsparpotential über einen Zeitraum von 11 Jahren wird auf 0,8 – 1,1 Mrd. Euro und 1,3 – 1,9 Mio. Tiere geschätzt (VAN DER JAGT ET AL., 2004). Mikroarrays sind eine vielversprechende Technik, da sie über die schnelle Erfassung genomischer Chemikalieneffekte einen zielgerichteteren und damit kostengünstigeren Einsatz nachgeschalteter, aufwendigerer organischer Biotests ermöglichen.

Mikroarrays werden seit Mitte der 90er-Jahre in der Medizin eingesetzt, und ihre Anwendung in der Ökotoxikologie nimmt verstärkt zu. Obwohl die Technik erst 1995 beschrieben wurde, ist der heutige Einfluss der Mikroarrays in der Medizin und Biologie sehr groß (SCHEINA ET AL., 1995). In den letzten Jahren stieg die Zahl der Publikationen in PubMed (www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed) mit direktem oder indirektem Bezug zu Mikroarrays von 293 im Jahr 2000 auf 4 099 im Jahr 2005 mit einer kumulierten Zahl von 12 679 Artikeln (JU ET AL., 2007).

Die Verwendung der Mikroarrays für die Untersuchung von Umweltschadstoffen begann Anfang dieses Jahrhunderts (ANKLEY ET AL., 2006). Schon 1999 gab es Stimmen, die eine Anwendung der Mikroarrays für die Vorhersage der Chemikalien- und Umwelttoxizität propagierten (AFSHARI ET AL., 1999, NUWAYSIR ET AL., 1999). Mikroarrays und verwandte Technologien ermöglichen die Untersuchung der Variation der Genexpression in belasteten und un-

belasteten Organismen. Ein Vorteil der Mikroarrays ist die abgebildete enorme Datenmenge durch die gleichzeitige Untersuchung tausender Gene. Dies ermöglicht die Identifizierung von Genen, die nach einer Exposition deutlich über- oder unterexprimiert sind, bei einer kurzen Zeitspanne bis zum Erhalt der Informationen. Weitere Vorteile der genomischen Testsysteme sind (1) die Möglichkeit, eine Beeinflussung einer Gengruppe festzustellen, (2) die Aufdeckung der Prozesse und Systeme, in denen diese Gene eine Rolle spielen, (3) die Ermöglichung des Vergleichs der Variation der Gene und ihrer Bedeutung für die biologischen Systeme zwischen verschiedenen Populationen, (4) der Vergleich der Protein- und Metabolitenhäufigkeit mit der Genexpression der Transkripte, um die experimentellen Befunde auszuweiten und zu verifizieren und (5) die Untersuchung der Korrelation der Genexpression mit anderen Stressoren (Temperatur, Salinität) (THOMAS & KLAPER, 2004). Weiterhin können damit neue Hypothesen überprüft werden.

Durch Chemikalien induzierte Genexpressionsveränderungen haben das Potential, in der Evaluierung und Risikobewertung angewendet zu werden. Die Genexpression wird als direkte oder als indirekte Reaktion auf eine Schadstoffexposition verändert. Dabei gibt es zwei Ebenen der Veränderungen: Auf mRNA-Ebene zeigen sie, dass Gene aktiviert oder deaktiviert werden und auf Proteinebene indizieren sie eine funktionelle Reaktion im Organismus.

Im humanen Kontext wird der Begriff Toxikogenomik für die Untersuchung der Genexpression infolge einer Schadstoffexposition und die Untersuchung der darauf beruhenden toxischen Prozesse verwendet. Auf dem Gebiet der ökologischen Risikobewertung hat sich mittlerweile der Begriff Ökotoxikogenomik eingebürgert. Die Ökotoxikogenomik ist die Integration der genombasierten Wissenschaft in die Ökotoxikologie und wird definiert als die Untersuchung der Gen- und Proteinexpression in Nicht-Zielorganismen, die für die Untersuchung der Effekte einer Schadstoffexposition wichtig sind (SNAPE ET AL., 2004). Das Prinzip der Ökotoxikogenomik beruht darauf, dass Schadstoffe genomische Reaktionen im Organismus hervorrufen. Sie ist ein relativ junges Feld mit dem Hauptaugenmerk auf genomische Techniken [PCR, cDNA-Subtraktion, Mikroarrays, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)], um die molekularen und zellulären Effekte der Chemikalien durch Veränderungen der Genexpression nicht nur in aquatischen Organismen zu verstehen.

Chironomiden werden aufgrund ihrer benthischen Lebensweise in aquatischen Toxizitätsstudien herangezogen, da viele Schadstoffe im Sediment akkumulieren. Sie kommen weltweit vor und gehören zu den häufigsten Insekten in limnischen Ökosystemen. Sie haben eine wichtige Position in der Nahrungskette, können sowohl über das Sediment als auch

über die Wasserphase exponiert werden und kommen aufgrund ihrer hohen Schadstofftoleranz auch an belasteten Standorten in ausreichender Häufigkeit vor. Dabei dienen unter anderem die Überlebensrate, Veränderungen der Entwicklungsparameter und Deformitäten der larvalen Mundwerkzeuge als Indikatoren für anthropogenen Stress. Die großen Polytänchromosomen der Speicheldrüsen erlauben die Untersuchung gentoxischer Effekte bereits mit mikroskopischen Techniken. Diese Studien geben aber keine Auskunft über die Schadstoffeffekte auf molekularer Ebene.

Chironomidenlarven sind möglicherweise ideale Kandidaten für die Untersuchung der durch Umweltstressoren verursachten molekulargenetischen Veränderungen. Es gibt jedoch kaum molekularbiologische Studien mit Chironomiden, vermutlich aufgrund der fehlenden Sequenzinformationen für stressorempfindliche Gene und wegen der eingeschränkten Kenntnis über die Gensequenzen, die als Biomarker herangezogen werden können. Wichtige wirbellose Modellorganismen der Ökotoxikologie, wie z.B. *Chironomus riparius*, *Daphnia magna* und *Mytilus edulis*, wurden bislang nicht sequenziert, und für viele Arten gibt es weniger als eine verfügbare Sequenz (SNAPE ET AL., 2004). Seit dem Jahr 2000 gibt es 208 molekularbiologische Studien mit Chironomiden, die jedoch andere Methoden als die Mikroarray-Technologie anwandten. Mikroarrays gibt es bislang nur für wenige aquatische Organismen (LETTIERI, 2006, DENSLOW ET AL., 2007, JU ET AL., 2007). 2002 wurde der erste Array mit aquatischen Wirbeltieren entwickelt (JU ET AL., 2007). Käuflich erwerbbar Mikroarrays gibt es für Bakterien/Hefen (14 Arrays), *Anopheles gambia* (1), *Caenorhabditis elegans* (1), *Drosophila melanogaster* (1), Fische (4), *Xenopus laevis* (1), *Bos taurus* (1), *Canis familiaris* (1), Maus/Ratte (8), Mensch (5) und Pflanzen (7) (LETTIERI, 2006).

Diese Dissertation wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojektes ChiroChip der Abteilungen Aquatische Ökotoxikologie und Ökologie und Evolution der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main) und der Firma GENTERprise Genomics (Mainz) erstellt. Einige der Ergebnisse (speziell des molekularbiologischen Teils) sind in der Dissertation von Oliver Bitz, Doktorand bei GENTERprise Genomics, detaillierter beschrieben.

Das Projekt ChiroChip hat das Ziel der Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screeningverfahrens zur Vorhersage von ökotoxikologischen Effekten neuartiger chemischer Substanzen und für den Einsatz zum Monitoring aquatischer Ökosysteme. Mithilfe von zu entwickelnden cDNA-Mikroarrays und quantitativen PCR-Assays soll die differenzielle Genaktivität nach Exposition mit Schadstoffen bestimmt werden. Als Testorganismus dient dabei die Zuckmücke *Chironomus riparius*, die in der aquatischen Ökotoxikologie und zum Biomonitoring in Oberflächengewässern bereits weltweit verwendet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte abiotische Faktoren und chemische Substanzen

2.1.1 Salinität und Temperatur

Salinität

Die Salinität ist eine indikative Messung des Gesamtgehaltes der gelösten Kationen und Anionen im Wasser. Sie kann auch als TSS (total soluble salts) oder als TDS (total dissolved solids) angegeben werden. Die Leitfähigkeit ist ein guter Ersatz für TDS und TSS (außer bei sehr hohen Salinitäten) und misst die Fähigkeit einer Lösung, einen elektrischen Strom zwischen zwei Punkten zu leiten. Die zunehmende Versalzung (Akkumulation von gelösten anorganischen Salzen) der limnischen Ökosysteme ist seit den 80er-Jahren von immer größerer Umweltrelevanz (WILLIAMS, 1987). Es gibt zunehmend Studien über akuttoxische Effekte von erhöhten Salinitäten, aber kaum Information über chronische und/oder subletale Effekte (HASSELL ET AL., 2006). Es gibt einige Hinweise darauf, dass *Chironomus riparius* bei höheren Salinitäten vorkommt, dies sind aber meist Einzelnennungen (BERVOETS ET AL., 1996b).

Temperatur

Temperaturinduzierte Effekte manifestieren sich auf jeder biologischen Organisationsebene, von molekularen Bewegungen bis Verhaltensänderungen. Temperaturveränderungen beeinflussen die Durchlässigkeit der Membranen, Proteinaktivitäten und die Stabilität der DNA (HOCHACHKA & SOMERO, 2002). Aufgrund der Konsequenzen der temperaturinduzierten Effekte für die zelluläre Funktion haben sich die Organismen dahingehend angepasst, dass sie klare Temperaturoptima und Grenzen für die physiologischen Funktionen entwickelt und auch die Fähigkeit etabliert haben, ihren Phänotyp in Reaktion auf die Temperaturveränderungen während des Lebenszyklusses zu modifizieren.

Mit der aktuellen Diskussion um Klimaveränderungen und globale Erwärmung ist auch das Interesse an geeigneten Indikatoren für Temperatur- und Klimaveränderungen gestiegen. Verschiedene Klimamodelle sagen Temperaturerhöhungen von 1 – 7°C voraus (FICKE ET AL., 2007, NOUGUIER ET AL., 2007, FEUCHTMAYR ET AL., 2007). Infolgedessen erhöht sich auch die Wassertemperatur mit Auswirkungen auf die Zusammensetzung und Verbreitung des Makrozoobenthos sowie auf die Physiologie der Organismen (ROOT ET AL., 2003). Einer niederländischen Studie zufolge reagieren Chironomiden auf veränderte Temperaturen mit reduzier-

ten Artenzahlen bzw. einem Verschwinden aus den Gewässern (HOGG & WILLIAMS, 1996, VAN DEN HOEK & VERDONSCHOT, 2001).

2.1.2 Psychopharmaka

Carbamazepin

Carbamazepin (CBZ) wurde 1957 erstmals synthetisiert (SCHINDLER & BLATTNER, 1961). Es ist ein weißes bis schwach gelbliches, kristallines Pulver, das in drei wasserfreien polymorphen Modifikationen und als Dihydrat vorkommen kann. Bei Raumtemperatur und in reiner wässriger Lösung bleibt CBZ relativ stabil. CBZ wurde als Reinsubstanz von Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von CBZ sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Physikalische Eigenschaften von Carbamazepin und Fluoxetinhydrochlorid

Parameter	Carbamazepin	Fluoxetinhydrochlorid
CAS-Nummer	298-46-4	59333-67-4
Summenformel	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NOHCl
Molekulargewicht [g/mol]	236,28	345,79
Wasserlöslichkeit [mg/L]	17,7 (25 °C)	14 000
Schmelzpunkt [°C]	190,2	158,4 – 158,9
Henry-Konstante	1,08*10 ⁻¹⁰	-
Log Kow	2,45	1,8

Angaben nach MERSMANN (2003), SRC (2007) und Vetpharm (2007)

CBZ gehört zu der Klasse der Harnstoffderivate und wird hauptsächlich als Antiepileptikum sowie bei manischen Depressionen, akutem Alkoholentzug, Neuralgien und sogenannten Phantomschmerzen angewendet und bewirkt eine Steigerung des Serotoningehaltes im Gehirn, was bei der Behandlung der Depressionen wichtig ist (SCHMUTZ, 1985). Die Wirkung von CBZ beruht nach AMBRÓSIO ET AL. (2002) auf mehreren rezeptorvermittelten Effekten (z.B. Blockierung der Wirkung einiger Neurotransmitter, als Antagonist des Adenosinrezeptors oder Affinität zu Amintransportern).

Genauere Statistiken zu Produktions- und Verbrauchsmengen sind oft aufgrund von Datenschutz- und industriellen Wettbewerbsbedingungen nicht verfügbar (JEMBA, 2006). Die Menge der Wirksubstanz beträgt 0,8 – 1,2 g/d (MUTSCHLER, 1991). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat die definierte Tagesdosis (defined daily dose, DDD) auf 1 g festgelegt (WHO, 2005). Im Jahr 2005 wurden 63,5 Mio. Tagesdosen CBZ in Deutschland verschrieben, was etwa 51,9% der verordneten Tagesdosierung aller Antiepileptika entspricht (SCHWABE &

PAFFRATH, 2006). Der Verbrauch in anderen Ländern liegt zwischen 4,6 und 162 t/a (NAKADA ET AL., 2006, VIENO ET AL., 2007, KIM ET AL., 2007a). CBZ ist zu 70 – 80% bioverfügbar, der Rest wird unverändert ausgeschieden (HARTKE & MUTSCHLER, 1993, ASP, 1999). Die Bedeutung der ebenfalls vorkommenden Metabolite für den Eintrag von CBZ in Gewässer ist noch ungeklärt (ZÜHLKE, 2004). Durch die Spaltung von Glucuroniden während der Abbauprozesse in Kläranlagen kann wieder CBZ entstehen (MÖHLE ET AL., 1999, WEGENER ET AL., 1999, TERNES, 2000a). CBZ kann in Kläranlagen kaum abgebaut werden und gelangt so in die Umwelt. In Vorflutern wurden zwischen 1,2 – 6,3 µg/L gemessen und im Trinkwasser liegen die Messwerte bei 10 – 30 ng/L (SACHER ET AL., 1998, TERNES, 2000b, SACHER, 2002).

Fluoxetin

Fluoxetin wurde 1978 synthetisiert und 1988 in den USA auf den Markt gebracht. Es ist ein weißes bis weißgelbes, kristallines Pulver und wurde von Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Fluoxetin (als Fluoxetinhydrochlorid) sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Fluoxetin zählt zur Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (selective serotonin re-uptake inhibitors, SSRI) und ist effektiv bei der Behandlung von Depressionen, Persönlichkeitsstörungen und prämenstruellen Beschwerden (WONG ET AL., 1995). Durch die verbesserte medizinische Diagnostik von Depressionen und die Verfügbarkeit preiswerter Generika werden immer mehr Antidepressiva verordnet (SCHWABE & PAFFRATH, 2004).

Die definierte Tagesdosis der WHO entspricht 20 mg (WHO, 2005). Die Menge verordneter fluoxetinhaltiger Arzneimittel betrug in Deutschland (2004 – 2005) 35,8 Mio. DDD bzw. 716 kg (SCHWABE & PAFFRATH, 2006). Im Jahr 2002 wurden in den USA 1,2 Billionen Tabletten verkauft (FDA, 2003). Viele US-Amerikaner führten aufgrund der Wirkung von Fluoxetin eine vermehrte Selbstmedikation durch (OLFSON ET AL., 1998). Da eine Behandlung mit Fluoxetin viele Nebenwirkungen hat (gastrointestinale Störungen, erregende Symptome sowie Sexualfunktionsstörungen), werden mittlerweile vermehrt andere SSRI wie zum Beispiel Citalopram verschrieben (SCHWABE & PAFFRATH, 2004).

Fluoxetin ist nach 6 – 8 h vollständig über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und wird zu ca. 20% als Norfluoxetin bzw. Norfluoxetinglycuronid ausgeschieden (BRUCHHAUSEN ET AL., 1993). Somit gelangen große Teile des ausgeschiedenen Fluoxetins direkt oder in einer in Kläranlagen wieder aktivierbaren Form in die Umwelt. Fluoxetin ist, von sauren Bedingungen abgesehen, relativ stabil und wird auch durch direkte Photolyse nicht verstärkt abgebaut (Halbwertszeiten 102 – 385 d) (KWON & ARMBRUST, 2006). Huminstoffe tragen

wesentlich zur Photodegradation bei, so dass die Halbwertszeit nur noch 21 d beträgt (KWON & ARMBRUST, 2006).

2.1.3 Pestizide

Endosulfan

Endosulfan wird seit der Markteinführung Mitte 1950 weltweit als Insektizid in der Landwirtschaft eingesetzt. Es ist für fast alle Organismen toxisch, und obwohl Endosulfan schnell metabolisiert wird, hat der Metabolit Endosulfansulfat eine ähnliche Akuttoxizität wie die Ausgangssubstanz (UBA, 2004). Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Endosulfan sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Das technische Isomer ist ein brauner Feststoff, der aus einem Gemisch aus 80% α -Endosulfan und 20% β -Endosulfan besteht. In Deutschland wurde Endosulfan 1954 von den Farbwerken Höchst AG entwickelt und unter dem Namen Thiodan® auf dem Markt gebracht. In den 90er-Jahren lag die weltweite Produktion des technischen Endosulfans bei etwa 10 000 t/a, heute beträgt die Produktionsmenge in Europa etwa 5 000 t/a (NAQVI & VAISHNAVI, 1993, HERRMANN, 2003).

Die beiden Isomere von Endosulfan haben im Wasser eine Halbwertszeit von einigen Tagen, aber die Halbwertszeit des biologischen Metabolits Endosulfansulfat beträgt einige Wochen (LEONARD ET AL., 2001). Andere Quellen nennen Halbwertszeiten von 1 – 6 Monaten, je nach den Umweltbedingungen (NAQVI & VAISHNAVI, 1993, HERRMANN, 2003). Die Halbwertszeiten der Isomere und von Endosulfansulfat liegen bei Adsorption im Boden oder Sediment bei bis zu 2 Jahren (NAQVI & VAISHNAVI, 1993, LEONARD ET AL., 2001). Die Bioverfügbarkeit von Endosulfan ist abhängig von Sorptionsprozessen an Sedimentpartikeln und von der Verteilung des sedimentgebundenen Endosulfans in der Wassersäule (LEONARD ET AL., 2001). In der Umwelt ist Endosulfan relativ persistent, in den Organismen selber jedoch weniger (NAQVI & VAISHNAVI, 1993).

Tributylzinn

Tributylzinnchlorid (TBT-Cl) ist eine farblose bis gelbliche Flüssigkeit mit relativ geringem Dampfdruck, die einen schwach stechenden Geruch aufweist, brennbar ist, jedoch mit Luft keine explosiven Gemische bildet. Tributylzinn (TBT) hat eine geringe Wasserlöslichkeit und ist somit eine stark hydrophobe Substanz. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von TBT (als Tributylzinnchlorid) sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Seit der erstmaligen Verwendung in den 60er-Jahren stieg die Produktion von Organozinnverbindungen (OZV) stark

an. 1986 wurden weltweit etwa 63 000 t produziert (SATTELBERGER, 2002). Gegen Ende des letzten Jahrhunderts betrug die weltweite jährliche Produktion etwa 30 000 – 50 000 t (BUA, 2003).

Tab. 2.2: Physikalische Eigenschaften von Endosulfan und Tributylzinnchlorid

Parameter	Endosulfan	Tributylzinnchlorid
CAS-Nummer	115-29-7	56573-85-4
Summenformel	C ₉ H ₉ Cl ₆ O ₃ S	C ₁₂ H ₂₇ ClSn
Molekulargewicht [g/mol]	406,93	325,49
Wasserlöslichkeit [mg/L]	0,325 (22 °C)	0,75 (25 °C)
Schmelzpunkt [°C]	106	53
Henry-Konstante	6,5*10 ⁻⁵	7,5*10 ⁻³
Log Kow	3,83	3,21 – 3,85

Angaben nach SRC (2007), Merck Schuchardt OHG (2007)

Durch Auswaschung aus Antifouling-Anstrichen oder Holzschutzmitteln und über die Kläranlage gelangen OZV in die Umwelt. In Gewässern binden sie hauptsächlich an Schwebstoffe und Sediment und können deshalb nur in geringen Mengen in der Wassersäule nachgewiesen werden (KALBFUS ET AL., 1991, LÄNGE, 1996). Sehr hohe Konzentrationen finden sich in Hafengebieten (KALBFUS ET AL., 1991, ARAMBARRI ET AL., 2003, BHOSLE ET AL., 2004, BURTON ET AL., 2005). Untersuchungen von Schwebstoffen und Sedimenten in der Elbe ergaben relativ hohe TBT-Konzentrationen im Bereich von 1,1 – 6,6 mg/kg TG (KUBALLA ET AL., 1995, BUA, 2003). Die Gesamtemissionen in Gewässern beliefen sich in Großbritannien (2001) auf 0,35 kg (ENVIRONMENT AGENCY, 2004). Durch Photolyse und mikrobiellen Abbau wird TBT über die Metabolite Dibutyl- und Monobutylzinn zu elementarem Zinn abgebaut (BUA, 1988, WATANABE ET AL., 1992, NAVIO ET AL., 1993). Ein geringer Anteil wird hydrolytisch abgebaut (BUA, 2003). Die Halbwertszeiten von TBT im Wasser schwanken von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen (JACOBSON, 2000). Die Abbauraten im Sediment sind vom Sauerstoffgehalt, der Sedimentzusammensetzung und von der Temperatur abhängig. Bei Akkumulation im Sediment und unter anaeroben Bedingungen kann die Halbwertszeit mehrere Jahrzehnte betragen, wobei insbesondere Häfen und Flussmündungen über mehrere Jahre hinweg mit TBT belastet sein können (DE MORA ET AL., 1995, IMO, 2002).

2.1.4 Synthetische Hormone

17 α -Methyltestosteron

17 α -Methyltestosteron (MET) ist ein weißes, geruchloses, kristallines Pulver, welches in Alkohol, Methanol und Ether gut, in pflanzlichen Ölen schlecht und in Wasser praktisch

unlöslich ist. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. MET ist ein künstlich hergestelltes Steroidhormon, welches sich von natürlichem Testosteron nur durch die Alkylierung in der 17α -Position unterscheidet. MET wird von vielen Arzneimittelherstellern in verschiedenen Ländern oft zu extrem geringen Kosten produziert und ist aus diesem Grund auch ein beliebter Bestandteil vieler oral verabreichter Produkte (ANABOLICWEB, 2007). Testosteron ist für die Ausbildung der männlichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich und steuert die sexuelle Aktivität des Mannes (REYNOLDS, 1993). Die synthetische Substanz hat zusätzlich anabole Wirkungen (Steigerung der natürlichen Eiweißsynthese und somit verstärkter Aufbau von Körpermasse), was bei der Behandlung von Patienten mit extremen Gewichtsverlusten genutzt wird. Anabole Steroide werden aber auch im Leistungs- und Kraftsport als Dopingmittel eingesetzt (ROCHE, 1998). 2005 betrug die Verordnungsmenge an testosteronhaltigen Präparaten in Deutschland 7 Mio. Tagesdosen, eine Zunahme um 23,9% gegenüber 2004 (SCHWABE & PAFFRATH, 2006).

Es gibt keine Information über die weltweiten Produktionszahlen von Methyltestosteron, aber aufgrund der breiten pharmazeutischen Anwendung beim Menschen ist es wahrscheinlich, dass Methyltestosteron in Spuren in der Umwelt vorkommt. Testosteron wird bislang nicht als umweltrelevante Chemikalie angesehen, dennoch wird die vorhergesagte Verwendung und Akzeptanz als männliche Verhütungspille (als Kombination von Testosteron und Progesteron) wahrscheinlich zu einem Anstieg an Testosteron in der Umwelt führen (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001). Methyltestosteron wird im Körper langsamer metabolisiert als Testosteron, es gibt jedoch nur wenig Informationen über das Auftreten, den Verbleib und Transport der Steroidhormone in der Umwelt, ebenso wie über die pharmakokinetischen Eigenschaften von Methyltestosteron in Organismen (VICK & HAYTON, 2001, KOLODZIEJ ET AL., 2004). Die orale Bioverfügbarkeit aus der Nahrung liegt bei etwa 70%, und bei Fischen beträgt die mittlere Aufenthaltszeit im Körper je nach Dosis zwischen 22 und 90 h (VICK & HAYTON, 2001).

17 α -Ethinylöstradiol

17 α -Ethinylöstradiol (EE₂) ist ein weißes, geruchloses, kristallines Pulver, welches in Wasser unlöslich und in Alkohol und Pflanzenöl löslich ist. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. EE₂ ist ein synthetisches Östrogen und wird hauptsächlich als Verhütungsmittel eingesetzt. Zusätzlich wird die Substanz bei Osteoporose, krankhafter Akne, Östrogenmangelerscheinungen und bei der Behandlung von Brustkrebs nach der Menopause verabreicht (REYNOLDS, 1993, MUTSCHLER & SCHÄFER-KORTING, 1997, HABERMEHL ET AL., 2002). Im Jahr 2001 wurden in Deutschland etwa 50 kg EE₂ verordnet, wo-

von sich nur Spuren in den Kläranlagenausläufen finden (TERNES ET AL., 1999, RÖNNEFAHRT ET AL., 2002). Von den 868 Mio. Tagesdosen Kontrazeptiva und Östrogene, die 2005 verordnet wurden, waren 375 Mio. Verordnungen ethinylöstradiolhaltige Präparate (SCHWABE & PAFFRATH, 2006). Natürliche Östrogene werden auf verschiedenen Wegen metabolisiert. Die metabolische Halbwertszeit von Ethinylöstradiol beim Menschen beträgt etwa 17 h und liegt bei Fischen bei 132 h (LAI ET AL., 2002, SKILLMAN ET AL., 2006). Bei Wirbellosen ist die Gesamtaktivität der metabolisierenden Enzyme (z.B. CYP450-Proteine) etwa 10x niedriger als bei Säugern, so dass die Umsetzungsraten von EE₂ auch geringer sein dürften (LAI ET AL., 2002).

Tab. 2.3: Physikalische Eigenschaften von 17 α -Methyltestosteron und 17 α -Ethinylöstradiol

Parameter	17 α -Methyltestosteron	17 α -Ethinylöstradiol
CAS-Nummer	58-18-4	57-63-6
Summenformel	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Molekulargewicht [g/mol]	302,46	296,41
Wasserlöslichkeit [mg/L]	33,9 (25 °C)	11,3 (27 °C)
Schmelzpunkt [°C]	163	183
Henry-Konstante	4,68*10 ⁻⁹	7,94*10 ⁻¹²
Log Kow	3,36 – 3,72	3,67 – 4,12

Angaben nach SRC (2007)

Über den Verbleib der Steroidöstrogene in Flüssen und Sedimenten ist nur wenig bekannt. EE₂ wird sowohl biotisch als auch abiotisch abgebaut, wobei der photolytische Abbau relativ langsam (126 h), im Sommer jedoch ein wichtiger Faktor für die Entfernung von EE₂ aus den Gewässern ist (JÜRGENS ET AL., 2002, KUSTER ET AL., 2004). Eine Laborstudie zeigte, dass EE₂ in Konzentrationen von 100 – 500 μ g/L mit einer Halbwertszeit von etwa 10 d leicht empfänglich für Phototransformation ist (LIN & REINHARD, 2005). In der aquatischen Umwelt wird Ethinylöstradiol direkt durch Lichtabsorption oder indirekt durch die Lichtabsorption von Photosensibilisierern (Nitrat, Nitrit, gelöstes organisches Material) abgebaut (LIN & REINHARD, 2005). Die Halbwertszeit in Flüssen beträgt dabei etwa 46 d (KUSTER ET AL., 2004). EE₂ wird kaum in Kläranlagen abgebaut (aerober Abbau 17 d) und kann in einigen Fällen durch die Umwandlung der Konjugate in die Ausgangssubstanz in den Ausläufen sogar ansteigen (JÜRGENS ET AL., 2002, PARROTT & BLUNT, 2005). Aufgrund der Bindung am Belebtschlamm beträgt die Entfernungsrates in den Kläranlagen etwa 85%, so dass die Klärschlammbehandlung eine effektive Methode zur Eliminierung von EE₂ aus dem Wasser ist (BARONTI ET AL., 2000). Obwohl Östrogene abbaubar sind und in der Umwelt in relativ niedrigen Konzentrationen vorkommen, zeigen Modellstudien, dass eine Bioakkumulation möglich ist (LAI ET AL., 2002). Die Bioakkumulationseigenschaften der Östrogene sind abhängig von der Umweltkonzentration, der Metabolismusrate und dem log K_{ow}. Im Modell hatte EE₂

höhere Bioakkumulationsfaktoren als die natürlichen Östrogenen (LAI ET AL., 2002). LEE und CHOI (2007) stellten jedoch fest, dass EE₂ im Wasser schnell abgebaut wird und vermuten deshalb, dass die Bioakkumulation nur kurzfristig ist. GORDON ET AL. (2006) fanden heraus, dass die Bioverfügbarkeit von EE₂ bei trüben Wasserbedingungen geringer ist. Sie stellten die Hypothese auf, dass bei höheren Nährstoffkonzentrationen mehr Schwebstoffe in der Wassersäule akkumulieren, womit ein erhöhtes Potential für die Partitionierung von EE₂ an den Feststoffen gegeben ist und die Substanz deshalb einen geringeren Einfluss auf die exponierten Organismen hat.

2.1.5 Insektizide

Methopren

Methopren wird weltweit als Insektizid (Regulierung des Insektenwachstums) eingesetzt (GARG & DONAHUE, 1989). Als Terpenoid hat Methopren eine höhere Potenz und eine bessere Stabilität im Freiland als natürliche Juvenilhormone (HENRICK ET AL., 1976). Technisches Methopren ist eine bernsteinfarbene bis schwach gelbe Flüssigkeit mit einem leicht fruchtigen Geruch (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999). Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Methopren sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Kommerzielle, auf Methopren basierende Produkte sind unter anderem unter den Namen ZR-515 und Altosid SR-10 auf dem Markt erhältlich. Methopren wird seit 1975 mit Ausbringungsraten zwischen 0,01 und 0,45 kg/ha verwendet (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999). Hauptanwendungsgebiete sind die Verringerung der Stechmückenpopulationen, als Nahrungszusatz bei Milchkühen zur Kontrolle der Fliegen und als Halsbänder und Sprays gegen Flöhe (SCHOFF & ANKLEY, 2004, GHEKIERE ET AL., 2006a).

Beim Eintrag im Gewässer adsorbiert Methopren am Sediment, kann sich aber aufgrund der weiteren physikalischen Eigenschaften auch aus dem Wasser oder feuchten Boden verflüchtigen (CSONDES, 2004). Durch Licht- und Sauerstoffeinwirkung, aber auch durch Bakterien, Insekten und Wirbeltiere wird Methopren im Wasser rasch metabolisiert und abgebaut (SCHAEFER & DUPRAS, 1973, SCHOOLEY ET AL., 1975, QUISTAD ET AL., 1975, ROSS ET AL., 1994). Die Methoprenkonzentrationen und die Komposition der Abbauprodukte im Freiland sind abhängig von den physikalisch-chemischen und biologischen Parametern des Gebietes (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999, SCHOFF & ANKLEY, 2004). Die Halbwertszeit von Methopren in Wasser und Boden beträgt je nach Applikationsform 1 – 150 d (HERSHEY ET AL., 1995, GLARE & O'CALLAGHAN, 1999, SCHOFF & ANKLEY, 2004). In Teichen und im Abwasser hat Methopren je nach Konzentration eine Halbwertszeit von 30 – 40 h bzw. 60 – 70 h (CSONDES, 2004).

Luteolin

Luteolin ist ein Phytohormon, dessen Konzentration beispielsweise in Sellerie 200 mg/kg Frischgewicht betragen kann, und das als Vertreter der Flavonoide in Samenpflanzen ubiquitär verbreitet ist (WATZL & RECHKEMMER, 2001). Phytoöstrogene wirken in den Pflanzen zur Abschreckung von Fraßfeinden oder als Lockstoff für Insekten und Bodenbakterien (FOX ET AL., 2004). Bei der Anlockung der Bodenbakterien spielt insbesondere Luteolin eine große Rolle (FOX ET AL., 2004). Zusätzlich zu den zahlreichen Funktionen der Flavonoide wird Luteolin aufgrund seiner häutungshemmenden Wirkung bei Insekten eine Schutzwirkung gegen Fraßfeinde nachgesagt (INGERSOLL ET AL., 1999). Phytoöstrogene werden deshalb synthetisch hergestellt und als Insektizide eingesetzt. Technisches Luteolin ist ein gelblichweißes Pulver. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Luteolin sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Es gibt keine Information über die weltweiten Produktionszahlen von Luteolin, aber aufgrund der Anwendung als Insektizid ist es wahrscheinlich, dass die Substanz in Spuren in der Umwelt vorkommt. Obwohl wenig über Aufnahme, Metabolismus und Bioverfügbarkeit der verschiedenen Flavonoide bekannt ist, werden sie nicht im Gewebe akkumuliert und schnell ausgeschieden. Viele zirkulieren auch als konjugierte Formen mit mittleren Plasmakonzentrationen von 0,1 – 1 µmol/L (WHITEHEAD & RICE, 2006).

Tab. 2.4: Physikalische Eigenschaften von Methopren und Luteolin

Parameter	Methopren	Luteolin
CAS-Nummer	40596-69-8	491-70-3
Summenformel	C ₁₉ H ₃₄ O ₃	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Molekulargewicht [g/mol]	310,48	286,2
Wasserlöslichkeit [mg/L]	1,4	387,5 (25 °C)
Schmelzpunkt [°C]	< 25	329,5
Henry-Konstante	6,89*10 ⁻⁶	5,33*10 ⁻²¹
Log Kow	5,5 – 6,34	2,36 – 2,53

Angaben nach SRC (2007)

2.1.6 Schwermetalle

Cadmium

Cadmium ist ein natürlicher Bestandteil der Lithosphäre und kommt weltweit in durchschnittlichen Mengen von 0,1 mg/kg vor (TAYLOR & MCLENNAN, 1985). Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Cadmium (als Cadmiumsulfat) sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Cadmium wird als Farbpigment in Lacken und Kunststoffen, als Korrosionsschutz und in Düngemitteln eingesetzt. Im Zuge der steigenden Nachfrage wurde Cadmium ab 1950 industriell in großem Umfang produziert. HAN ET AL. (2002b) berechneten eine weltweite ku-

multierte Cadmiumproduktion seit den Anfängen der Industrialisierung von etwa 1,1 Mio. Tonnen. Die Gesamtemissionen in Gewässern beliefen sich in Großbritannien (2001) auf etwa 1,07 t (ENVIRONMENT AGENCY, 2004). In belasteten Sedimenten werden 30 – 400 mg/kg (im Extremfall mehr als 800 mg/kg) mit Hintergrundwerten von 0,04 – 0,8 mg/kg gemessen (STOEPLER, 1991).

Tab. 2.5: Physikalische Eigenschaften von Cadmiumsulfat und Bleinitrat

Parameter	Cadmiumsulfat	Bleinitrat
CAS-Nummer	10124-36-4	10099-74-8
Summenformel	CdSO ₄	Pb(NO ₃) ₂
Molekulargewicht [g/mol]	208,41	331,21
Wasserlöslichkeit [mg/L]	2,07 *10 ⁴ (25 °C)	2072 (25 °C)
Schmelzpunkt [°C]	265,64	255
Henry-Konstante	1,149*10 ⁻²²	8,371*10 ⁻¹⁷
Log Kow	0,33	0,69

Angaben nach SRC (2007)

Für alle aquatischen Lebensformen ist Cadmium hochtoxisch (WATTS & PASCOE, 2000a). Cadmium wird in der Umwelt nicht abgebaut und liegt entweder als freies Ion oder als ein in anorganischen oder organischen Verbindungen gebundener Komplex vor. Die schwerlöslichen Komplexe lagern sich in Sedimenten ab. Einer der wichtigsten Umweltfaktoren, die die Bioverfügbarkeit von Cadmium beeinflussen, ist der pH des Wassers und/oder Sediments (BERVOETS & BLUST, 2000). Die Bioverfügbarkeit von Metallen u.a. für aquatische Organismen wird durch verschiedene physikalisch-chemische Parameter und biologische Aufnahmepfade beeinflusst und ist hauptsächlich von der Metallspezies im Wasser abhängig (HARRAHY & CLEMENTS, 1997, PIOL ET AL., 2006). Die Toxizität der freien Ionen, die am ehesten aufgenommen werden, ist in saurem Milieu am größten (BERVOETS ET AL., 1995, PIOL ET AL., 2006). Mit zunehmendem pH werden die freien Ionen in komplexe Verbindungen gebunden, die durch ihre Membranpermeabilität bioverfügbar sind, durch ihre Wasserunlöslichkeit aber gebunden werden und sedimentieren. Die Metallaufnahme durch *Chironomus riparius* nimmt ab pH-Werten von 9 ab (BERVOETS & BLUST, 2000). Die Anwesenheit von Huminsäuren reduziert die Bioakkumulation von Cadmium deutlich (PIOL ET AL., 2006). In aeroben Sedimenten sind die Metalle am organischen Kohlenstoff oder in der Tonfraktion adsorbiert, in anaeroben jedoch an Sulfide gebunden und somit nicht mehr bioverfügbar (VAN GRIETHUYSEN ET AL., 2004). Cadmium wird von *C. riparius* schnell akkumuliert und nach einem eingestellten Gleichgewicht mit Halbwertszeiten von zwei Tagen auch schnell wieder ausgeschieden (TIMMERMANS ET AL., 1992).

Blei

Blei hat eine weltweite Verbreitung in der Umwelt und kommt in Spuren in Gestein, Boden, Wasser, Luft sowie Pflanzen und Tieren vor. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Blei (als Bleinitrat) sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Metallisches Blei wird in großen Mengen verarbeitet, beispielsweise bei der Schwefelsäureherstellung, der Produktion von Akkumulatorplatten und als Bestandteil von Legierungen. SCHRÖDER und SCHMIDT (2003) nennen eine jährliche Produktionsmenge von 374 000 t Blei in Deutschland. Die Gesamtemissionen in Gewässern beliefen sich in Großbritannien (2001) auf 19,7 t (ENVIRONMENT AGENCY, 2004).

Blei wird in der Umwelt nicht abgebaut und liegt entweder als freies Ion oder als ein in anorganischen oder organischen Verbindungen gebundener Komplex vor. Hohe Bleikonzentrationen treten im Wasser bei niedrigen Hydrogencarbonat- und Carbonationenkonzentration auf (GROSELL ET AL., 2006). In Gewässern mit hohen Hydrogencarbonatkonzentrationen kommt es zum Ausfallen von Bleicarbonat, was dazu führt, dass nicht genügend Blei im Wasser vorliegt, um toxische Effekte beispielsweise bei Chironomiden hervorzurufen (GROSELL ET AL., 2006). Generell gibt es eine höhere Bioakkumulation von Metallen in künstlichen Sedimenten verglichen mit natürlichen Sedimenten (HARRAHY & CLEMENTS, 1997). Höhere Lehmenteile und Gehalte an organischem Kohlenstoff beeinflussen die Metalladsorption und führen zu höheren Gehalten im Sediment (OGENDI ET AL., 2007). Unter aeroben Bedingungen sind der organische Kohlenstoffgehalt, Eisen- und Manganoxide Kontrollelemente für die Bioverfügbarkeit der Metalle. Unter anaeroben Bedingungen spielt der organische Kohlenstoff auch als Bindungselement für Metalle eine Rolle. Die Toxizität und Bioverfügbarkeit der Metalle in Sedimenten sind primär abhängig von den gelösten Metallkonzentration im Porenwasser, aber auch von der Metallspezies, die wiederum vom pH und Redoxpotential abhängig ist (JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1998, OGENDI ET AL., 2007). HARRAHY und CLEMENTS (1997) untersuchten die Bioverfügbarkeit von Metallen bei Chironomiden. Der niedrige Bioakkumulationsfaktor für Blei deutet auf eine geringere Bioverfügbarkeit hin. Blei wird von *Chironomus riparius* leicht aufgenommen und selbst nach einer Exposition von 25 d gab es keine Anzeichen einer Stabilisierung der Akkumulation (TIMMERMANS ET AL., 1992). *C. riparius* zeigte eine relativ geringe Eliminierungskonstante mit einer berechneten biologischen Halbwertszeit für Blei von 12 Tagen.

2.1.7 Industriechemikalien

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von 4-Nonylphenol (NP) und 4-*tert*-Octylphenol (OP) sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Nonylphenolmischungen sind meistens viskose, hellgel-

be Flüssigkeiten. Sie zeigen eine temperatur- und pH-abhängige Löslichkeit mit einem Log K_{ow} zwischen 3,8 und 4,8 und sind in vielen organischen Lösungsmitteln löslich (VAZQUEZ-DUHALT ET AL., 2005). Von den rund 22 Isomeren sind ungefähr 85% para-substituiert und besitzen somit ein östrogenes Potential (QUEDNOW & PÜTTMANN, 2008). 4-*tert*-Octylphenol ist sehr toxisch für aquatische Organismen, wird in der Umwelt nicht leicht abgebaut und wirkt als endokriner Disruptor (OSPAR, 2003). Ein Log K_{ow} von 3,96 – 4,21 und eine geringe Wasserlöslichkeit von 12,6 mg/L führen dazu, dass OP an Sedimenten adsorbiert und in Organismen akkumuliert (AHEL & GIGER, 1993).

Tab. 2.6: Physikalische Eigenschaften von 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol

Parameter	4-Nonylphenol	4- <i>tert</i> -Octylphenol
CAS-Nummer	104-40-5	140-66-9
Summenformel	$C_{15}H_{24}O$	$C_{14}H_{22}O$
Molekulargewicht [g/mol]	220,36	206,33
Wasserlöslichkeit [mg/L]	7 (25 °C)	5 (25 °C)
Schmelzpunkt [°C]	42	84,5
Henry-Konstante	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$6,89 \cdot 10^{-6}$
Log K_{ow}	5,76	3,96 – 4,21

Angaben nach SRC (2007)

NP und OP gehören zu den Alkylphenolen mit den höchsten Produktionsmengen. Nonylphenolethoxylate machen etwa 80%, Octylphenolethoxylate etwa 20% des Weltmarktanteils aus (WHITE ET AL., 1994). Als technisches Produkt wird NP als Zwischenprodukt in der chemischen und verarbeitenden Industrie zur Herstellung von Tensiden, Emulgatoren, Kunstharzen und Weichmachern verwendet. 1987 wurden etwa 56 000 t in Westeuropa verbraucht, 14 000 t wurden exportiert (BUA, 1991). 70 – 80% der Produktionsmenge in Deutschland (35 000 t/a) wurden zu Nonylphenolethoxylaten umgesetzt (ZELLNER & KALBFUS, 1997). OP entsteht als Nebenprodukt bei der Herstellung nicht-ionischer Tenside. Die geschätzte jährliche Produktionsmenge in der Europäischen Union (EU) betrug 2001 etwa 23 000 t/a (OSPAR, 2003). Im Jahr 2000 wurden in Deutschland etwa 37 000 t/a Nonylphenolethoxylate und 2 000 t/a Octylphenolethoxylate produziert (QUEDNOW & PÜTTMANN, 2008). Die Gesamtemissionen von NP und OP in Gewässern beliefen sich in Großbritannien (2001) auf 1,04 bzw. 0,31 t (ENVIRONMENT AGENCY, 2004). In der EU sind Alkylphenolethoxylate nicht mehr als Haushaltstenside zugelassen und mit Ausnahme der Verwendung als Detergenz für schlecht wasserlösliche Agrarpestizide ist der Einsatz von NP nach der Richtlinie 2003/53/EG ab Januar 2005 verboten. Die Biotransformationsprodukte von Alkylphenolethoxylaten (insbesondere von Octylphenolethoxylaten) sind in der Umwelt ubiquitär vorhanden. Die Ethoxylate werden durch die Eliminierung der Ethoxygruppe biologisch abgebaut (DUFT ET AL., 2003b). Alkylphenole haben eine außerordentlich breite Anwendung

und können nahezu über jeden Abwasserpfad in die Oberflächengewässer gelangen. Als wichtigste Eintragsquelle gelten die Abläufe von Kläranlagen (SPENGLER ET AL., 2001).

Alkylphenole werden hauptsächlich durch Sedimentadsorption und Biotransformation und nur zu einem geringen Anteil photolytisch abgebaut. Obwohl EKELUND ET AL. (1993) einen mikrobiellen Abbau im Wasser und Sediment mit erhöhter Degradation im Testverlauf feststellten, sind Octylphenol und Nonylphenol relativ resistent gegenüber Bioabbau (AHEL ET AL., 1994). Ein Großteil der Alkylphenole wird in der Kläranlage durch Sorption am Belebtschlamm mit Entfernungseffizienzen von 30 – 65% für OP und 60 – 75% für NP eliminiert (NAKADA ET AL., 2006, CESPEDES ET AL., 2006). Der photolytische Abbau ist abhängig vom pH und dem Eisen(II)/Oxalatverhältnis im Wasser, mit höheren Effizienzen bei pH 3,5 (SUN ET AL., 2006). In einem Feldversuch in einem flachen Gewässer waren 50% der Alkylphenole nach einer Fließstrecke von 12 km abgebaut (LIN ET AL., 2006). Im Wasser hat NP eine Halbwertszeit von weniger als 1,2 – 29 d, wohingegen im Sediment nach etwa 70 d erst 80% abgebaut sind. Somit liegen die Halbwertszeiten im Bereich von 28 – 104 d (BUA, 1991, LIBER ET AL., 1999). Die Sedimentadsorption von OP ist abhängig von der Sedimentmenge (maximale Adsorption bei der geringsten Sedimentkonzentration und abnehmende Sorptionsraten bei geringeren Konzentrationen) und der Salinität (höhere Adsorptionsraten bei höheren Salinitäten) (ZHOU, 2006). Die Remobilisierung des Octylphenols aus dem Sediment ist abhängig vom Sedimentalter und von der Desorptionsdauer. In frischen Sedimenten wird OP schnell remobilisiert (ZHOU, 2006).

2.2 Ökotoxikologische Untersuchung

2.2.1 Versuchsorganismus

Chironomiden gehören zur Ordnung der Zweiflügler (Diptera) und zur Familie der Zuckmücken (Chironomidae). Sie stellen eine der arten- und individuenreichsten Insektenfamilien dar, sind weltweit verbreitet und besiedeln die unterschiedlichsten Habitate. Sie kommen auch mit schwierigen klimatischen Bedingungen zurecht, so lebt die Zuckmückenart *Belgica antarctica* in der Antarktis (ARMITAGE ET AL., 1995). Bis heute wurden ca. 15 000 verschiedene Arten beschrieben, wovon die meisten im europäischen Raum leben (ARMITAGE ET AL., 1995). Zuckmücken sind an die unterschiedlichsten aquatischen Lebensräume angepasst. Sie kommen sowohl in stehenden als auch in fließenden Gewässern vor, besiedeln warme Quellen und kalte Gletscherseen und haben sich an salzreiches Meerwasser sowie an elektrolytarmes Süßwasser adaptiert (WICHARD ET AL., 1995). Chironomiden kommen in

Fließgewässern, in Abwasserkanälen und auch in Gewässern mit niedrigen pH-Werten vor. Die Art *Chironomus riparius* toleriert pH-Werte unter 4, aber auch über 10 (BRUNER & FISHER, 1993, BERVOETS ET AL., 1994). Die Art ist weltweit verbreitet, und pro Quadratmeter werden durchaus mehrere Tausend Individuen gefunden (PINDER, 1986). Sie durchläuft einen komplexen Lebenszyklus, der sich in vier Larvenstadien, ein Puppenstadium und die Imaginalphase gliedert (Abbildung 2.1).

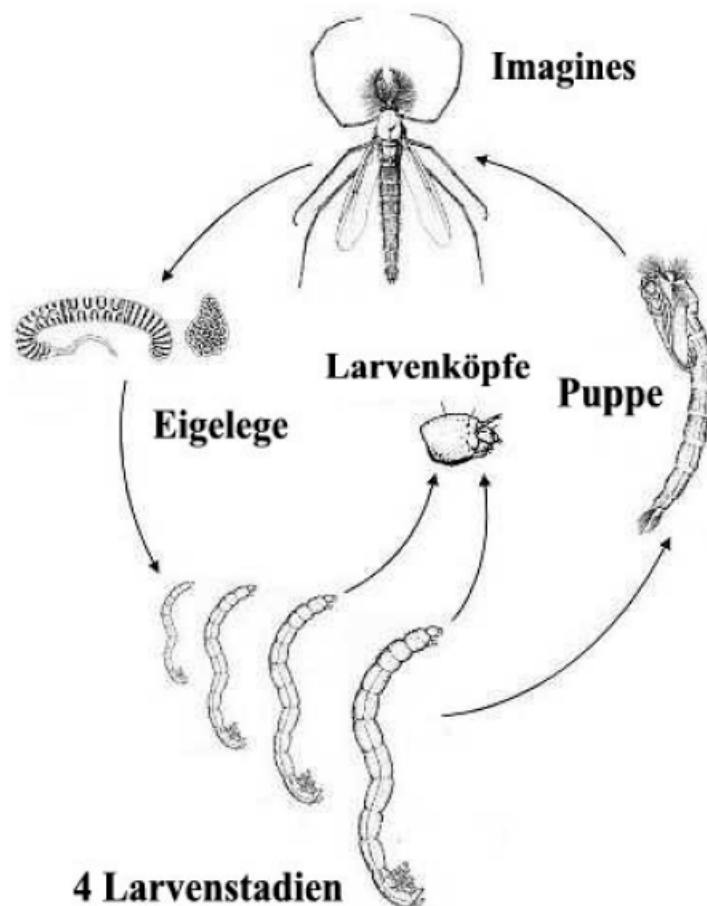


Abb. 2.1: Lebenszyklus der Zuckmücken (nach BRODERSEN & ANDERSEN, 2000)

Adulte Weibchen werden während der sich dem Schlupf anschließenden Schwarmflugphase befruchtet, legen gallertige, spiralförmig aufgedrehte Eigelege auf Steinen oder Pflanzen an der Wasseroberfläche ab und sterben nach der Eiablage. Die Eigelege bestehen meist aus 600 – 700 Eiern (ARMITAGE ET AL., 1995). Nach ca. drei Tagen schlüpfen die ersten Larven aus den Eigelegen. Das erste Larvenstadium ist freischwimmend, ab dem zweiten Larvenstadium leben die Larven eingegraben im Sediment. Ihre Röhren bauen sie aus Algen und feinen Sedimentpartikeln, und sie ernähren sich von Detritus. Bis zum Erreichen des Puppenstadiums vergehen etwa 13 – 15 Tage. Das Puppenstadium selbst dauert nicht länger als 72 h. Die noch etwa vier Tage lebenden Imagines verfügen über verkümmerte Mundwerkzeuge und können keine Nahrung aufnehmen (WATTS & PASCOE, 2000b). Die Tiere

sind deshalb auf die während der Larvalentwicklung angelegten Nahrungsdepots angewiesen (JACOBS & RENNER, 1988). Die Männchen schlüpfen prinzipiell vor den Weibchen, was für viele Insekten typisch ist. Der Abstand zu den Weibchen reicht unter natürlichen Bedingungen von wenigen Stunden bis maximal einigen Tagen (NEBEKER, 1971). Für die Produktion der Eigelege benötigen Weibchen mehr Energie und bleiben zur Nahrungsaufnahme länger im Sediment. Zudem ist ein höherer Paarungserfolg bei einem zuvor gebildeten großen Schwarm männlicher Mücken sicherer als bei einem gleichzeitigen Schlupf beider Geschlechter (ARMITAGE ET AL., 1995). Je nach Umweltbedingungen gibt es fünf bis sieben Generationen pro Jahr. *C. riparius* wird in der Abteilung Aquatische Ökotoxikologie der Universität Frankfurt permanent in Kultur gehalten. Die Ausgangspopulation wurde von der Bayer AG in Leverkusen bezogen.

2.2.2 Lebenszyklustest

Alle Experimente wurden unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt (Tabelle 2.7). In Anlehnung an die OECD-Standardmethode 218 (OECD, 2004a) ist der Test valide, wenn folgende Kriterien eingehalten werden: (1) In den Kontrollgefäßen schlüpfen mehr als 70% der eingesetzten Larven als Imago, (2) der pH-Wert befindet sich während des gesamten Versuchszeitraums zwischen 6 und 9, (3) die Temperatur beträgt stets $20 \pm 1^\circ\text{C}$ und (4) die Hauptemergenzzeit findet zwischen dem 13. und 23. Versuchstag statt.

Tab. 2.7: Parameter für den Lebenszyklustest und den 14 d-Test

Parameter	Wert
Raumtemperatur	$20 \pm 1^\circ\text{C}$
Beleuchtung	Hell-Dunkel-Rhythmus 16:8 h Lichtintensität 500 Lux
Luftfeuchtigkeit	70%
Artifizielles Wasser (voll entsalzt, mit Tropic-Marin®-Meersalzmischung eingestellt)	pH 7,9 – 8,4 Leitfähigkeit 540 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Sediment (Testsubstanzen) (OECD-Guideline 218)	75% Quarzsand 20% Kaolin 5% Torf 0,5% Brennessel pH 6,0 – 7,5
Sediment (abiotische Faktoren)	Quarzsand

In Anlehnung an die OECD-Standardmethode 218 (OECD, 2004a) erfolgte zu Beginn und am Ende des Experimentes die Messung von pH-Wert und Leitfähigkeit. Auftretende Verdunstungsverluste in den Testgefäßen wurden während der Versuchslaufzeit durch zusätzliche

Wassergaben (voll entsalztes Wasser) kompensiert. Als Versuchsendpunkte dienen Mortalität, Geschlechterverhältnis, mittlere Emergenzzeit, Eigelegequote, Eigelegegröße und Fruchtbarkeit der Eigelege, das Trockengewicht der Imagines sowie die Populationswachstumsrate.

Die Testsubstanz wurde zu Beginn des Experimentes mittels Dotieren (Spiken) auf das Testsediment überführt. Dazu wurde das benötigte Volumen der Stammlösung in der entsprechenden Menge Lösungsmittel (300 mL Lösungsmittel pro kg Sediment) gelöst und auf das Sediment gegeben. Die Lösemittelkontrolle wurde mit Ethanol bzw. Ethylacetat (bei Carbamazepin) (Reinheit 100%, Merck, Deutschland) durchgeführt. Damit das Lösungsmittel abdampfen und ein Effekt durch das Lösungsmittel ausgeschlossen werden konnte, wurde das so dotierte Sediment anschließend mindestens 24 h unter den Abzug gestellt. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Substanzen bzw. die Ansätze der abiotischen Faktoren sind in Tabelle 2.8 angegeben.

Tab. 2.8: Nominalkonzentrationen der untersuchten Substanzen bzw. Ansätze der untersuchten abiotischen Faktoren

Substanz bzw. Versuchsansatz	Konzentrationsbereich
Temperatur	14 – 26 °C
Salinität	1 – 9‰
Methopren und Luteolin	2 – 162 µg/kg
4-Nonylphenol	0,4 – 250 mg/kg
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0,08 – 50 mg/kg
Endosulfan	4,5 – 450 µg/kg
Tributylzinn	50 – 160 µg Sn/kg
Cadmium	0,15 – 2,4 mg/kg
Blei	0,65 – 65 mg/kg
17- α -Ethinylöstradiol und 17- α -Methyltestosteron	3 – 243 µg/kg
Carbamazepin	0,6 – 10 mg/kg
Fluoxetin	0,2 – 5,9 mg/kg

Für die Gewährleistung eines populationsrelevanten Experimentdesigns sowie der statistischen Datensicherheit wurden fünf parallele Testgefäße (Replikate) pro Behandlungsgruppe mit insgesamt 100 Tieren (20 pro Replikat) angesetzt (Abbildung 2.2). Der Versuchsaufbau wurde für die Untersuchung der abiotischen Faktoren (Temperatur und Salinität) leicht abgeändert. Hier erfolgte die Exposition in reinem Quarzsand mit je drei Replikaten á 50 Tieren. Pro Replikat wurde 100 g Sand in Kristallisierschalen (Schott & Duran, Ø 190 mm, Höhe 90 mm) eingewogen und mit 1 L rekonstituiertem Wasser (siehe Tabelle 2.7) überschichtet. Die Reproduktion erfolgte in einem mit Edelstahlgaze (Maschenweite 0,75 mm) abgedeckten Glasgefäß (30×20×20 cm). Dazu wird für die Eiablage der Weibchen ein mit

ca. 300 mL rekonstituiertem Wasser gefüllter Behälter (12×12×3,5 cm) in dem Glasgefäß aufgestellt. Für die anderen Substanzen wurde 400 g Sediment in einem Becherglas eingewogen und mit 400 mL rekonstituiertem Wasser überschichtet. Für die Reproduktion wurden weitere, mit Gaze (Maschenweite 0,75 mm) abgedeckte und mit 200 mL rekonstituiertem Wasser befüllte Bechergläser angesetzt.

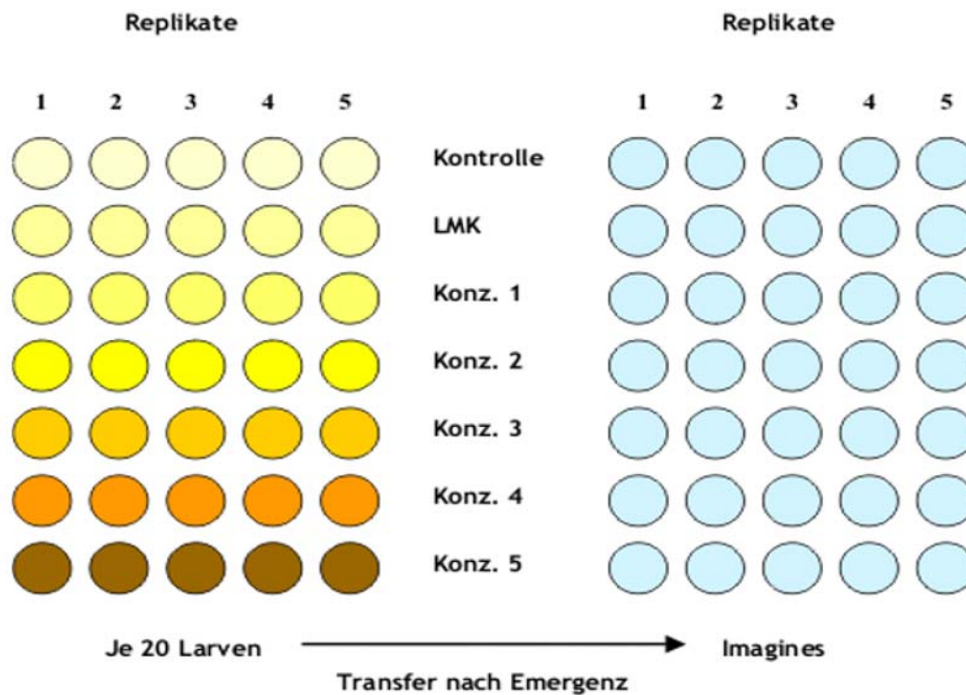


Abb. 2.2: Versuchsaufbau beim Lebenszyklustest. LMK = Lösemittelkontrolle.

Für das Experiment wurden zu Beginn frische Eigelege (Alter ≤ 24 h) aus der Laborzucht entnommen und einzeln in mit rekonstituiertem Wasser gefüllten 24-er Mikrotiterplatten zum Schlupf gebracht. Im Anschluss erfolgte in einer Petrischale die Durchmischung der Larven der einzelnen Eigelege. Unter einem Stereomikroskop wurden vitale Larven mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgesaugt und in die jeweiligen Testgefäße eingezählt. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 des Experiments definiert. Damit sich die eingesetzten Larven in das Sediment eingraben konnten, wurde die Belüftung zu Beginn des Versuchs für 24 h abgestellt. Die Testgefäße wurden mittels eines Kompressors durch eine Pasteurpipette, die mit einem Verbindungsschlauch direkt über dem Sediment angebracht war, mit ca. 1 Blase pro Sekunde belüftet. Außerdem wurden die Testgefäße mit einer Gazeabdeckung (Maschenweite 0,75 mm) versehen. Die Larven wurden im Intervall von zwei Tagen vom 0. bis zum 18. Versuchstag mit 0,5 mg/Larve/d gemahlener Tetramin[®] Suspension (Tetra Fischwerke, Berlin) gefüttert. Ab dem 19. Versuchstag wurde die Futtermenge, bedingt durch die Emergenz einiger Tiere, für die noch nicht geschlüpften Larven halbiert.

Da ab dem 14. Versuchstag der Schlupfzeitpunkt der Mücken allmählich erreicht ist, erfolgte die tägliche Untersuchung der Testgefäße auf geschlüpfte Tiere. Dabei wurden das Geschlecht, der Schlupfzeitpunkt sowie die Anzahl der Schlupfunfälle und, wenn möglich, deren Geschlecht bestimmt. Als Schlupfunfälle werden tote Imagines gezählt, die auf der Wasseroberfläche schwimmen bzw. die nicht ganz aus dem Kokon geschlüpft sind. Geschlüpfte Imagines wurden aus den Testgefäßen der jeweiligen Replikate mit einem Exhauster abgesaugt und jeweils in die Reproduktionsgläser überführt.

Die produzierten Eigelege wurden einmal täglich aus den Gefäßen entfernt und deren Anzahl sowie die Zahl der Eier pro Gelege bestimmt. Anschließend wurden die Eigelege in mit rekonstituiertem Wasser befüllten 24-er Mikrotiterplatten einzeln ausgelegt und deren Fruchtbarkeit nach drei Tagen bestimmt. Die toten Imagines wurden täglich aus den Reproduktionsgefäßen entfernt und bis zum Versuchsende gesammelt. Am Ende der jeweiligen Experimente, nach ca. 30 Tagen, wurden die gesammelten Imagines beider Geschlechter bis zur Gewichtskonstanz bei 34°C im Wärmeschrank getrocknet und auf einer Analysenwaage gewogen.

2.2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Datenauswertung wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), Version 4.03 und 5 für Windows XP, durchgeführt. Alle Daten wurden zu Beginn auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Bei Normalverteilung der Daten erfolgte die Signifikanzprüfung mit dem One-way-ANOVA-Test und Dunnett's Multiple Comparison Test, ansonsten mit dem Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und die Signifikanz mittels Sternchen in den Diagrammen des Ergebnis- bzw. Diskussionsteiles angegeben.

Mortalität

Um die Gesamtmortalität berechnen zu können, wird die Zahl der toten Larven und Puppen täglich ermittelt. Zusätzlich wird die Anzahl der Schlupfunfälle geschlechtsspezifisch aufgenommen. Die Gesamtmortalität der Zuckmücken wird anschließend auf die Anzahl der insgesamt exponierten Tiere pro Konzentration bezogen. Das Verhältnis der toten zu den lebenden Mücken wurde mit dem Fisher's Exact Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Zu Beginn der Auswertung wurde für jede Konzentration eine mittlere Mortalität

ermittelt und diese anschließend für die Berechnung des LC₁₀-/LC₅₀-Wertes mittels nicht-linearer Regression (sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit variabler Anstieg) benutzt. Als festgesetzte Kurvenparameter dienen für die untere/obere Asymptote der Regressionskurve die Kontrollmortalität sowie die maximale Mortalität von 100%.

Mittlere Emergenzzeit

Basierend auf dem Schlupfzeitpunkt und der Anzahl der geschlüpften Tiere wird der mittlere Schlupfzeitpunkt (EmT₅₀) ermittelt. Zu Beginn der Emergenz schlüpfen mehr Tiere über einen kürzeren Zeitraum als dies im weiteren Verlauf beobachtet werden kann. Dadurch weist die nicht-lineare Regression der Gaußschen Glockenkurve zahlreiche Über- und Unterschätzungen der wahren Werte auf. Um die Berechnung der EmT₅₀ zu verbessern, werden die Emergenzdaten transformiert: Die Anzahl der geschlüpften Mücken wird kumuliert und auf 100% normalisiert. Diese transformierten Daten werden mit dem natürlichen Logarithmus des Schlupfzeitpunktes an das Modell der kumulativen Logistikkurve angepasst (Gleichung 1). Das Statistikprogramm berechnete anhand der Logistikkurve die EmT₅₀ der jeweiligen Geschlechter, den Standardfehler, das dazugehörige 95% Konfidenzintervall sowie die Anzahl der Freiheitsgrade. Um die EmT₅₀-Werte anschaulich darstellen zu können, wurden die logarithmierten Werte rücktransformiert und die einzelnen EmT₅₀-Werte anschließend zu einem Mittelwert zusammengefasst.

$$Y = \frac{c \cdot e^{b(x-EmT_{50})}}{1 + e^{b(x-EmT_{50})}} \quad (1)$$

Y	kumulierte Anzahl der geschlüpften Tiere (Männchen bzw. Weibchen)
x	logarithmierter Schlupfzeitpunkt
c	100% (konstanter Wert für maximalen Schlupferfolg)
b	Anstieg der kumulativen Logistikkurve
EmT ₅₀	mittlere Emergenzzeit (Männchen bzw. Weibchen)

Eigelege pro Weibchen

Zur Ermittlung der Eigelege pro Weibchen (Eigelegequote) wird die Anzahl der produzierten Eigelege täglich bestimmt. Die Anzahl der Gelege wird durch die Anzahl der fruchtbaren Weibchen geteilt. Man unterscheidet zwischen der Gesamtzahl an Gelegen pro Weibchen und der fruchtbaren Gelegezahl pro Weibchen. Da dieser Parameter bei einer Versuchsdurchführung mit nur einem Reproduktionsgefäß durch statistische Testmethoden nicht auf signifikante Unterschiede überprüft werden kann, bleibt nur die Untersuchung

der signifikanten Unterschiede im Verhältnis der fruchtbaren Gelegen zu den unfruchtba-
ren mittels Fisher's Exact Test. Bei mehreren Reproduktionsgefäßen wird die Signifikanz-
prüfung mit dem One-way ANOVA-Test durchgeführt.

Geschlechterverhältnis

Da das Geschlecht ein quartaler Wert ist, kann die Signifikanzprüfung dieses Parameters
nicht mit dem One-way ANOVA-Test durchgeführt werden. Statt dessen erfolgte die Prü-
fung signifikanter Unterschiede zwischen den jeweiligen Zahlen der Männchen und Weib-
chen zur Kontrolle mit dem Fisher's Exact Test.

Trockengewicht der Imagines

Ein weiterer zu bestimmender Endpunkt der Versuche ist das Trockengewicht der Imagines.
Die Gewichte der Weibchen weisen statt der Normalverteilung eine bimodale Verteilungs-
funktion auf, die sich durch die Eiablage erklärt. So ist anzunehmen, dass Weibchen mit
Eiablage deutlich leichter sind als Weibchen ohne Eiablage. Jedoch ist es auch bei den
leichteren Weibchen nicht ersichtlich, ob ein oder mehrere Eigelege abgelegt wurden. Aus
diesem Grund wurde nicht zwischen den Weibchen mit und Weibchen ohne Eiablage unter-
schieden. Durch die bimodale Verteilungsfunktion kann keine Signifikanzprüfung der Roh-
daten mit dem One-way ANOVA-Test durchgeführt werden, sondern nur mit dem Kruskal-
Wallis-Test.

Populationswachstumsrate

Die Populationswachstumsrate λ wurde über den mathematischen Zusammenhang einzel-
ner Entwicklungs- und Reproduktionsparameter berechnet (Gleichung 2).

$$\lambda = ((e \cdot d \cdot c) \cdot (1 - a/100))^{1/b} \quad (2)$$

- a Mortalität
- b mittlerer Schlupfzeitpunkt der Weibchen (\pm SD)
- c Weibchenanteil
- d mittlere Gelegegröße (\pm SD)
- e Anzahl fruchtbare Gelege pro Weibchen

Die Berechnungsgrundlage der Populationswachstumsrate wurde von der Abteilung Aquatische Ökotoxikologie in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME), basierend auf bereits bestehenden Populationsmodellen für Chironomiden von FORBES und COLD (2005) und SIBLEY ET AL. (1997a) auf das gewählte Testdesign angepasst (HOMMEN, 2005).

2.2.4 Rückstandsanalytik

Die Rückstandsanalytik der Sedimentproben erfolgte für Tributylzinn (TBT), Cadmium (Cd) und Blei (Pb). Aufgrund der Tatsache, dass im Versuch mit Carbamazepin und Fluoxetin die gleichen Konzentrationen und die gleichen Sedimente wie bei NENTWIG (2006) verwendet wurden, wurde auf eine Rückstandsanalytik verzichtet. Die Analyse von Tributylzinn im Sediment wurde von GALAB Laboratories in Geesthacht durch organische Extraktion und Gaschromatographie nach DIN 19744 (DIN, 2003) durchgeführt. Die Wiederfindungsrate des Referenzmaterials im Sediment betrug 93%, die Bestimmungsgrenze lag bei 1 µg/kg TG. Die Blei- und Cadmiumanalytik wurde durch Chemlab in Bensheim durch Königwasseraufschluss und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) nach DIN 38406-E29 (DIN, 1996) durchgeführt. Die Wiederfindungsraten des Referenzmaterials lagen bei 90 – 100%. Die Nachweisgrenze für Pb und Cd lagen bei 0,5 bzw. 0,05 mg/kg TG.

2.3 Molekularbiologische Untersuchung

Die Expression ist die Ablesung der Gene in einer speziellen Zelle oder einem Zellverband und die Übersetzung in Proteine. Unter einer funktionellen Genomanalyse versteht man die Untersuchung aller exprimierten Gene im Hinblick auf ihre regulatorische Funktion. Zu der funktionellen Genomanalyse gehört auch die Untersuchung der Veränderung der Aktivitätsmuster während verschiedenen Entwicklungsstadien oder durch den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen. Die Ergebnisse dieser Studien erlauben Rückschlüsse auf die funktionelle Beteiligung von Genen an bestimmten zellulären Stoffwechselprozessen oder deren genetischer Kontrolle.

Unter den Hochdurchsatz-Verfahren zur Ermittlung einer differenziellen Genaktivität hat sich die Technologie der DNA-Mikroarrays als die robusteste Lösung erwiesen. Schon 1975 wurde eine Methode entwickelt, um markierte Nukleinsäuren mit komplementären Nukleinsäuren, die an feste Träger gebunden waren, zu hybridisieren (SOUTHERN, 1975). Ein

Mikroarray oder Biochip ist die systematische Anordnung von biomolekularen Sonden wie Nukleinsäuren, Antikörper, Peptiden oder Proteinen auf festen Oberflächen (Glas, Metall, Kunststoff). Durch die Sondenarrays erhält man parallel arbeitende, miniaturisierte Analysensysteme auf einer möglichst kleinen Fläche, welche die gleichzeitige Untersuchung einer großen Zahl von Parametern ermöglichen. Während bei der klassischen Form der Hybridisierung genomische DNA oder RNA auf einen Träger übertragen wird, werden bei der reversen Hybridisierung die DNA-Sonden selbst auf dem Träger gebunden. Die zu testende komplexe genomische DNA oder das RNA-Gemisch wird markiert und in Lösung auf den Träger hybridisiert. Anschließend weist man die erfolgten Hybridisierungen nach und erkennt so, welche der definiert auf dem Träger angeordneten Sonden einen Hybridisierungspartner im Gemisch gefunden hat.

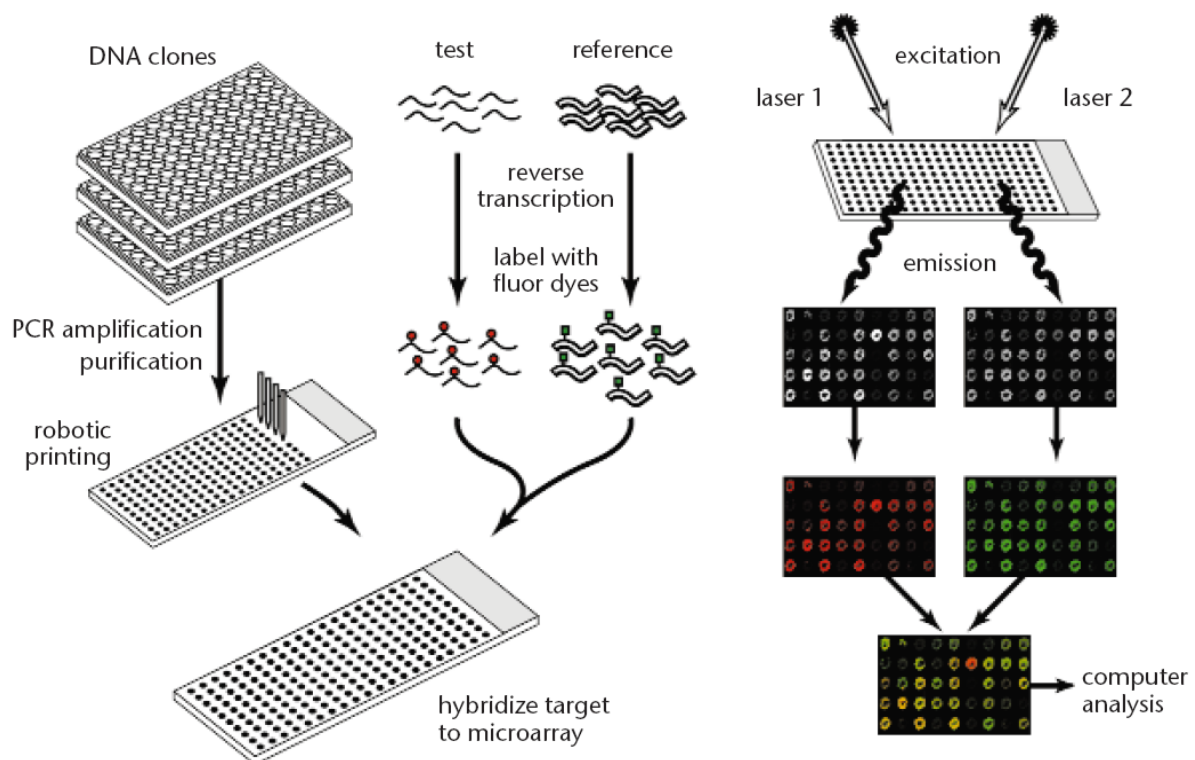


Abb. 2.3: Vorgehensweise bei der Mikroarray-Herstellung, der Hybridisierung und der folgenden Scanauswertung (aus DUGGAN ET AL., 1999).

Dieses Verfahren stellt die Grundlage für die DNA-Mikroarray-Technologie dar, wobei auf den Arrays die Menge der gebundenen Sonden mehrere Tausend betragen kann. Durch die Nutzung neuer Materialien und Markierungssysteme konnte eine Steigerung der Sondenzahl und -dichte (10 000 Sonden) erreicht werden. Durch die Anwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können zwei verschiedene Proben gleichzeitig auf denselben Array hybridisiert werden. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten ermöglicht die Bestimmung der relativen Anteile von mRNAs einzelner Gene und erlaubt Rückschlüsse auf ihr Expressions-

niveau in der jeweiligen Gewebeprobe. Zur Herstellung von cDNA-Arrays verwendet man Kopien der Transkriptionsprodukte von Genen (cDNAs), die zuvor kloniert und in Bibliotheken gesammelt wurden. Mit Hilfe der PCR-Technik werden von diesen Klonen 200 – 600 Basenpaare lange Produkte amplifiziert und als Sonden auf den Chip aufgebracht. Ein Überblick über die Vorgehensweise bei der Mikroarray-Herstellung, der Hybridisierung und der folgenden Auswertung der Scans ist in Abbildung 2.3 gegeben.

Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit und größtenteils durch Mitarbeiter der Firma GENterprise Genomics GmbH in Mainz. Wo die Arbeiten durch andere Personen erfolgten, ist dies kenntlich gemacht.

2.3.1 Gewinnung und Isolierung der RNA

Für die Gewinnung der RNA wurden *Chironomus*-Larven für die Dauer von zwei Wochen analog zu den Versuchsbedingungen des Lebenszyklustests (bezüglich des Sedimentes, der Wasserparameter sowie der Hälterung) gegenüber den Substanzen exponiert (siehe auch Kapitel 2.2.2). Jeweils 200 L1-Larven aus den für die Lebenszyklustests ausgewählten Eigelegeln wurden in mit 500 g OECD-Sediment (belastet bzw. unbelastet) und 3 L rekonstituiertem Wasser befüllten Aquarien (20x20x30 cm) überführt.

Nach 14 Tagen ist das vierte Larvenstadium erreicht. Da die Schadstoffexposition in einigen Fällen zu einer verzögerten bzw. schnelleren Entwicklung führt, und später beobachtete Effekte letztlich vermutlich „nur“ auf ein unterschiedliches Entwicklungsstadium zurückzuführen sind, ist es wichtig, die DNA bzw. RNA von gleichaltrigen Larven für die Hybridisierungen zu verwenden. Deshalb wurden Puppen und kleinere Larven, die das letzte Larvenstadium noch nicht erreicht haben, nicht in den Larvenpool integriert.

Vor der Entnahme der Larven wurden die Wasserparameter pH, Leitfähigkeit, Temperatur sowie Carbonat-, Nitrat-, Nitrit- und Chloridgehalte aufgenommen. Danach wurden die Larven dem Sediment entnommen und beim Überführen in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gezählt. Um einem möglichen Abbau der RNA vorzubeugen, ist es wichtig schnell zu arbeiten. Alle Larven eines Replikats wurden gemeinsam kurz auf ein Papierhandtuch abgetupft, in ein 4 mL-Eppendorf-Röhrchen gegeben, gewogen und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dies dauerte etwa 2 Minuten. Bis zur genetischen Analyse wurden die eingefrorenen Larven bei -80°C gelagert. Die Gesamt-RNA aus den Larven wurde mit Hilfe der Guanidin-Thio-Cyanat-Methode (GTC) und anschließender Phenol-Chloroform-

Extraktion (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987) durchgeführt. Die Isolierung der PolyA⁺-RNA (mRNA) zur Herstellung der cDNA-Banken aus der Gesamt-RNA erfolgte mit dem Nucleo-TraP[®]CR-Kit von Macherey & Nagel.

2.3.2 Herstellung der cDNA-Banken

Da es für das Verständnis der zellulären Vorgänge unbedingt notwendig ist, die Sequenz der vollständigen mRNA zu kennen, muss die gesamte unveränderte mRNA in DNA umgeschrieben und anschließend als stabile cDNA in Form einer Genbank kloniert werden. Für die cDNA-Banken wurde die Stressor-Konzentration ausgewählt, bei der noch kein deutlicher Effekt auf die Mortalität zu sehen war bzw. bei der die ersten Effekte im Lebenszyklustest auftraten. Dies waren 50 µg Sn/kg (für Tributylzinn), jeweils 9 µg/kg Methyltestosteron und Ethinylöstradiol, 2,5 mg Blei/kg, 0,9 mg Fluoxetin/kg und 0,63 mg Carbamazepin/kg. Die RNA wurde dann von Larven aus dieser Behandlungsgruppe isoliert und für die Bankherstellung verwendet. Die Herstellung der cDNA-Banken erfolgte durch Britta Burger (GENTERprise) mit dem Creator[™] Smart[™] cDNA Library Construction Kit von Clontech Laboratories. Abweichend vom Protokoll wurde die cDNA über Primer Extension synthetisiert und erfolgte die Größenfraktionierung über Agarosegele mit anschließender Elektroelution. Anstelle des pDNR-Lib-Vektors wurde der pSPORT-Vektor verwendet.

2.3.3 Herstellung und Anwendung des ChiroChips

Die Arbeitsschritte dieses Kapitels wurden von Oliver Bitz (GENTERprise) durchgeführt.

Herstellung der Sonden für den Chip

Der Chip besteht aus 12 864 Spots, die etwa 6 400 Sonden repräsentieren (Abbildung 2.4). Die Sonden aus den hergestellten cDNA-Banken wurden mit Hilfe der PCR mit vektorspezifischen Primern hergestellt. Dazu kamen noch weitere PCR-Produkte als interne Kontrollen. Alle Sonden wurden in 10 µL Spotting-Puffer mit einer Mindestkonzentration von 250 ng/µL gelöst. Diese Sonden wurden mindestens zweifach auf dem Chip gespottet.

Die Blöcke 1 – 12 (grüne und rote Felder in der Abbildung 2.4) bestehen aus jeweils 1 056 Spots (32 horizontal und 33 vertikal), die letzten beiden (hellblaue Felder, Abbildung 2.4) aus jeweils 192 (32 horizontal, 6 vertikal). In den ersten acht Blöcken (grüne Felder) befinden sich neben den Standardplasmiden Klone aus den Banken von Carbamazepin, Fluoxe-

tin, Tributylzinn und Blei. Die Blöcke 9 und 10 (rote Felder) bestehen aus Sonden der Banken von Ethinylöstradiol und Methyltestosteron, Standardplasmide und PCR-Produkte. Block 11 enthält zusätzlich noch Tubulin-, Aktin- und Vitellogeninplasmide, aber keine PCR-Produkte, und Block 12 enthält nur Sonden aus den cDNA-Banken von Ethinylöstradiol und Methyltestosteron sowie Standardplasmide. In den letzten beiden Blöcken finden sich nur Sonden aus der cDNA-Bank von Ethinylöstradiol.

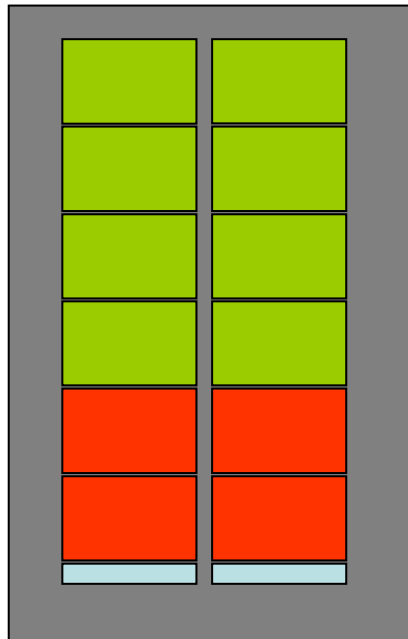


Abb. 2.4: Spottingmuster des Mikroarrays

Spotten des Chips

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroarrays wurden mit Hilfe des Omnigrid 100 (Genemachines, San Carlos, CA, USA) hergestellt. Die Druckköpfe (stealth printheads) von Telechem (Sunnydale, CA, USA) waren beim Spotten mit einer variablen Anzahl von Spotting-Nadeln bestückt. Die Arrays wurden bei ca. 20°C und einer relativen Luftfeuchte zwischen 45 und 55% produziert. Die mit Epoxysilan beschichteten Nexterion Epoxy-Objektträger (Schott, Mainz) wurden zunächst für eine halbe Stunde in eine feuchte Kammer gelegt und anschließend für ca. 1 Stunde bei 80 – 100°C inkubiert. Die fertigen Objektträger wurden in dunkler und trockener Umgebung gelagert.

Markierung der RNA

Aus 10 – 40 µg Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA hergestellt. Hierbei wurden normale und markierte Nukleotide eingebaut. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch die Anwendung von Aminoallyl-dUTPs (aa-dUTP) indirekt an diese Aminoallylgruppen

gekoppelt. Hierzu wurde das SuperScript III Indirect Labelling Kit (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) mit Alexafarbstoffen (Alexa 555 und 647) verwendet. Die gereinigte und markierte cDNA wurde in 20 μL HPLC-Wasser gelöst. Die markierte cDNA wurden sofort zur Hybridisierung verwendet oder bei -20°C gelagert. Für die Hybridisierung auf dem Chip wurde die gesamte markierte cDNA oder nur ein Teil davon verwendet.

Hybridisierung

Vor der Hybridisierung werden die beiden für das Experiment vorgesehenen markierten cDNA gemischt und das Volumen auf höchstens 10 μL verringert. Die kombinierten Proben wurden mit Hybridisierungspuffer UltraHyb (Ambion Inc., Austin, TX, USA) auf 120 μL aufgefüllt, gut gemischt, kurz abzentrifugiert (20 800 g, 1 min) und 10 min bei ca. 80°C denaturiert. Kurz vor der Hybridisierung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gewaschen, denaturiert und anschließend geblockt. Abschließend wurden die Arrays 1 min in Wasser gespült und durch Zentrifugation (500 g, 5 min) getrocknet.

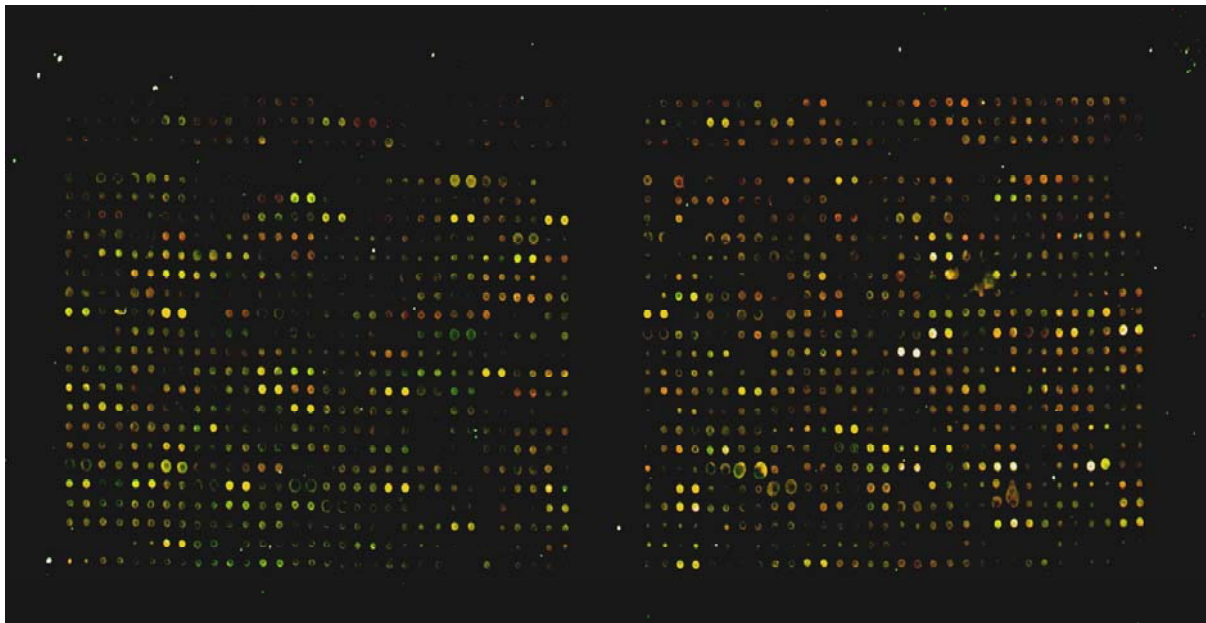


Abb. 2.5: Ergebnis der Hybridisierung der gegenüber Ethinylöstradiol exponierten *Chironomus*-Larven. Ausschnitt aus dem Mikroarray; rote Punkte zeigen die Überexpression der Klone bei exponierten, grüne Punkte die Überexpression der Klone bei Kontrolllarven. Die gelben Punkte zeigen eine nicht-differentielle Genexpression zwischen den beiden Gruppen.

Die Hybridisierung der Arrays wurde in der Hybridisierungsstation Genetac (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI, USA) bei kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Probe wurde bei 75°C auf den Array appliziert. Die Hybridisierung bei 48°C dauerte in der Regel 16 Stunden. Während dieser Zeit wurde die Lösung mit einem Volumen von 120 μL ständig

bewegt. Nach der Hybridisierung erfolgt die Waschung. Alle Waschschritte fanden in der Hybridisierungsstation statt. Die Arrays wurden bis zum Scannen in 0,2-faches SSC (Standard-Saline-Citrat-Puffer) gelagert.

Abbildung 2.5 zeigt einen beispielhaften Ausschnitt aus dem Mikroarray nach der Hybridisierung der cDNA der Kontrolllarven (grüne Markierung) und der gegenüber 9 µg/kg Ethinyl-östradiol exponierten Larven (rote Markierung). Die roten Punkte zeigen, dass die betreffenden cDNA-Klone in den exponierten Larven stärker exprimiert wurden, die grünen Punkte zeigen eine Überexpression der Klone in den Kontrolltieren. Die gelben Punkte zeigen eine nicht-differentielle Genexpression zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Detektion der Rohdaten (Scanning)

Kurz vor dem Scannen wurden die Objektträger mit Druckluft bzw. Stickstoff schnell getrocknet, um Schlieren bzw. Salzurückstände, welche einen hohen Hintergrund beim Scannen erzeugen könnten, zu vermeiden. Zum Scannen wurde der Scanner Genetac LS IV (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI, USA) benutzt. Der Scanner ist mit zwei Lasern und entsprechenden Filtern zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 555 und Alexa 647 ausgestattet. Dieser Scanner ist kein konfokales System, es ist somit möglich, durch Objektträger hindurch bzw. markierte Objekte durch ein Deckgläschen zu scannen. Die Scans der Arrays wurden in der Regel mit der Array-Seite nach unten durchgeführt. Die Laserenergien bzw. Scanintensitäten wurden individuell, getrennt für jeden Kanal, an den Array angepasst. Auch der gescannte Ausschnitt des Arrays wurde individuell eingestellt. Die beiden Kanäle wurden getrennt in zwei grauschattierten Tiff-Bildern mit einer Tiefe von 16 Bit zur späteren Auswertung gespeichert.

2.3.4 Auswertung der Daten

Computergestützte Analyse

Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde mit dem Programm GenePix 5.1 bzw. 6.0 (Axon, Baden, Schweiz) durchgeführt. Das Raster wurde mit variablen Kreisen über den Array gelegt, wobei Spots mit Signalstärken unter 1 000 und schlechte Spots, verursacht durch Verunreinigung auf dem Objektträger, von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Nachdem das Raster über dem Array ausgerichtet wurde, wurden die Werte der Pixel innerhalb der Kreise als Vordergrund und die Werte der Pixel in der unmittelbaren

Umgebung als Hintergrund gemessen. Das Ergebnis mit allen relevanten Daten wurde in einem von Excel und anderen Programmen lesbaren Format gespeichert.

Die Qualitätskontrolle, statistische Auswertung sowie die Interpretation der Daten erfolgte mit Hilfe von GeneSpring (Agilent Technologies, Wilsonville, OR, USA). Zusätzlich wurde die Programmiersprache R mit angepassten Scripten aus dem Programmpaket Bioconductor, Goulphar-Skripte bzw. von Oliver Bitz (GENTERprise) und Achim Tresch (IMBEI, Institut für medizinische Biometrie) geschriebenen Scripten benutzt. Diese sind Programme zur Normalisierung und Qualitätskontrolle der gewonnenen Rohdaten. Nach der Normalisierung mit der LOWESS-Methode (locally weighted scatterplot smoothing; CLEVELAND, 1979, QUACKENBUSH, 2002) erhält man eine Liste mit normalisierten Ratios (Verhältnis der beiden Signale zueinander). Nach der Regression und Normalisierung der Arraydaten werden die Klone in einem Scatterplot aufgetragen.

Abbildung 2.6 zeigt einen beispielhaften Scatterplot für die Blei-Exposition. Auf der x-Achse sind die exprimierten Gene der nicht-behandelten Kontrolle aufgetragen und auf der y-Achse die exprimierten Gene der mit Blei behandelten Larven. Die mittlere Linie kennzeichnet die Lage der nicht differenziell exprimierten Gene, die obere Linie stellt die 1,8-fache Überexpression dar, die untere Linie eine 1,8-fache Unterdrückung. Alle Gene, die zwischen diesen beiden Linien liegen, werden als nicht differentiell exprimiert betrachtet.

Durch die Hybridisierung der RNA zweier biologische Replikate sowie durch Dye-Swaps (bei der ersten Hybridisierung ist beispielsweise die RNA der belasteten Probe grün markiert und bei der zweiten Hybridisierung rot) erhält man 4 Listen mit normalisierten Ratios. Nur Klone (Plasmide), die in 3 von den 4 Versuchen (Listen) ein mindestens 1,8-fach höheres oder niedrigeres Signal als die Kontrolle haben, werden für die weitere Verarbeitung ausgewählt. So erhält man eine Liste von Klonen mit differenzierten Signalen. Es wird generell angenommen, dass eine 2-fache Expression (über- oder unterexprimiert) signifikant ist (LARKIN ET AL., 2002, BLUM ET AL., 2004). In einigen Fällen wird eine vierfache Expression (z.B. bei Haushaltsgenen) als signifikant betrachtet (WARRINGTON ET AL., 2000).

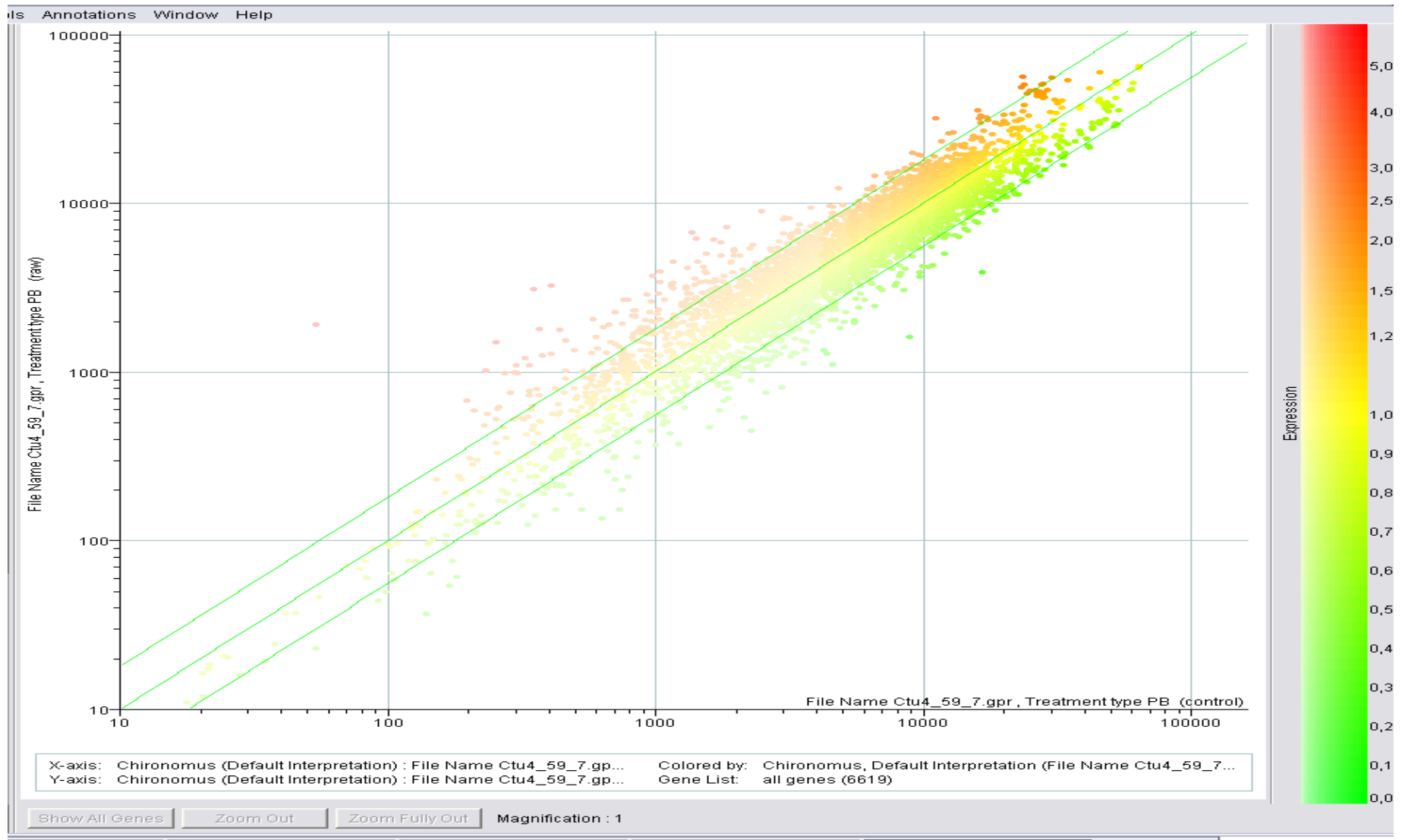


Abb. 2.6: Expression der Gene von *Chironomus riparius* nach der Exposition gegenüber Blei

Identifizierung der Klone

Plasmide (Klone), die nach der Hybridisierung eine Über- bzw. Unterexprimierung zeigten, wurden verdünnt (1:50) zu chemisch- bzw. elektrisch-kompetenten Bakterienzellen gegeben und transformiert. Bei der Transformation werden die Plasmide in die Zellen eingebaut und diese Zellen anschließend inkubiert. Durch die Vermehrung der Bakterienzellen wird die Konzentration der Plasmide ebenfalls erhöht. In der anschließenden Plasmid-Präparation werden die Plasmide wieder aus den Zellen isoliert und für die DNA-Sequenzierung verwendet. Die DNA-Sequenzierung wurde mit der auf SANGER ET AL. (1977) beruhenden Kettenabbruch-Methode und dem automatischen Sequenziergerät ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software FinchTV (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA) und Editseq (DNASTar, Madison, WI, USA). Die Datenbanksuchen wurden in Eigenarbeit und mit Unterstützung von Matthias Linke (GENterprise) mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (ALTSCHUL ET AL., 1997) des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) durchgeführt. Falls ähnliche Sequenzen bereits in den Datenbanken hinterlegt waren, erhält man in der Annotation der gefundenen „Treffer“ den Namen des dahinterstehenden Proteins. Zusätzlich zum Proteinnamen erhält man auch die Spezies, deren Sequenz hinterlegt ist, und den Grad der Übereinstimmung zwischen Datenbank-Treffersequenz und der eingegebenen Suchsequenz. Die Signifikanz des Treffers zeigt der Erwartungswert (E-Value). Dieser gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Übereinstimmung der Sequenzen kein Zufall, sondern ein valides Ergebnis ist. Durch Annotationen (GENE ONTOLOGY, 2007, EMBL-EBI, 2007, SWISSPROT, 2007) und Literaturrecherche erfolgte, falls bekannt, die Bestimmung der Funktion der Proteine und der biologischen Prozesse, an denen die Proteine beteiligt sind. Die ausführliche Auflistung der Annotation nach biologischen Prozessen und molekulare Funktionen befindet sich im Anhang. Im Ergebnisteil befindet sich die vereinfachte und übersichtliche Darstellung

3 Ergebnisse

3.1 Ökotoxikologische Untersuchung

3.1.1 Salinität und Temperatur

Salinität

In einem ersten Versuch mit Salinitäten von 2,5 – 20‰ zeigte sich, dass schon bei der dritthöchsten Konzentration (10‰) eine Mortalität von 100% erreicht wurde. Die Untersuchung der Effekte einer zunehmenden Salinität auf *Chironomus riparius* erfolgte daher für 1; 2,5; 3; 5; 7 und 9‰. Die Mortalität lag im Bereich von 10 – 100% (Abbildung 3.1A). Bei allen Salinitäten, außer bei 2,5‰, gab es einen signifikanten Anstieg der Mortalität ($p < 0,001$), die bei 9‰ 100% erreichte. Im Vergleich zur Kontrolle (20,7%) war die Mortalität bei 2,5‰ mit 10% signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Die aus diesen Daten errechnete LC_{50} betrug 3,12‰ (KI: 2,19 – 4,42‰) und die errechnete LC_{10} 0,66‰ (KI: 0,26 – 1,68‰).

Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen bei 17,6 – 33,3 Tage und bei den Weibchen bei 19,8 – 38,3 Tage (Abbildung 3.1B). Der mittlere Schlupfzeitpunkt war sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen ab 5‰ signifikant verzögert ($p < 0,001$). Lag die EmT_{50} der Männchen bei den Kontrollen bei 19,8 Tagen, war sie bei 5‰ und 7‰ 6,8 bzw. 13,5 Tage später. Bei den Weibchen war der mittlere Schlupfzeitpunkt der Kontrolle 23 Tage und bei 5‰ und 7‰ 7,5 bzw. 15,3 Tage später.

Die Anzahl der Eier pro Gelege lag zwischen 378 und 484 (Abbildung 3.1C). Ab 3‰ nahm die Gelegegröße ab. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant. Mit zunehmender Salinität (wieder mit Ausnahme von 2,5‰) nahm die Zahl der Gelege und damit zusammenhängend auch die Zahl der Gelege pro Weibchen deutlich ab. Die Kontrollmücken legten insgesamt 72 Gelege (92 bei 2,5‰), die Mücken bei 7‰ hingegen nur 3 Gelege. Somit produzierten die Kontrollmücken 1,2 Gelege pro Weibchen (1,44 bei 2,5‰), die Mücken bei 7‰ nur 0,43 Gelege pro Weibchen. Aufgrund der Tatsache, dass nur ein Replikat für die Reproduktion angesetzt wurde, konnte keine statistische Überprüfung der vermuteten Signifikanz erfolgen. Der Anteil der unfruchtbaren Gelege schwankte von 7,61% (2,5‰) bis 100% (Abbildung 3.1D). Bei 5‰ waren signifikant mehr Gelege unfruchtbar (38,7%; $p < 0,05$) als bei der Kontrolle (18,1%). Bei 7‰ waren alle Gelege unfruchtbar ($p < 0,01$).

Das Gewicht der männlichen Mücken reichte von 0,302 – 0,400 mg. Die Weibchen waren schwerer mit einem Gewicht von 0,484 – 0,556 mg. Die Männchen waren bei 3‰ signifikant

schwerer (0,400 mg TG; $p < 0,01$) als die Kontrolle (0,367 mg TG) (Abbildung 3.1E). Bei 7‰ waren die Männchen mit 0,302 mg TG signifikant leichter ($p < 0,001$). Generell lagen die Populationswachstumsraten (PWR) zwischen 1,14 und 1,27 d^{-1} (Abbildung 3.1F). Die PWR war bei 5‰ signifikant geringer (1,14 d^{-1} ; $p < 0,01$) als bei der Kontrolle (1,26 d^{-1}). Aufgrund der Tatsache, dass bei 7‰ alle Gelege unfruchtbar waren, wäre eine Freilandpopulation zusammengebrochen (PWR = 0). Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

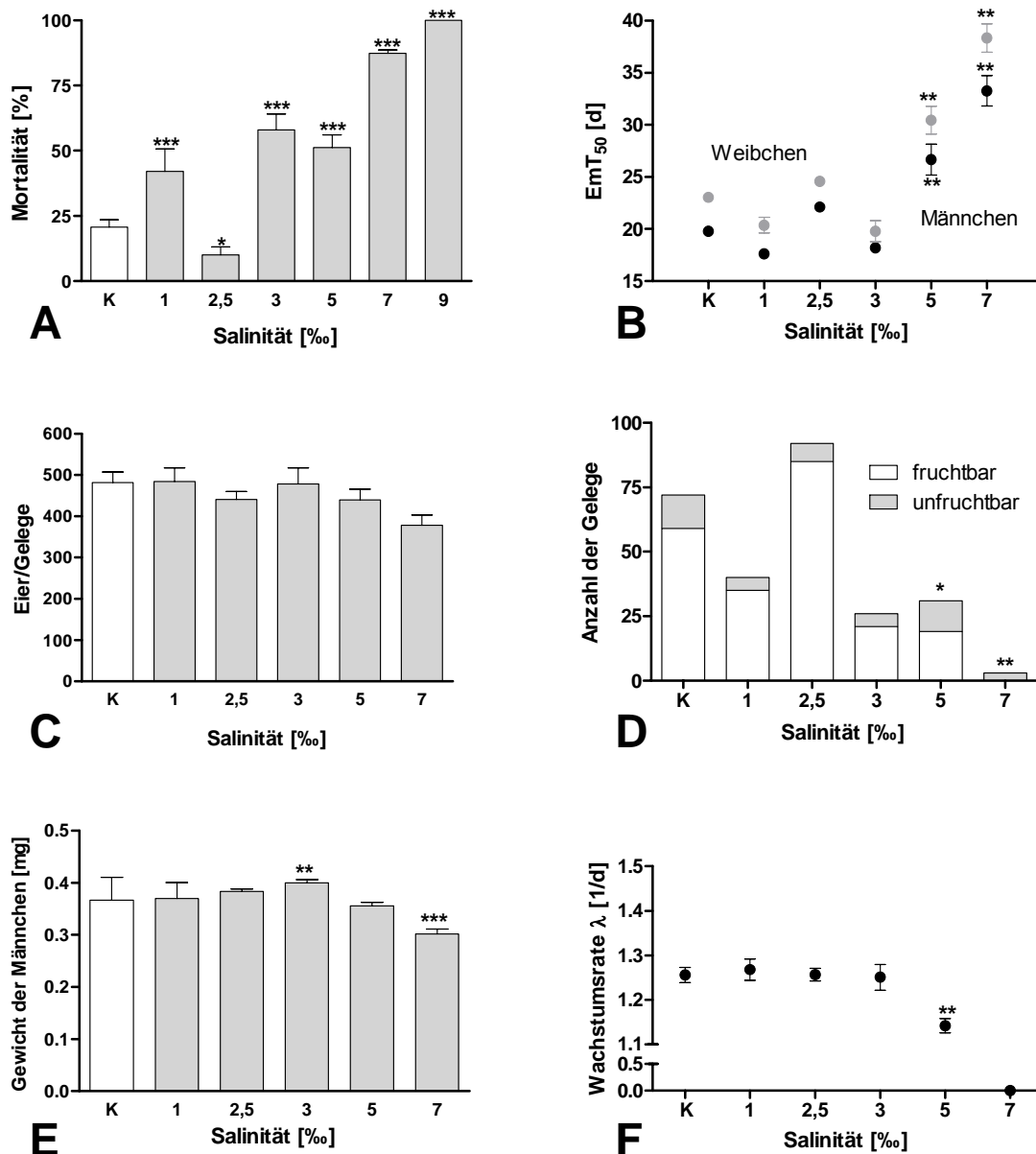


Abb. 3.1: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und verschiedenen Salinitäten. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Gelegegröße, D) Anzahl der Gelege, E) Trockengewicht der Männchen [mg] und F) Populationswachstumsrate λ [d^{-1}]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Temperatur

Die normale Hälterungstemperatur für *C. riparius* im Labor liegt bei 20°C (OECD, 2004a, b). Daher werden die Ergebnisse des Temperaturversuchs bei 14°C und 26°C mit den Resultaten bei 20°C verglichen. Die Daten für 20°C wurden von Christian Vogt (VOGT, 2007) erhoben, der im gleichen Versuchszeitraum bei gleichen Hälterungsbedingungen und mit dem identischen Zuckmückenstamm ebenfalls einen Versuch durchführte.

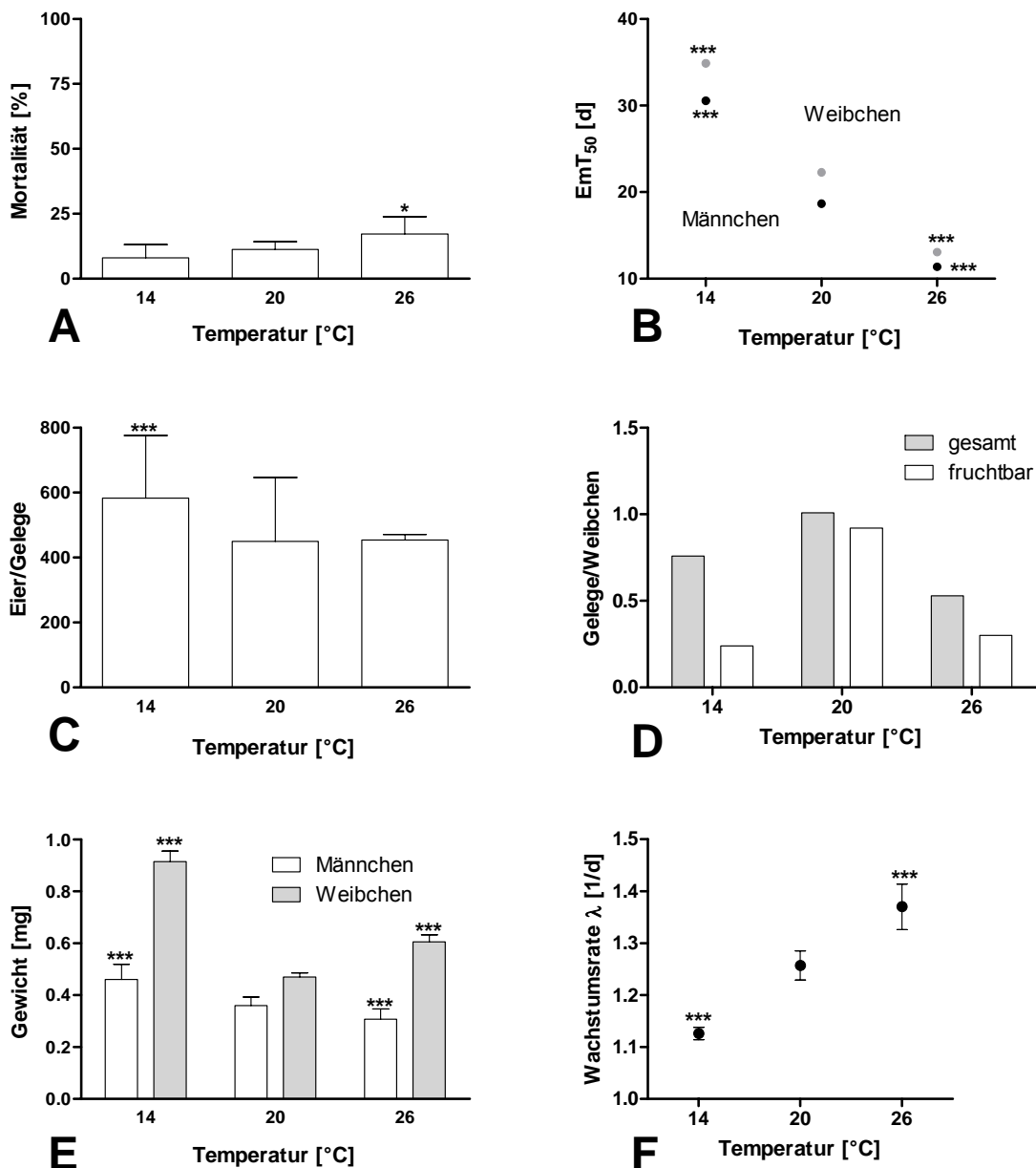


Abb. 3.2: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und verschiedenen Temperaturen. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Gelegegröße, D) Anzahl der Gelege, E) Trockengewicht [mg] und F) Populationswachstumsrate λ [d⁻¹]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Mortalität schwankte von 8,0 – 17,2% (Abbildung 3.2A). Die Sterblichkeitsrate war bei 26 °C signifikant höher (17,2%; $p < 0,05$) als bei 20 °C (11,2%). Die EmT_{50} der Männchen lagen bei 11,4 – 30,6 d und bei den Weibchen bei 13,1 – 34,9 d (Abbildung 3.2B). Die männlichen Mücken schlüpften bei einer Temperatur von 14 °C 11,9 Tage später ($p < 0,001$) und die weiblichen 12,6 Tage später ($p < 0,001$) als bei 20 °C, wohingegen die Männchen bei 26 °C 7,3 Tage und die Weibchen 9,21 Tage früher schlüpften ($p < 0,001$).

Die Anzahl der Eier pro Gelege lag zwischen 451 und 584 (Abbildung 3.2C). Die Gelege waren bei 14 °C signifikant größer ($p < 0,001$) als bei 20 °C. Sowohl bei 14 °C als auch bei 26 °C gab es mehr unfruchtbare Gelege pro Weibchen (Abbildung 3.2D) und im Verhältnis zur Anzahl der fruchtbaren Gelege waren diese Unterschiede signifikant im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,001$).

Das Trockengewicht der männlichen Mücken lag bei 0,308 – 0,460 mg und das der Weibchen bei 0,460 - 0,915 mg TG (Abbildung 3.2E). Die Männchen waren bei 14 °C mit durchschnittlich 0,460 mg TG signifikant ($p < 0,001$) schwerer als bei 20 °C (0,360 mg TG) und bei 26 °C mit 0,308 mg TG signifikant leichter ($p < 0,001$). Die weiblichen Mücken hingegen waren sowohl bei 14 °C (0,915 mg TG) als auch bei 26 °C (0,605 mg TG) signifikant schwerer als bei 20 °C ($p < 0,001$). Die Populationswachstumsrate bei 14 °C war signifikant geringer ($1,13 d^{-1}$; $p < 0,001$) und bei 26 °C signifikant größer ($1,37 d^{-1}$; $p < 0,001$) als bei 20 °C ($1,26 d^{-1}$).

3.1.2 Psychopharmaka

Carbamazepin

Beim mittleren Schlupfzeitpunkt der Männchen, bei der Mortalität, beim Gewicht der Mücken und der Fruchtbarkeit der Gelege gab es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Bei den Parametern, bei denen es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Lösemittelkontrolle gab, wurden diese als Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität im Versuch mit Carbamazepin (CBZ) lag zwischen 4 und 57% und war mit 4% bei 2,5 mg CBZ/kg signifikant ($p < 0,01$) geringer und bei 10 mg CBZ/kg mit 57% signifikant höher ($p < 0,001$) als bei der Kontrolle (18%) (Abbildung 3.3A). Die EmT_{50} der Männchen lagen zwischen 17,5 und 19,3 Tagen und bei den Weibchen zwischen 18,5 und 22,0 Tagen (Abbildung 3.3B). Bis zu einer Konzentration von 2,5 mg CBZ/kg schlüpften die Weibchen

früher, und in den beiden höchsten Konzentrationen später als in der Kontrolle, jedoch war der Effekt nur bei 10 mg CBZ/kg signifikant ($p < 0,01$). Dagegen zeigten die Männchen keine eindeutigen Effekte.

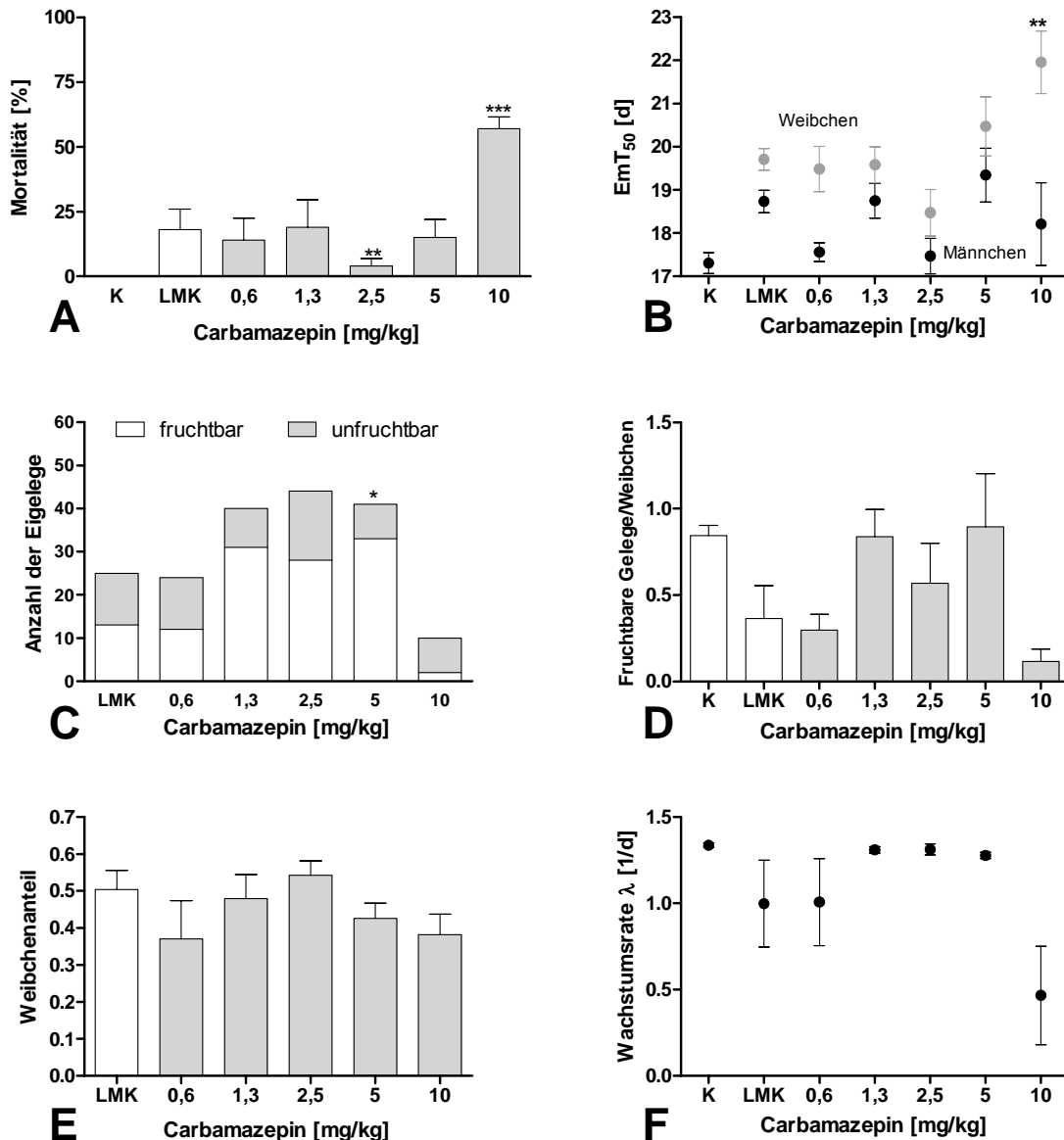


Abb. 3.3: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und Carbamazepin. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Anzahl der Gelege, D) Fruchtbare Gelege pro Weibchen, E) Weibchenanteil und F) Populationswachstumsrate λ [d^{-1}]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der Anteil der unfruchtbaren Eigelege reichte von 19,5 – 80,0% (Abbildung 3.3C). Bei einer Konzentration von 5 mg CBZ/kg war dieser mit 19,5% signifikant geringer ($p < 0,05$) als in der Kontrolle mit 48,0%. Die Zahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen reichte von 0,12 – 0,90 (Abbildung 3.3D). Das Lösemittel hatte im Vergleich zur Kontrolle einen starken

Effekt auf diesen Parameter. Bei den mittleren Konzentrationen von 1,3 – 5 mg CBZ/kg gab es mehr fruchtbare Gelege pro Weibchen (0,84; 0,57 bzw. 0,90) als in der Lösemittelkontrolle (0,36), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Der Weibchenanteil war bei 0,6 mg CBZ/kg geringer als in der Kontrolle, stieg bis auf Kontrollniveau bei einer Konzentration von 2,5 mg CBZ/kg an und sank dann wieder bis 10 mg CBZ/kg (Abbildung 3.3E). In keiner der Behandlungsgruppen lag ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vor. Die PWR (Abbildung 3.3F) lagen bei 0,47 – 1,31 d⁻¹. Bei 10 mg/kg war die PWR signifikant niedriger als in der Kontrolle ($p < 0,05$), aber aufgrund der großen Standardfehler nicht signifikant gegenüber der LMK. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x-Werte berechnet werden.

Fluoxetin

Die Mortalität lag zwischen 0 und 32% und war mit 6% bei 0,2 mg/kg und 32% bei 0,9 mg/kg signifikant höher ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) als bei der Kontrolle (0%) (Abbildung 3.4A).

Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT₅₀) der Männchen lagen zwischen 17,3 und 18,8 Tagen und bei den Weibchen zwischen 19,3 und 21,6 Tagen (Abbildung 3.4B). Bei einer Exposition gegenüber Fluoxetin (FX) schlüpften die männlichen Mücken generell später als in der Kontrolle, und diese Verzögerung war bei 0,4 mg FX/kg mit 18,8 d signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle (17,3 d). Auch bei den weiblichen exponierten Mücken führte Fluoxetin zu einer Schlupfverzögerung, die in den Konzentrationen von 0,4 bis 2,3 mg/kg mit 21,0; 21,6 bzw. 20,9 d gegenüber der Kontrolle (19,3 d) signifikant war ($p < 0,05$).

Der Anteil unfruchtbarer Eigelege schwankte von 9,8% in der Kontrolle bis 41,0% bei einer Konzentration von 0,9 mg FX/kg (Abbildung 3.4C). Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$). Das Trockengewicht der Männchen lag zwischen 0,334 und 0,378 mg. Die Weibchen waren schwerer mit einem Gewicht von 0,375 – 0,628 mg TG (Abbildung 3.4D). Eine Fluoxetinexposition hatte keinen Effekt auf das Trockengewicht bei den männlichen Mücken. Die Weibchen des Ansatzes mit einer Konzentration von 5,9 mg FX/kg waren mit 0,375 mg TG signifikant leichter als die der Kontrolle (0,449 mg TG) ($p < 0,05$), ansonsten waren sie in den anderen Ansätzen stets tendenziell schwerer. In den höheren Konzentrationen (ab 0,9 mg FX/kg) zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Rückgang des Weibchenanteils (Abbildung 3.4E).

Die Populationswachstumsraten (Abbildung 3.4F) lagen bei $1,26 - 1,34 \text{ d}^{-1}$ und zeigten bei $0,9 \text{ mg FX/kg}$ ($1,23 \text{ d}^{-1}$) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle ($1,34 \text{ d}^{-1}$). Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

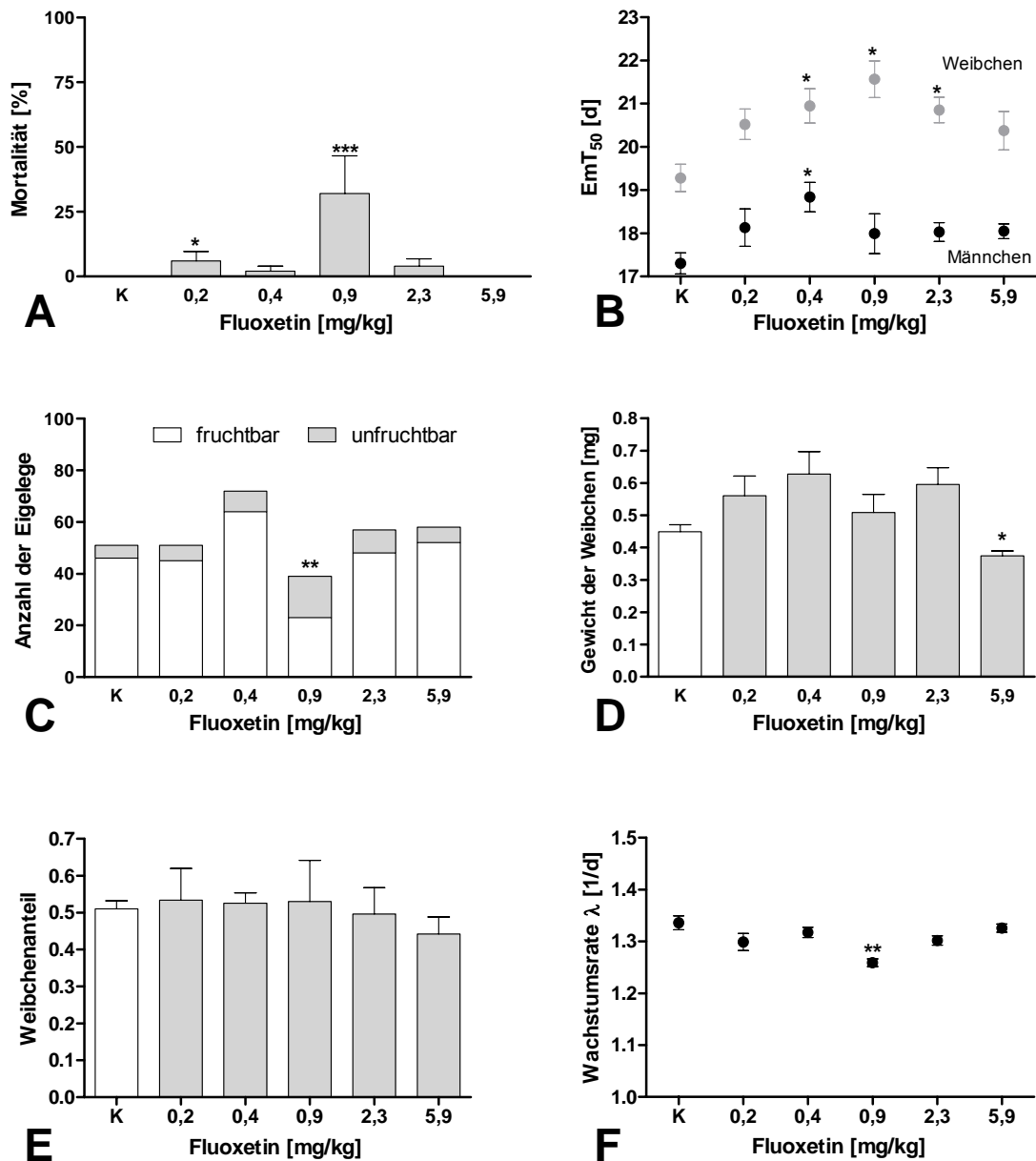


Abb. 3.4: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und Fluoxetin. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Anzahl der Gelege, D) Trockengewicht der Weibchen [mg], E) Weibchenanteil und F) Populationswachstumsrate λ [d^{-1}]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.3 Pestizide

Endosulfan

Beim mittleren Schlupfzeitpunkt der Männchen, bei der Mortalität, der Populationswachstumsrate und der Fruchtbarkeit der Gelege gab es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Bei allen anderen untersuchten Parametern war der Unterschied nicht signifikant. Deshalb wurden bei den Parametern, bei denen es keine signifikanten Unterschiede gab, die Kontrolle und Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Testkonzentrationen von Endosulfan (ES) lagen im Bereich von 4,5 – 450 µg/kg. Die Mortalitäten der Mücken betragen 6 – 29%. Bei 15 µg ES/kg war die Mortalität mit 6% signifikant geringer ($p < 0,01$) als bei der Lösemittelkontrolle (15%). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 19,5 und 20,5 Tagen und bei den Weibchen zwischen 23,0 und 25,0 Tagen. Zwischen der EmT_{50} der Männchen und Weibchen der Kontrolle lagen 3,83 Tage, dies ist aber vergleichbar mit den exponierten Mücken. Generell führte eine Exposition gegenüber Endosulfan zu einem nicht-signifikant verzögerten Schlupf bei beiden Geschlechtern, mit Ausnahme der Weibchen bei 150 µg ES/kg, deren Schlupfzeitpunkt ähnlich wie in der Kontrolle war.

Bei den beiden niedrigsten und auch in der höchsten Konzentration gab es signifikant weniger Gelege pro Weibchen ($p < 0,05$) als in der Lösemittelkontrolle und somit auch signifikant weniger fruchtbare Gelege pro Weibchen. Mit Ausnahme von 45 µg ES/kg produzierten die exponierten Weibchen weniger Gelege, die sich in der Größe jedoch nicht signifikant unterschieden. Die Populationswachstumsraten (PWR) lagen bei 1,19 – 1,25 d^{-1} und waren generell niedriger als in der Lösemittelkontrolle. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

Tributylzinn

Bei allen untersuchten Parametern des Lebenszyklustests war der Unterschied zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle nicht signifikant. Sie wurden deshalb als Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität lag zwischen 1 und 14% und war mit 14% bei 100 µg Sn/kg signifikant höher ($p < 0,01$) als bei der Kontrolle (3%) (Abbildung 3.5A). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 17,5 und 18,4 Tagen und bei den Weibchen zwischen

18,8 und 21,1 Tagen (Abbildung 3.5B). Eine Exposition gegenüber TBT führte zu einer Schlupfverzögerung, die bei den Weibchen stärker ausgeprägt war. Nur bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g Sn/kg}$ war die Verzögerung signifikant gegenüber der Kontrolle ($p < 0,01$).

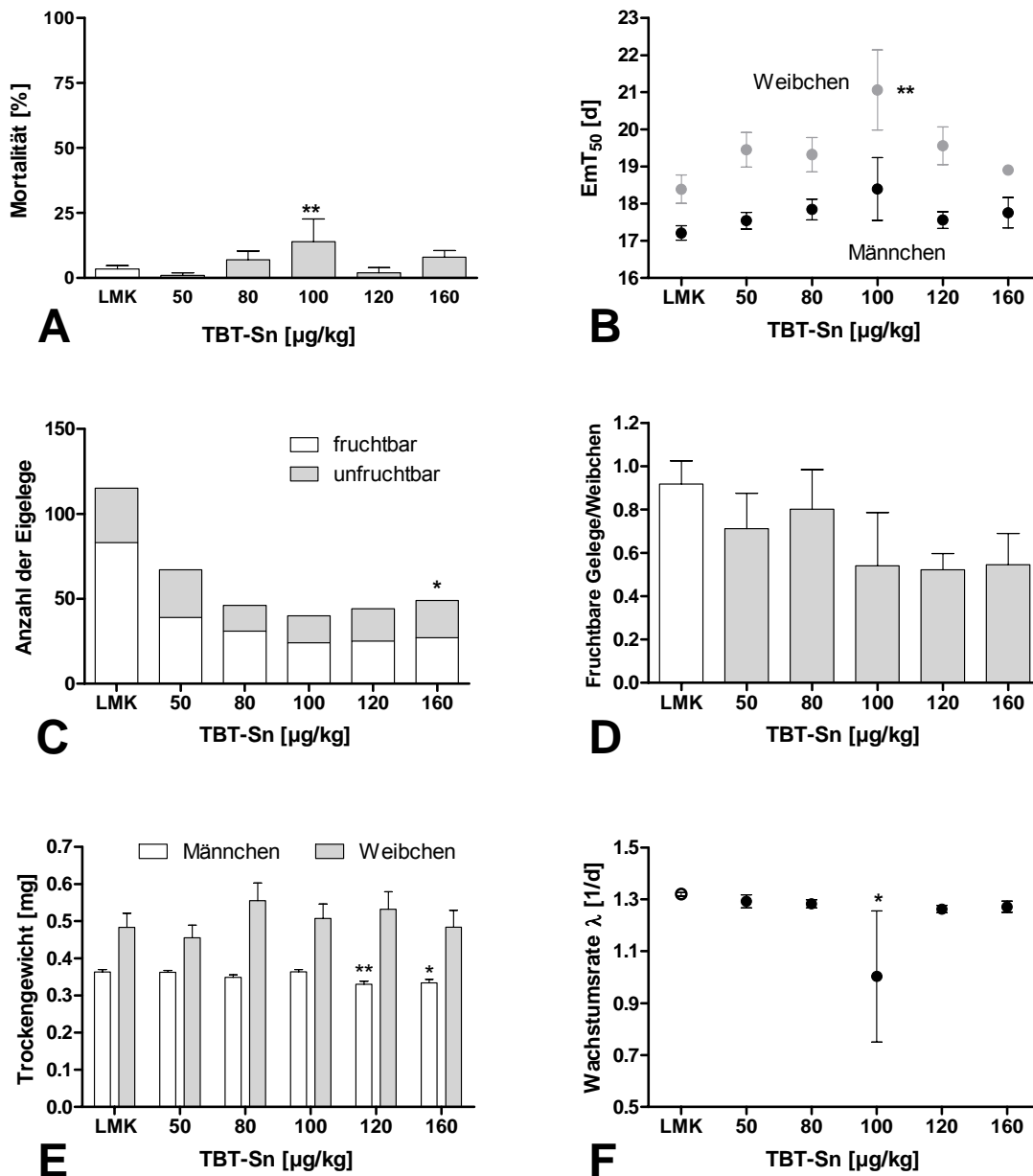


Abb. 3.5: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und Tributylzinn. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Anzahl der Gelege, D) Fruchtbare Gelege pro Weibchen, E) Trockengewicht [mg] und F) Populationswachstumsrate λ [d^{-1}]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die Zahl der Eigelege nahm bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g Sn/kg}$ ab und stieg dann ab 120 $\mu\text{g Sn/kg}$ wieder an (Abbildung 3.5C). Diese Konzentrations-Wirkungs-Beziehung war aber nicht signifikant. Jedoch gab es in der höchsten Konzentration signifikant mehr un-

fruchtbare Gelege als in der Kontrolle ($p < 0,05$). Die exponierten Weibchen produzierten durchweg weniger fruchtbare Gelege als die Kontrolle (Abbildung 3.5D), es gab jedoch keine eindeutige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Das Trockengewicht der Männchen lag bei 0,334 – 0,364 mg und das der Weibchen bei 0,455 – 0,555 mg (Abbildung 3.5E). Die Männchen des Ansatzes mit einer Konzentration von 120 und 160 $\mu\text{g Sn/kg}$ waren mit 0,330 bzw. 0,334 mg TG signifikant leichter ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) als die der Kontrolle (0,363 mg TG). Eine TBT-Exposition hatte keinen Effekt auf das Trockengewicht bei den weiblichen Mücken. Die Populationswachstumsraten (PWR) lagen bei 1,00 – 1,32 d^{-1} (Abbildung 3.5F). In allen Ansätzen war die PWR niedriger als in der Kontrolle, dieser Unterschied war jedoch nur bei 100 $\mu\text{g Sn/kg}$ signifikant ($p < 0,05$). Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

Die Ergebnisse der Analytik sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Bis auf die höchste Konzentration waren die gemessenen Konzentrationen immer niedriger als die nominalen mit Wiederfindungsraten von 18,0 – 74,8%.

Tab. 3.1: Gemessene Tributylzinnkonzentrationen in $\mu\text{g Sn/kg TG}$.
Der prozentuale Anteil ist in Klammern angegeben.

Nominalkonzentration	Monobutylzinn (MBT)	Dibutylzinn (DBT)	Tributylzinn (TBT)	Summe der Organozinnverbindungen (OZV)
LMK	< 1	< 1	< 1	< 1
50	1,82 (12,4)	3,37 (23,1)	9,43 (64,5)	14,62 (100)
80	2,09 (3,16)	3,72 (5,63)	60,3 (91,2)	66,06 (100)
100	1,69 (2,25)	4,08 (5,44)	69,3 (92,3)	75,03 (100)
120	1,55 (1,67)	4,9 (5,27)	86,5 (93,1)	92,93 (100)
160	5,00 (2,58)	9,49 (4,89)	179,5 (92,5)	194,0 (100)

3.1.4 Synthetische Hormone

17 α -Methyltestosteron

Bei den untersuchten Parametern des Lebenszyklustests war der Unterschied zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle nicht signifikant. Sie wurden deshalb als Lösemittelkontrolle zusammengefasst. Dies trifft aber nicht auf das Gewicht der Männchen zu.

Die Mortalität im Lebenszyklustest mit 17 α -Methyltestosteron (MET) lag zwischen 9 und 25% und war mit Ausnahme der höchsten Konzentration signifikant geringer als die Kontrollmortalität ($p < 0,01$, Abbildung 3.6A). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen

lagen zwischen 15,8 und 16,8 Tagen und bei den Weibchen zwischen 16,8 und 18,8 Tagen (Abbildung 3.6B). Zwischen der EmT_{50} der Männchen und Weibchen der Kontrolle lagen 2,23 Tage; dies war mehr als bei den gegenüber MET exponierten Ansätzen. Bei den Weibchen schlüpften die exponierten Mücken mit Ausnahme der Konzentration 9 $\mu\text{g MET/kg}$ signifikant früher ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (18,8 d). Bei allen exponierten Männchen war der Schlupf im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls verfrüht und obwohl bei 3 $\mu\text{g MET/kg}$ ein deutlicher Unterschied zu sehen war, war dieser nicht signifikant.

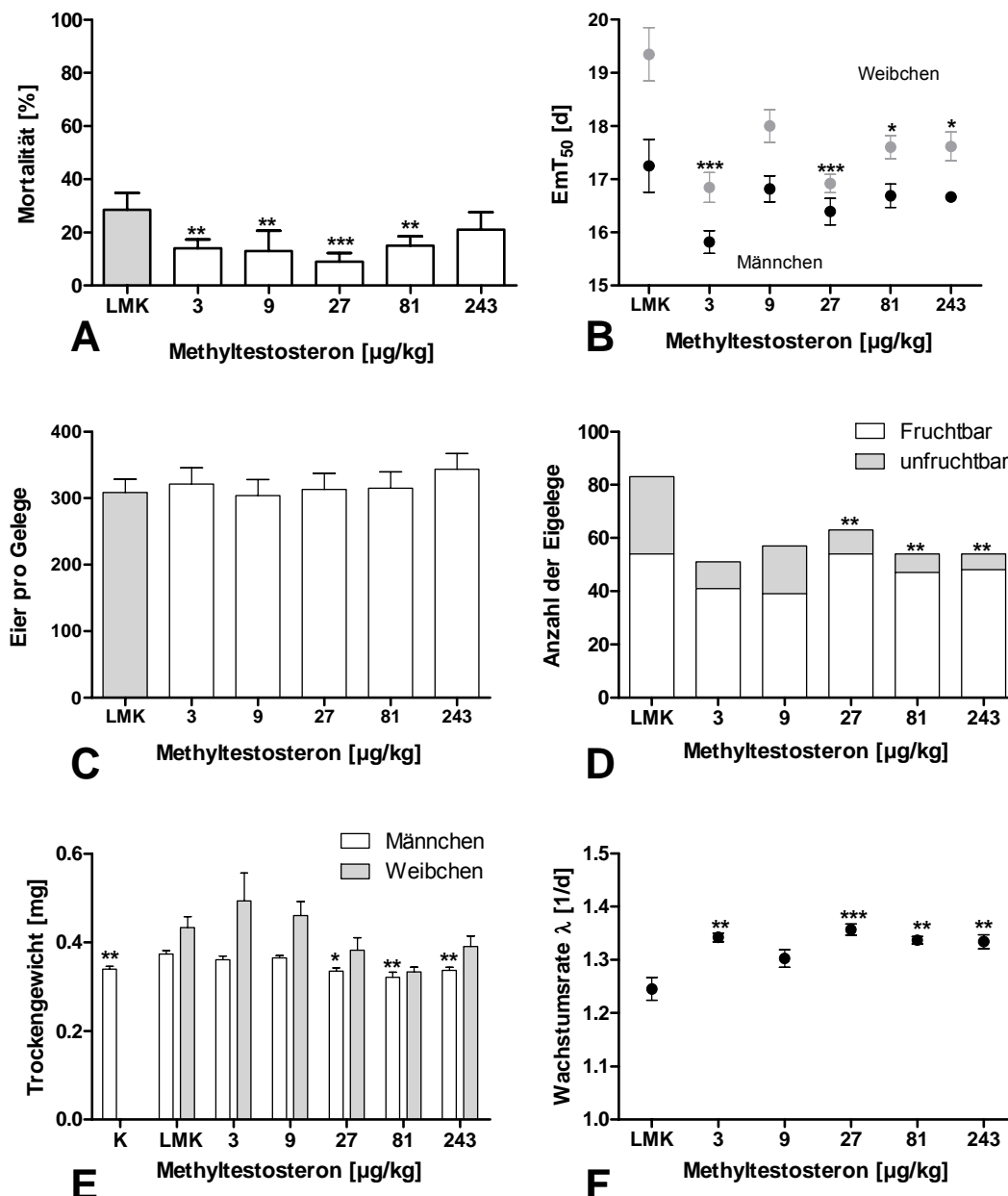


Abb. 3.6: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und 17 α -Methyltestosteron. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Gelegegröße, D) Anzahl der Gelege, E) Trockengewicht der Männchen [mg] und F) Populationswachstumsrate λ [d^{-1}]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Eigelege hatten durchschnittlich 282 – 339 Eier. Mit steigender Konzentration zeigte sich eine leichte Tendenz zu größeren Eigelegen. Diese Konzentrations-Wirkungs-Beziehung war aber nicht signifikant (Abbildung 3.6C). Bei den drei höchsten Konzentrationen (ab 27 µg MET/kg) war der Anteil unfruchtbarer Gelege mit 14,3; 13,0 bzw. 11,1% signifikant geringer ($p < 0,01$) als in der Kontrolle (37,5%; Abbildung 3.6D).

Das Trockengewicht der Männchen lag bei 0,321 – 0,373 mg (Abbildung 3.6E). Die Weibchen waren etwas schwerer mit einem Gewicht von 0,333 – 0,493 mg TG. Die männlichen Mücken der drei höchsten Konzentrationen (27 – 243 µg MET/kg) waren mit 0,335; 0,321 und 0,336 mg TG signifikant leichter ($p < 0,01$) als die der Kontrolle (0,373 mg TG). Die Populationswachstumsraten (Abbildung 3.6F) lagen bei 1,25 – 1,36 d⁻¹. Bei allen Konzentrationen außer 9 µg MET/kg gab es signifikant höhere Wachstumsraten ($p < 0,01$) als in der Kontrolle (1,25 d⁻¹). Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x-Werte berechnet werden.

17α-Ethinylöstradiol

Bei allen untersuchten Parametern gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Deshalb wurden diese als Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität nach einer Exposition gegenüber Ethinylöstradiol (EE₂) lag zwischen 20% und 25% und zeigte bei 27 µg EE₂/kg einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$; Abbildung 3.7A). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT₅₀) der Männchen lagen zwischen 16,2 und 17,1 Tagen und bei den Weibchen zwischen 17,1 und 18,8 Tagen (Abbildung 3.7B). Beide Geschlechter reagierten ähnlich auf eine Exposition gegenüber EE₂: Der mittlere Schlupfzeitpunkt war in den beiden niedrigsten Konzentrationen früher als in der Kontrolle, bei 27 µg EE₂/kg wieder etwa wie in der Kontrolle und in den beiden höchsten Konzentrationen wieder früher als in der Kontrolle. Es zeigten sich signifikante Effekte bei den Weibchen in den Konzentrationen 9; 81 und 243 µg/kg ($p < 0,05$). Auffällig war, dass sich die Schlupfzeitpunkte der Geschlechter mit zunehmender Konzentration sukzessive annäherten.

Der Anteil der unfruchtbaren Eigelege reichte von 14,9 – 36,6% (Abbildung 3.7C). Bei einer Konzentration von 9 µg EE₂/kg war dieser mit 14,9% signifikant geringer ($p < 0,05$) als in der Kontrolle mit 36,6%. Mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration gab es generell mehr fruchtbare Gelege pro Weibchen als in der Kontrolle (Abbildung 3.7D). Das Trockengewicht

der Männchen lag bei 0,356 – 0,381 mg und das der Weibchen bei 0,392 – 0,467 mg (Abbildung 3.7E). Generell waren die exponierten Männchen schwerer als in der Kontrolle. Die Populationswachstumsraten (PWR) lagen bei 1,24 – 1,33 d⁻¹ (Abbildung 3.7F). Bei 9 und bei 243 µg EE₂/kg war die PWR mit 1,33 d⁻¹ signifikant höher (p < 0,05 bzw. p < 0,01) im Vergleich zur Kontrolle (1,24 d⁻¹). Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x-Werte berechnet werden.

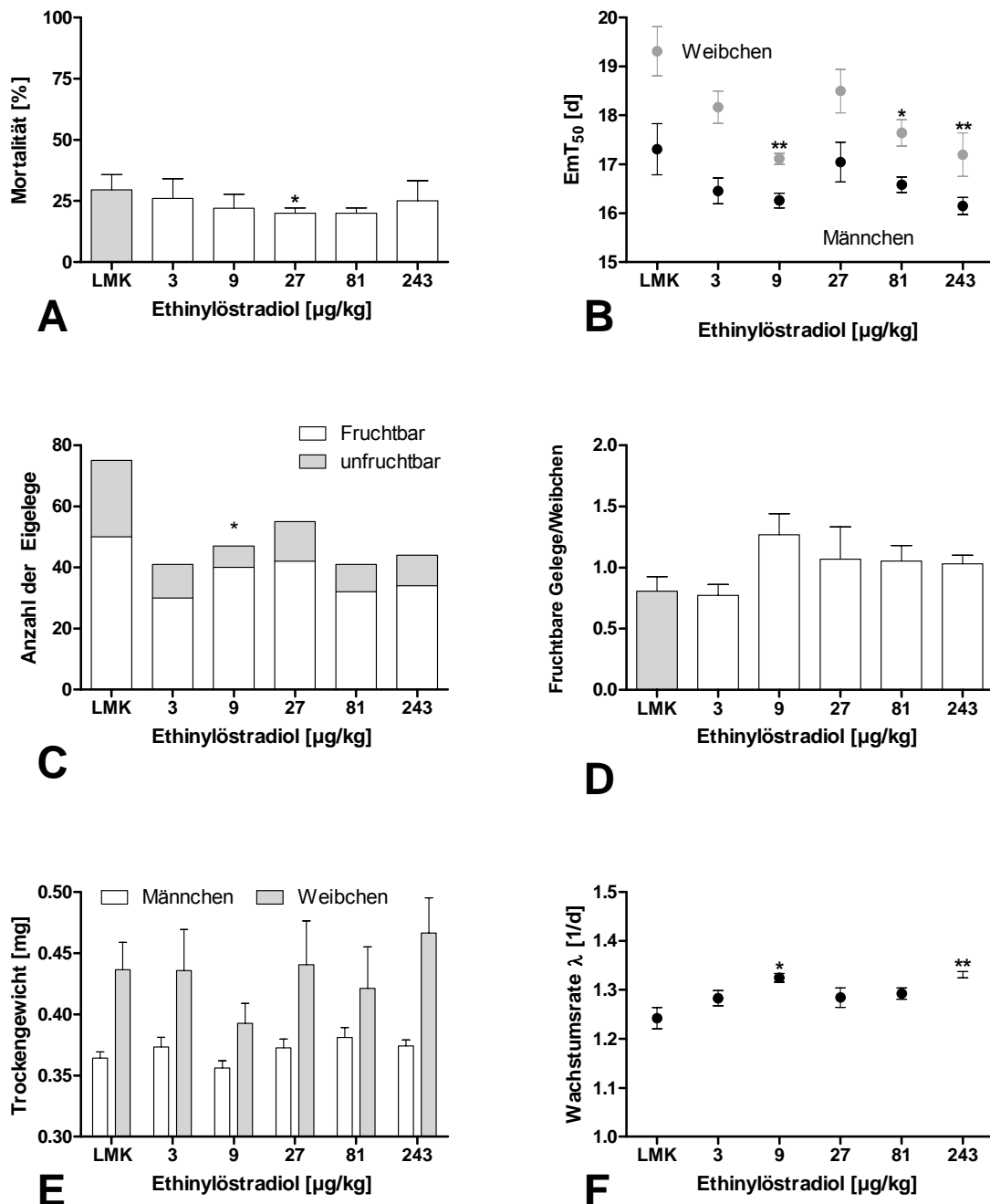


Abb. 3.7: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und 17 α -Ethinylöstradiol. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Anzahl der Gelege, D) Fruchtbare Gelege pro Weibchen, E) Trockengewicht [mg] und F) Populationswachstumsrate λ [d⁻¹]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * p < 0,05, ** p < 0,01.

3.1.5 Insektizide

Methopren

Bei allen untersuchten Parametern, außer beim Trockengewicht der Mücken, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Deshalb wurden die Kontrolle und Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität beim Lebenszyklustest mit Methopren (MP) lag zwischen 7,0 und 27,2%. Bei allen Konzentrationen, außer bei 18 µg MP/kg, war die Mortalität signifikant erhöht (2, 6, 162 µg/kg) oder erniedrigt (54 µg/kg) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 17,2 und 18,0 Tagen und bei den Weibchen zwischen 18,7 und 19,8 Tagen. Bei den drei niedrigsten Konzentrationen schlüpfen die Weibchen früher als in der Kontrolle, die Ergebnisse waren aber nicht signifikant. Bei den Männchen zeigte sich, dass bei einer Exposition gegenüber Methopren der mittlere Schlupfzeitpunkt generell früher als in der Kontrolle war, aber auch hier waren keine Signifikanzen zu berechnen. Auffällig ist die Tatsache, dass es bei der höchsten Konzentration (162 µg MP/kg) signifikant mehr Schlupfunfälle und tote Puppen (3,8; $p < 0,001$) gab als bei der Kontrolle (0,4).

Die Eigelege hatten durchschnittlich 317 – 429 Eier. Ab einer Konzentration von 6 µg/kg zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zu kleineren Gelegen bei steigenden Konzentrationen. Der Anteil unfruchtbarer Eigelege reichte von 19,2 bis 61,5%. Bei 162 µg MP/kg war dieser prozentuale Anteil (61,5%) signifikant größer ($p < 0,01$) als in der Kontrolle (27,0%). Das Gewicht der männlichen Mücken lag bei 0,328 – 0,392 mg. Bei einer Konzentration von 6 µg MP/kg waren die Männchen mit 0,382 mg TG signifikant schwerer ($p < 0,05$) als bei der Kontrolle. Die Weibchen waren schwerer mit einem Gewicht von 0,568 – 0,670 mg TG. Generell waren die Männchen nach einer Exposition gegenüber Methopren schwerer als die der Kontrolle und die Weibchen leichter.

Die Populationswachstumsraten (PWR) lagen zwischen $0,74 d^{-1}$ und $1,31 d^{-1}$. Bei 6 und 162 µg MP/kg war die PWR geringer ($1,04 d^{-1}$ bzw. $0,74 d^{-1}$) als in der Kontrolle ($1,25 d^{-1}$). Durch die hohe Standardabweichung (bedingt durch den Ausfall von Replikaten) war dieses Ergebnis nicht signifikant. Bei den anderen Konzentrationen waren die PWR leicht höher als bei der Kontrolle. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

Luteolin

Bei allen untersuchten Parametern, außer beim Trockengewicht der Männchen, der Mortalität und der Zahl der fruchtbaren Gelege, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Deshalb wurden bei diesen Parametern die Kontrolle und Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität beim Lebenszyklustest mit Luteolin (LU) lag zwischen 7,0 und 31,0%. Bei 2 µg LU/kg war die Mortalität signifikant geringer (7,0%; $p < 0,001$) als die Kontrollmortalität (27,0%). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 21,4 und 23,2 Tagen und bei den Weibchen zwischen 25,2 und 27,6 Tagen. Zwischen der EmT_{50} der Männchen und Weibchen der Kontrolle lagen 3,82 Tage, dies ist aber vergleichbar mit dem Schlupfabstand bei den exponierten Mücken. Die exponierten Weibchen schlüpften ab einer Konzentration von 6 µg LU/kg signifikant später als die Kontrolle, bei den Männchen war der verzögerte Schlupf nur in der niedrigsten und in der höchsten Konzentration signifikant. Bei der höchsten Konzentration (162 µg LU/kg) schlüpften sowohl die Männchen als auch die Weibchen durchschnittlich etwa 2 Tage später ($p < 0,01$).

Die Zahl der Gelege pro Konzentration lag zwischen 29 und 39. Ab einer Konzentration von 18 µg LU/kg nahm die Zahl der Gelege im Vergleich zur Kontrolle (37) stetig bis auf 29 ab. Aufgrund der Tatsache, dass nur ein Reproduktionsbecken pro Konzentration eingesetzt wurde, konnten keine statistischen Berechnungen zur Überprüfung der Signifikanz durchgeführt werden. Das Trockengewicht der männlichen Mücken lag zwischen 0,359 und 0,420 mg und das der Weibchen bei 0,471 – 0,655 mg TG. In den niedrigen Konzentrationen waren die Männchen leichter und ab einer Konzentration von 54 µg LU/kg schwerer im Vergleich zur Kontrolle. Bei 18 µg LU/kg waren die Männchen mit durchschnittlich 0,359 mg TG signifikant leichter ($p < 0,01$) als die männlichen Mücken der Kontrolle mit 0,402 mg TG. Bei 54 µg/kg war der Anteil der Weibchen signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Insgesamt hatte die Exposition gegenüber Luteolin keine Effekte auf die Populationswachstumsrate. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

3.1.6 Schwermetalle

Cadmium

Die Ergebnisse der Analytik von Cadmium sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die nominalen Testkonzentrationen von Cadmium (Cd) waren 0,15 – 2,4 mg/kg. Die gemessenen Konzen-

trationen waren immer geringer als die nominalen Konzentrationen, mit Wiederfindungsra-
ten von 41,3% in der höchsten und 80% in der niedrigsten Konzentration.

Tab. 3.2: Gemessene Cadmiumkonzentrationen in mg/kg TG.

Nominal- konzentration	Gemessene Konzentration	% der Nominal- konzentration
Kontrolle	< 0,05	-
0,15	0,12	80
0,3	0,23	76,7
0,6	0,46	76,7
1,2	0,89	74,2
2,4	0,99	41,3

Die Mortalitäten betragen 1 – 12% und waren mit 12% bei 0,15 und 1,2 mg Cd/kg signifikant höher ($p < 0,05$) als in der Kontrolle (5%). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 17,4 und 18,5 Tagen und bei den Weibchen zwischen 19,2 und 22,3 Tagen. Der Schlupf war bei den Männchen bei einer Exposition gegenüber Cadmium leicht verzögert. Ab der Konzentration von 0,3 mg Cd/kg schlüpften auch die weiblichen Mücken später; diese Verzögerung war bei 1,2 mg Cd/kg (22,0 d; $p < 0,05$) und bei 2,4 mg Cd/kg (22,3 d; $p < 0,01$) signifikant im Vergleich zum Schlupfzeitpunkt der Weibchen der Kontrolle (20,0 d).

Die Eigelege hatten durchschnittlich 374 – 494 Eier. In den beiden niedrigsten Konzentrationen waren die Eigelege mit 494 bzw. 486 Eiern signifikant größer ($p < 0,05$) als die der Kontrolle mit 374 Eiern. Der Anteil unfruchtbarer Eigelege lag im Bereich von 25,0 – 60,7%. Die Mücken produzierten 0,56 – 1,29 Gelege pro Weibchen, wobei die Mücken bei 1,2 mg Cd/kg signifikant weniger Gelege (0,56; $p < 0,05$) produzierten als in der Kontrolle (0,96). Die Zahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen reichte von 0,25 – 0,81. Bei 1,2 mg Cd/kg war die Zahl mit 0,25 signifikant geringer ($p < 0,01$) als in der Kontrolle (0,81). Der Weibchenanteil reichte von 38,4% in der Kontrolle bis 55,6% bei einer Konzentration von 0,6 mg Cd/kg. Dieser Unterschied war leicht signifikant ($p < 0,05$).

Die Darstellung des Gewichts der exponierten Weibchen zeigte eine umgekehrte U-Form. Generell waren die Weibchen mit 0,535 – 0,628 mg Cd/kg schwerer als die Kontrolle (0,505 mg Cd/kg). Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Das Gewicht der Männchen lag bei 0,316 – 0,370 mg Cd/kg; nur bei 0,15 mg Cd/kg waren die Männchen signifikant schwerer als die Kontrolle ($p < 0,001$). Die PWR lagen bei 1,21 – 1,30 d⁻¹ und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungsgruppen. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen war die Berechnung von EC_x -

Werten nicht möglich. Nur für den mittleren Schlupfzeitpunkt der Weibchen war eine EC_{50} (0,53 mg/kg, KI: 0,29 – 0,97 mg/kg) berechenbar.

Blei

Die Ergebnisse der Analytik von Blei sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die nominalen Testkonzentrationen von Blei waren im Bereich von 0,65 – 65 mg/kg. Bei 0,65; 3,25 und 6,5 mg Pb/kg (Nominalkonzentration) war laut Analytik mehr Blei im Sediment als auf Basis der Nominalkonzentration erwartet wurde. Bei 32,5 und 65 mg Pb/kg (Nominalkonzentration) waren nur 58,2 bzw. 66,2% der Nominalkonzentration an Blei im Sediment enthalten. Abzüglich der gemessenen Kontrollkonzentration war nur bei 3,25 mg/kg mehr Blei im Sediment als nominell dotiert wurde.

Tab. 3.3: Gemessene Bleikonzentrationen in mg/kg TG. Die Konzentrationen abzüglich der Kontrollkonzentration sind in Klammern angegeben

Nominalkonzentration	Gemessene Konzentration	% der Nominalkonzentration
Kontrolle	2,4	-
0,65	3,0 (0,6)	461,5 (92,3)
3,25	5,9 (3,5)	181,5 (107,7)
6,5	7,6 (5,2)	116,9 (80,0)
32,5	18,9 (16,5)	58,2 (50,8)
65	43,0 (40,6)	66,2 (62,5)

Die Mortalität (Abbildung 3.8A) lag zwischen 0 und 12% und war mit 12% bei 6,5 mg Pb/kg signifikant höher ($p < 0,05$) als bei der Kontrolle (4%). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen betragen zwischen 16,6 und 17,6 Tagen und bei den Weibchen zwischen 18,3 und 19,3 Tagen (Abbildung 3.8B). Durch die großen Schwankungen innerhalb der Behandlungsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Eine Exposition gegenüber Blei hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Größe der Eigelege (Abbildung 3.8C). Die Zahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen nahm bis zu einer Konzentration von 6,5 mg Pb/kg ab und stieg dann wieder bis zu der höchsten Konzentration (65 mg Pb/kg) an (Abbildung 3.8D). Der Anteil unfruchtbarer Eigelege reichte von 23,1% in der Kontrolle bis 50,0% bei einer Konzentration von 6,5 mg Pb/kg (Abbildung 3.8E). Der erhöhte Anteil unfruchtbarer Gelege war signifikant größer als in der Kontrolle ($p < 0,01$).

Das Trockengewicht der Männchen lag bei 0,330 – 0,359 mg (Abbildung 3.8F). Die Männchen waren bei 0,65 mg Pb/kg mit 0,330 mg TG signifikant leichter ($p < 0,01$) und bei

6,5 mg Pb/kg mit 0,381 mg TG signifikant schwerer ($p < 0,05$) als die der Kontrolle (0,356 mg TG). Die Weibchen waren schwerer mit 0,427 – 0,540 mg TG (Abbildung 3.8F). Bis zu einer Konzentration von 32,5 mg Pb/kg waren die Weibchen tendenziell schwerer als die Kontrolle. Eine Exposition gegenüber Blei hatte keinen Effekt auf die Populationswachstumsraten, die im Bereich von 1,28 – 1,32 d^{-1} lagen. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

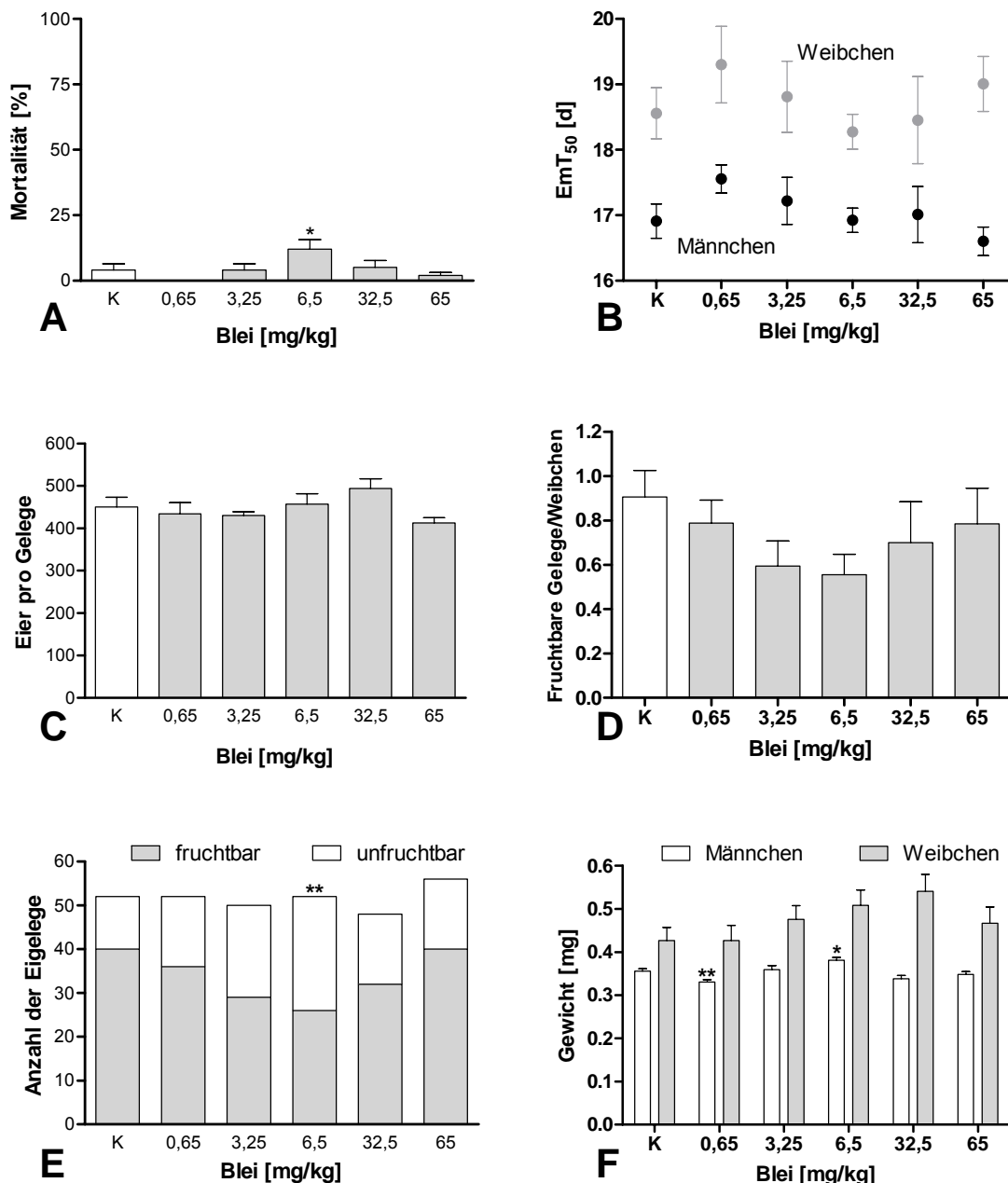


Abb. 3.8: Ergebnisse aus dem Lebenszyklustest mit *Chironomus riparius* und Blei. A) Mortalität [%], B) Mittlerer Schlupfzeitpunkt [d], C) Gelegegröße, D) Fruchtbare Gelege pro Weibchen, E) Anzahl der Gelege und F) Trockengewicht [mg]. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.7 Industriechemikalien

4-Nonylphenol

Bei allen untersuchten Parametern, außer beim Trockengewicht und dem Geschlechterverhältnis, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle und diese wurden deshalb als Lösemittelkontrolle zusammengefasst.

Die Mortalität im Versuch mit 4-Nonylphenol (NP) lag zwischen 7,0 und 15,0% und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den exponierten Mücken und der Kontrolle. Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 16,8 und 17,4 Tagen und bei den Weibchen zwischen 18,7 und 19,8 Tagen. Eine Exposition gegenüber NP führte bei den Weibchen zu nicht-signifikant früheren Schlupfzeitpunkten, wohingegen bei den Männchen keine Effekte auftraten. Alle Eigelegeparameter (Zahl der Gelege, Fruchtbarkeit der Gelege und fruchtbare Gelege pro Weibchen) waren durch die Exposition nicht beeinflusst, nur bei 0,4 mg NP/kg waren die Gelege signifikant größer (499 Eier; $p < 0,05$) als in der Lösemittelkontrolle (398 Eier). Die Zahl der (fruchtbaren) Gelege pro Weibchen war mit 0,658 – 0,884 (0,412 – 0,584) nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (0,903 bzw. 0,622). Das Trockengewicht der männlichen Mücken lag bei 0,331 – 0,346 mg, und bei 10 mg NP/kg waren die Männchen signifikant leichter als in der Kontrolle ($p < 0,05$). Die Weibchen waren schwerer mit einem Gewicht von 0,505 – 0,670 mg TG. Die exponierten Weibchen waren tendenziell leichter als in der Kontrolle. Eine Exposition gegenüber NP hatte keinen Effekt auf die Populationswachstumsrate, die im Bereich von 1,26 – 1,29 d^{-1} lag. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

4-tert-Octylphenol

Der Lebenszyklustest mit 4-tert-Octylphenol (OP) wurde von Maren Heß durchgeführt und die erhobenen Daten zur Verfügung gestellt. Bei allen untersuchten Parametern, abgesehen vom Schlupfzeitpunkt der Weibchen, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Lösemittelkontrolle. Deshalb wurden bei diesen Parametern die Kontrolle und Lösemittelkontrolle zusammengefasst. Die untersuchten Konzentrationen reichten von 0,08 – 50 mg/kg. Die Mortalität lag zwischen 12,5 und 31,3%. Ab 0,4 mg OP/kg war die Mortalität höher als bei der Kontrolle und sank dann bis 50 mg OP/kg stetig. Die Mortalität bei 0,4 mg OP/kg (31,3%) war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (17,5%; $p < 0,05$). Die mittleren Schlupfzeitpunkte (EmT_{50}) der Männchen lagen zwischen 19,2 und 20,7 Tagen und bei den Weibchen zwischen 22,0 und 24,2 Tagen. Obwohl die Weibchen bei

0,4 mg OP/kg etwa 2 Tage früher schlüpften als in der Kontrolle (23,9 d), war dieser Unterschied nicht signifikant. Bei den Männchen hatte OP keinen Effekt auf die EmT_{50} , und bei beiden Geschlechtern waren die Schwankungen innerhalb der Replikate einer Konzentration relativ groß. Auf die Gelegeparameter hatte eine Exposition mit OP keinen Effekt, obwohl die Gelege (359 – 395 Eier) generell kleiner als in der Kontrolle (402 Eier) waren. Die Zahl der (fruchtbaren) Gelege pro Weibchen war mit 0,61 – 1,09 (0,37 – 0,87) nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (1,04). Bei 0,4 mg OP/kg gab es verglichen mit der Kontrolle weniger unfruchtbare Gelege, aber wie auch bei 0,8 mg/kg mit mehr unfruchtbaren Gelegen war der Unterschied nicht signifikant. Eine Exposition gegenüber OP hatte keinen Effekt auf die Populationswachstumsrate, die im Bereich von 1,19 – 1,22 d^{-1} lag. Aufgrund der nicht-monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnten keine EC_x -Werte berechnet werden.

3.1.8 Zusammenfassung

Psychopharmaka

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Carbamazepin (CBZ) und Fluoxetin (FX) in Abbildung 3.9 zeigt, dass die Mortalität bei CBZ in der höchsten Konzentration (K5) und in der mittleren Konzentration von FX signifikant erhöht war (Abbildung 3.9A). Bei der mittleren CBZ- und bei der niedrigsten FX-Konzentration ist die Mortalität signifikant niedriger. Zu beachten ist aber, dass die Konzentrationen von Fluoxetin geringer als die von Carbamazepin sind. Der Abstand zwischen den Schlupfzeitpunkten der Männchen und den Weibchen war bei Fluoxetin größer als bei Carbamazepin (Abbildung 3.9B), was sich aber nicht in der Anzahl der Gelege pro Weibchen niederschlug. Die Effekte der Substanz auf das Gewicht der Weibchen waren bei beiden Substanzen gegenläufig (Abbildung 3.9C). In den ersten vier Konzentrationen waren die gegenüber CBZ exponierten Mücken leichter im Vergleich zur Kontrolle, und in der höchsten Konzentration wieder etwa so schwer wie in der Kontrolle. Bei den gegenüber Fluoxetin exponierten Mücken war dies genau umgekehrt. Die Zahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen war bei FX höher als bei CBZ (Abbildung 3.9D). Die Eigelege der gegenüber CBZ exponierten Mücken waren größer als bei Fluoxetin und zeigten in der Darstellung eine umgekehrte U-Form mit den größten Eigelegen in den mittleren Konzentrationen (Abbildung 3.9E). Bei der Betrachtung der Populationswachstumsrate (Abbildung 3.9F) ist festzustellen, dass die Wachstumsrate bei der mittleren FX-Konzentration signifikant und in der höchsten CBZ-Konzentration deutlich erniedrigt war (zur Signifikanz siehe auch Kapitel 3.1.2).

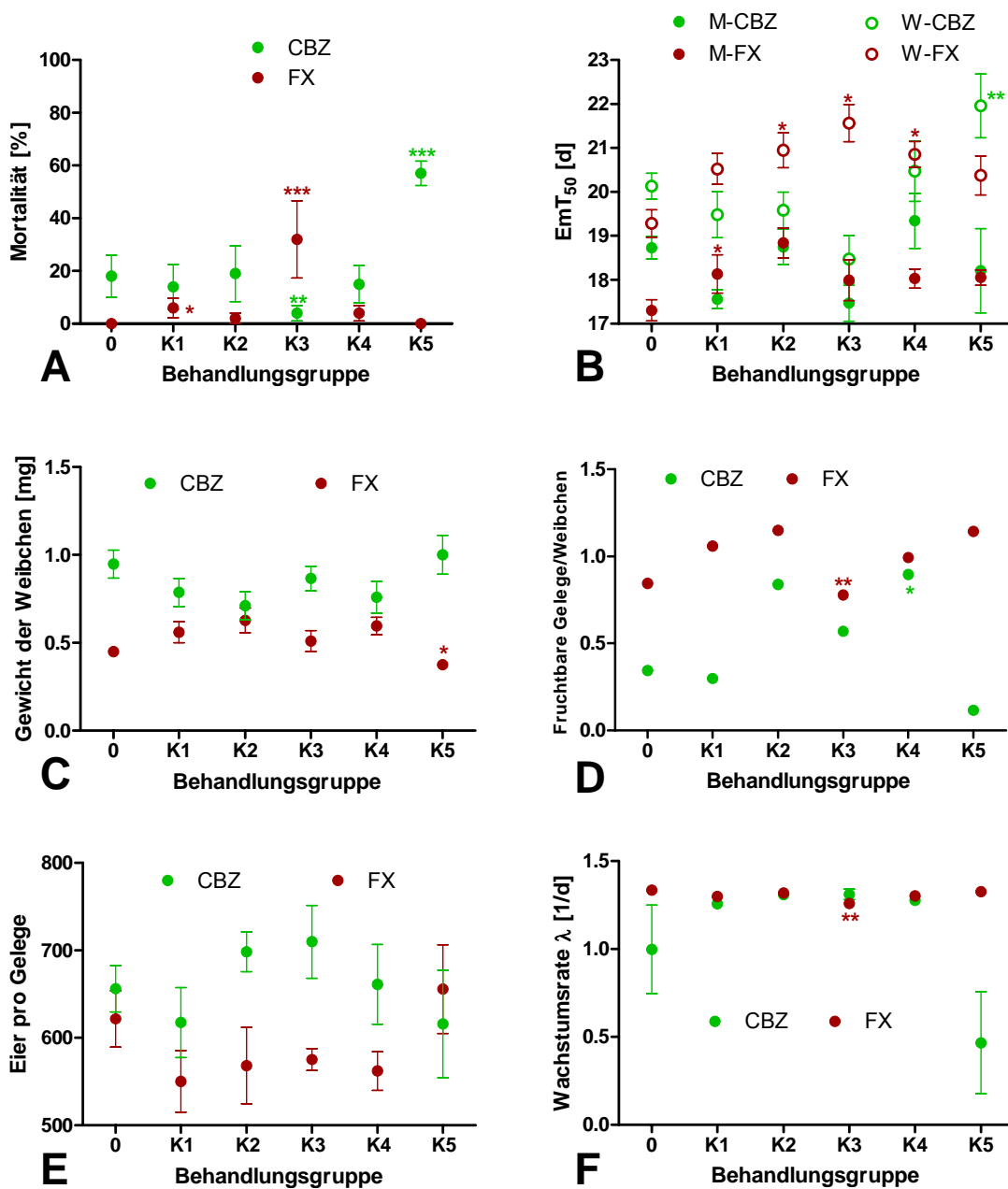


Abb. 3.9: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber Psychopharmaka. Die Konzentrationen (K1-K5) für Carbamazepin (CBZ) sind 0,6; 1,3; 2,5; 5 und 10 mg/kg und für Fluoxetin (FX) 0,2; 0,4; 0,9; 2,3 und 5,9 mg/kg. M = Männchen, W = Weibchen. 0 = (zusammengefasste) Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 5$.

Pestizide

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Endosulfan (ES) und Tributylzinn (TBT) in Abbildung 3.10 zeigt, dass beide Substanzen signifikante, aber vernachlässigbare Effekte auf die Mortalität hatten (Abbildung 3.10A). Zu beachten ist aber, dass die beiden niedrigsten Konzentrationen von Endosulfan geringer als die von TBT sind, und dass die höchste ES-Konzentration sehr viel höher ist als die von TBT. Der Abstand zwischen den Schlupfzeitpunkten der Männchen und Weibchen war bei ES deutlich größer als bei TBT (Abbildung 3.10B). Im Vergleich zur Exposition mit Endosulfan hatte TBT stärkere Effekte auf das Gewicht der Männchen, mit signifikant leichteren Männchen in den beiden höchsten Konzentrationen (Abbildung 3.10C). Der größere Abstand der EmT_{50} bei den gegenüber ES exponierten Tiere schien keine Effekte auf die Eigelegeparameter zu haben (Abbildung 3.10D und 3.10E). Eine Exposition der Mücken führte bei beiden Substanzen zu einer verringerten Anzahl an fruchtbaren Gelegen pro Weibchen. Beide Substanzen führten zu einer Verringerung der Populationswachstumsrate in allen Konzentrationen (Abbildung 3.10F).

Synthetische Hormone

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 17 α -Methyltestosteron (MET) und 17 α -Ethinylöstradiol (EE_2) in Abbildung 3.11 zeigt, dass beide Substanzen ähnliche, aber keine negativen Effekte auf die Mortalität hatten (Abbildung 3.11A). Das Emergenzmuster der Männchen und Weibchen war, wie bei der Mortalität, für beide Substanzen ähnlich (Abbildung 3.11B). Der Schlupfabstand zwischen den Geschlechtern war bei MET viel geringer als bei EE_2 . Die männlichen Mücken reagierten im Vergleich zu EE_2 empfindlicher auf eine Exposition gegenüber MET und waren in den drei höchsten Konzentrationen signifikant leichter als in der Kontrolle (Abbildung 3.11C). Die Effekte auf das Trockengewicht waren bei MET genau gegenläufig zu den Effekten, die durch eine EE_2 -Exposition induziert wurden. Eine Exposition gegenüber MET führte zu deutlich mehr fruchtbaren Eigelegen pro Weibchen als die Exposition gegenüber EE_2 (Abbildung 3.11D). Aufgrund der hohen Standardabweichungen gab es bei der Eigelegegröße (Abbildung 3.11E) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Mit zunehmender EE_2 -Konzentration werden die Eigelege tendenziell größer, wohingegen sie bei höheren MET-Konzentrationen (27 und 81 $\mu\text{g}/\text{kg}$) kleiner als die Kontrolle sind. Die Populationswachstumsraten der exponierten Mücken waren deutlich höher als die der Kontrolle, mit wiederum höheren, signifikanten Effekten bei allen Konzentrationen von Methyltestosteron sowie bei 9 und 243 $\mu\text{g } EE_2/\text{kg}$ (Abbildung 3.11F).

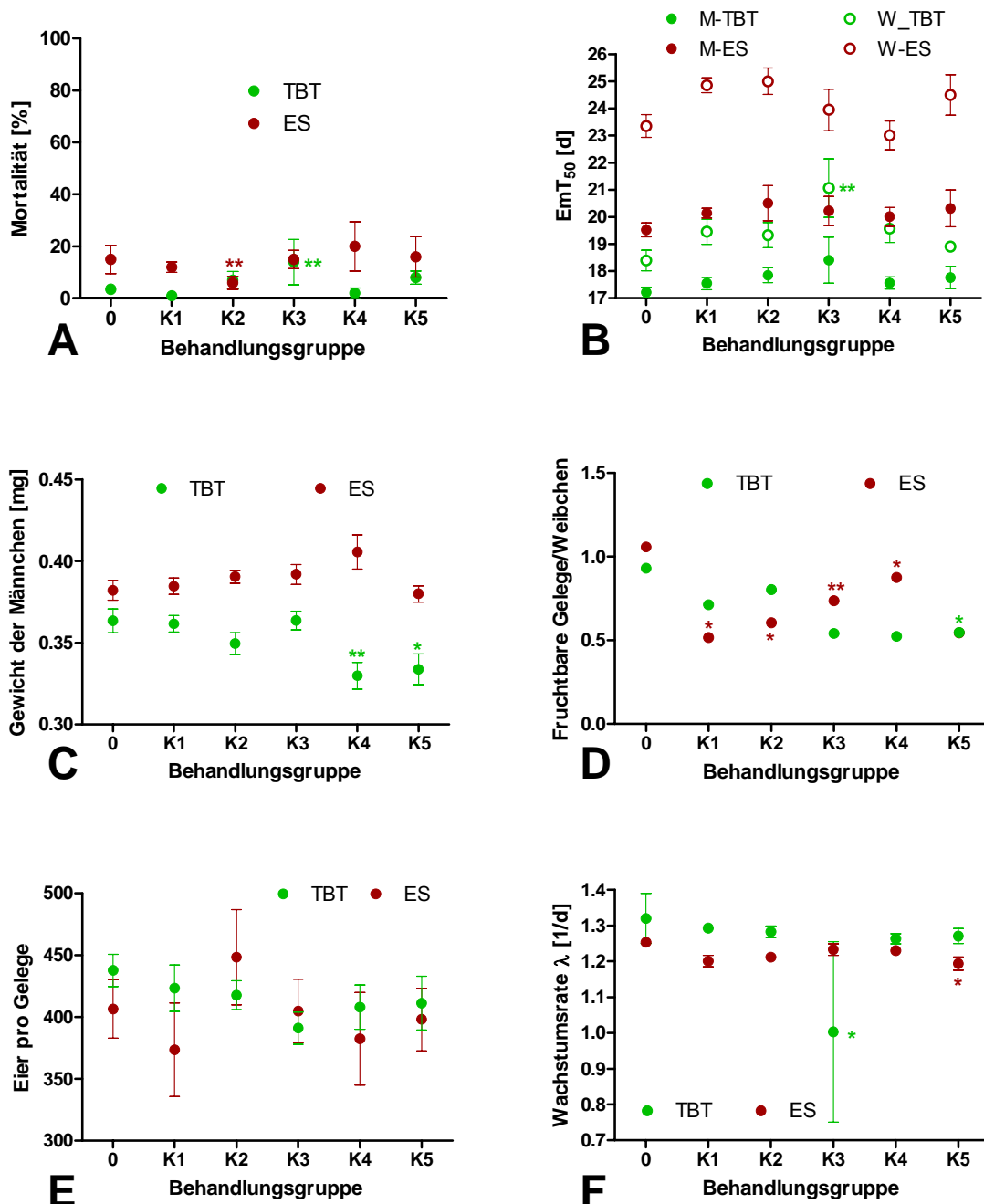


Abb. 3.10: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber Pestiziden. Die Konzentrationen (K1-K5) für Tributylzinn (TBT) sind 50; 80; 100; 120 und 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für Endosulfan (ES) 4,5; 15; 45; 150 und 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$. M = Männchen, W = Weibchen. 0 = (zusammengefasste) Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 5$.

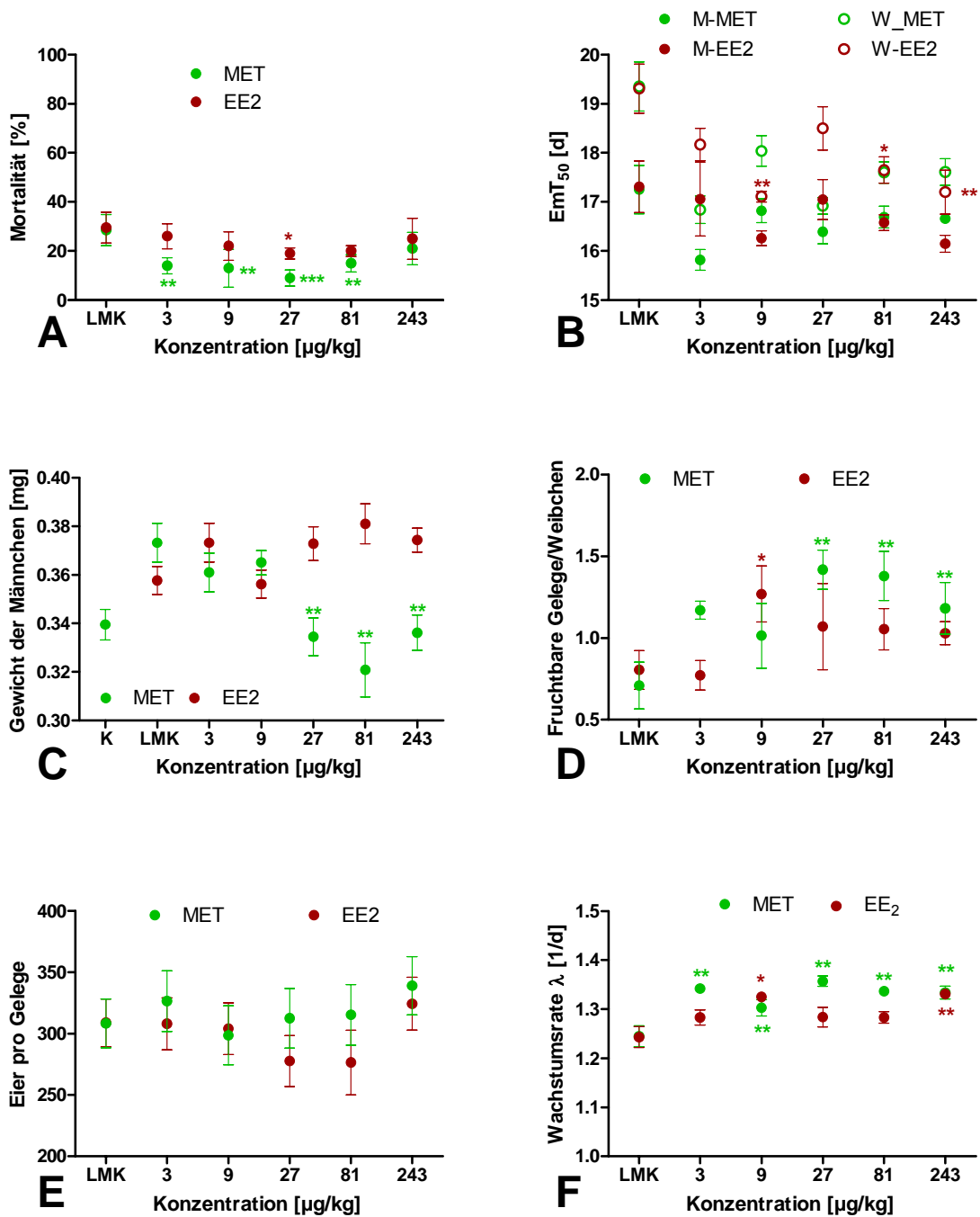


Abb. 3.11: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber synthetischen Hormonen (EE₂ = 17 α -Ethinylöstradiol, MET = 17 α -Methyltestosteron). M = Männchen, W = Weibchen. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, n = 5.

Insektizide

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Methopren (MP) und Luteolin (LU) in Abbildung 3.12 zeigt, dass beide Substanzen geringe Effekte auf die Mortalität hatten (Abbildung 3.12A). Die Substanzeffekte auf die Mortalität waren bei beiden Substanzen gegenläufig.

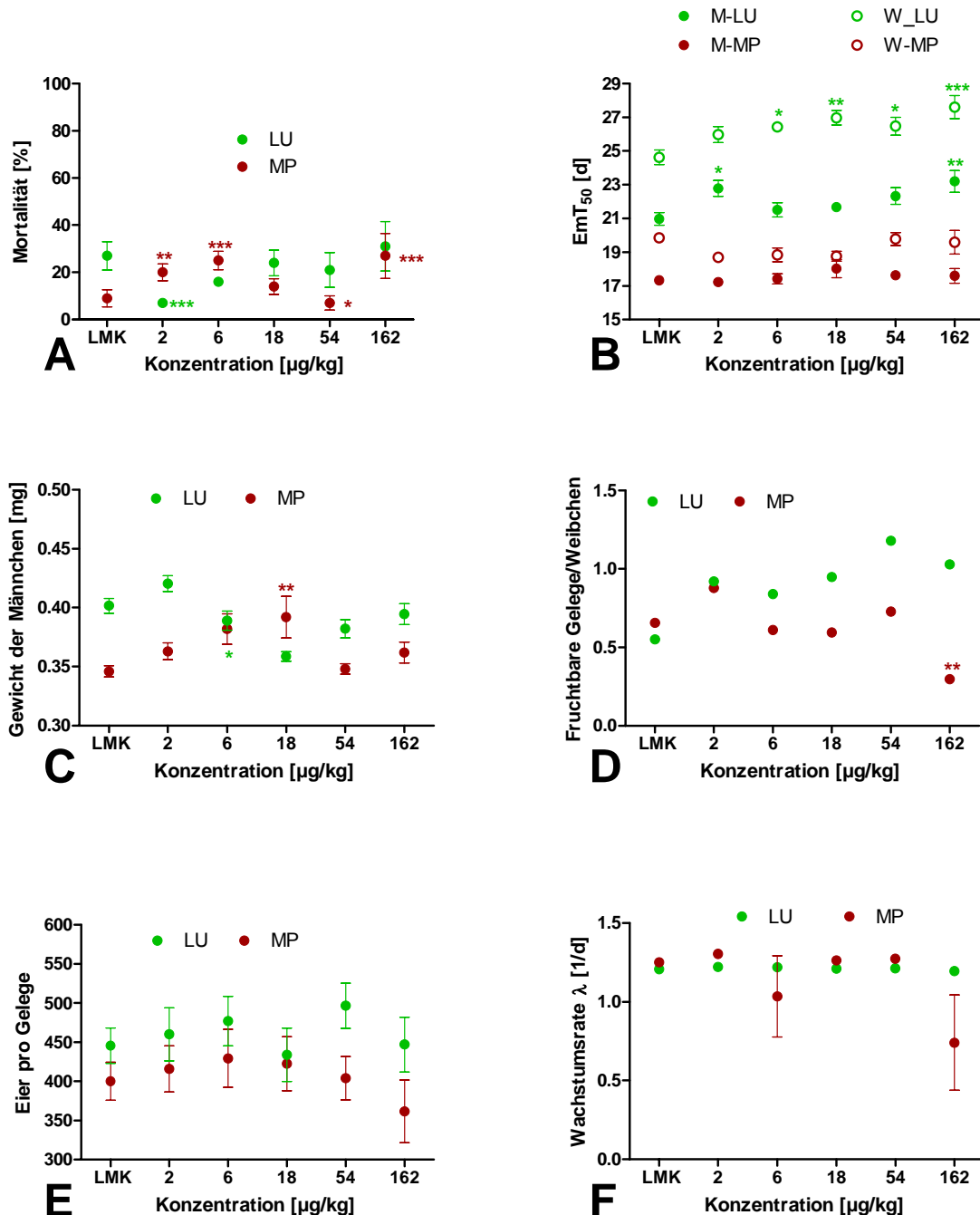


Abb. 3.12: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber Insektiziden (LU = Luteolin, MP = Methopren). M = Männchen, W = Weibchen. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, n = 5.

In den zwei niedrigsten MP-Konzentrationen und in der höchsten Konzentration war die Mortalität gegenüber der Kontrolle erhöht, bei 18 und 64 µg MP/kg auf oder unter Kontrollniveau. Bei der Exposition gegenüber Luteolin war dies umgekehrt. Die Emergenz im Versuch mit Luteolin war generell später als bei Methopren (Abbildung 3.10B), der Schlupfzeitpunkt der beiden Geschlechter war aber bei Methopren nicht sehr unterschiedlich. Die Effekte der beiden Insektiziden auf das Trockengewicht der männlichen Mücken waren vergleichbar (Abbildung 3.12C). Die Mücken, die gegenüber MP exponiert wurden, produzierten im Vergleich zu Luteolin weniger fruchtbare Eigelege pro Weibchen, das Effektmuster war bei beiden Substanzen wiederum gleich (Abbildung 3.12D). Bei den beiden höchsten MP-Konzentrationen waren die Eigelege kleiner als die der Kontrolle und auch kleiner als bei Luteolin (Abbildung 3.12E). Abgesehen von der höchsten MP-Konzentration waren die Populationswachstumsraten bei beiden Versuchen vergleichbar (Abbildung 3.12F).

Schwermetalle

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Blei (Pb) und Cadmium (Cd) in Abbildung 3.13 zeigt, dass beide Substanzen vernachlässigbare Effekte auf das Überleben hatten (Abbildung 3.13A). Die Substanzeffekte auf die Mortalität waren bei beiden Substanzen gegenläufig. In den zwei niedrigsten Cd-Konzentrationen und in der zweithöchsten Konzentration war die Mortalität gegenüber der Kontrolle erhöht, und bei 0,6 und 1,2 mg Cd/kg war die Mortalität auf Kontrollniveau. Bei der Exposition gegenüber Blei war dies umgekehrt. Zu beachten ist aber, dass die Konzentrationen von Cadmium geringer als die von Blei waren. Verglichen mit dem Bleiversuch schlüpfen die Mücken im Cadmiumversuch später (Abbildung 3.13B). Die Schlupfzeitpunkte der gegenüber Blei exponierten Männchen und Weibchen lagen recht nah beieinander, erst in der höchsten Konzentration vergrößerte sich der Abstand. Bei Cadmium vergrößerte sich der Abstand zwischen der EmT_{50} der beiden Geschlechter mit zunehmender Konzentration schon ab 0,3 mg/kg. Höhere Metallkonzentrationen verringerten die Zahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen gegenüber der Kontrolle, mit einem signifikanten Unterschied bei der zweithöchsten Cd-Konzentration (Abbildung 3.13C). Die Effekte der Schwermetalle auf die Mücken waren bezogen auf das Gewicht der Weibchen ähnlich (Abbildung 3.13D). Die Mücken reagieren anscheinend empfindlicher auf Blei (geringeres Gewicht). Im Vergleich zu Blei schien Cadmium einen fördernden Effekt auf die Eigelegegröße zu haben, jedoch ist auffällig, dass die Eigelege der Kontrolle deutlich kleiner als die der Kontrolle aus dem Bleiversuch waren (Abbildung 3.13E). Bezogen auf die Populationswachstumsrate gab es auch keine größeren Unterschiede zwischen Cadmium und Blei (Abbildung 3.13F). In der zweithöchsten Konzentration im Cadmiumversuch war die PWR leicht erniedrigt.

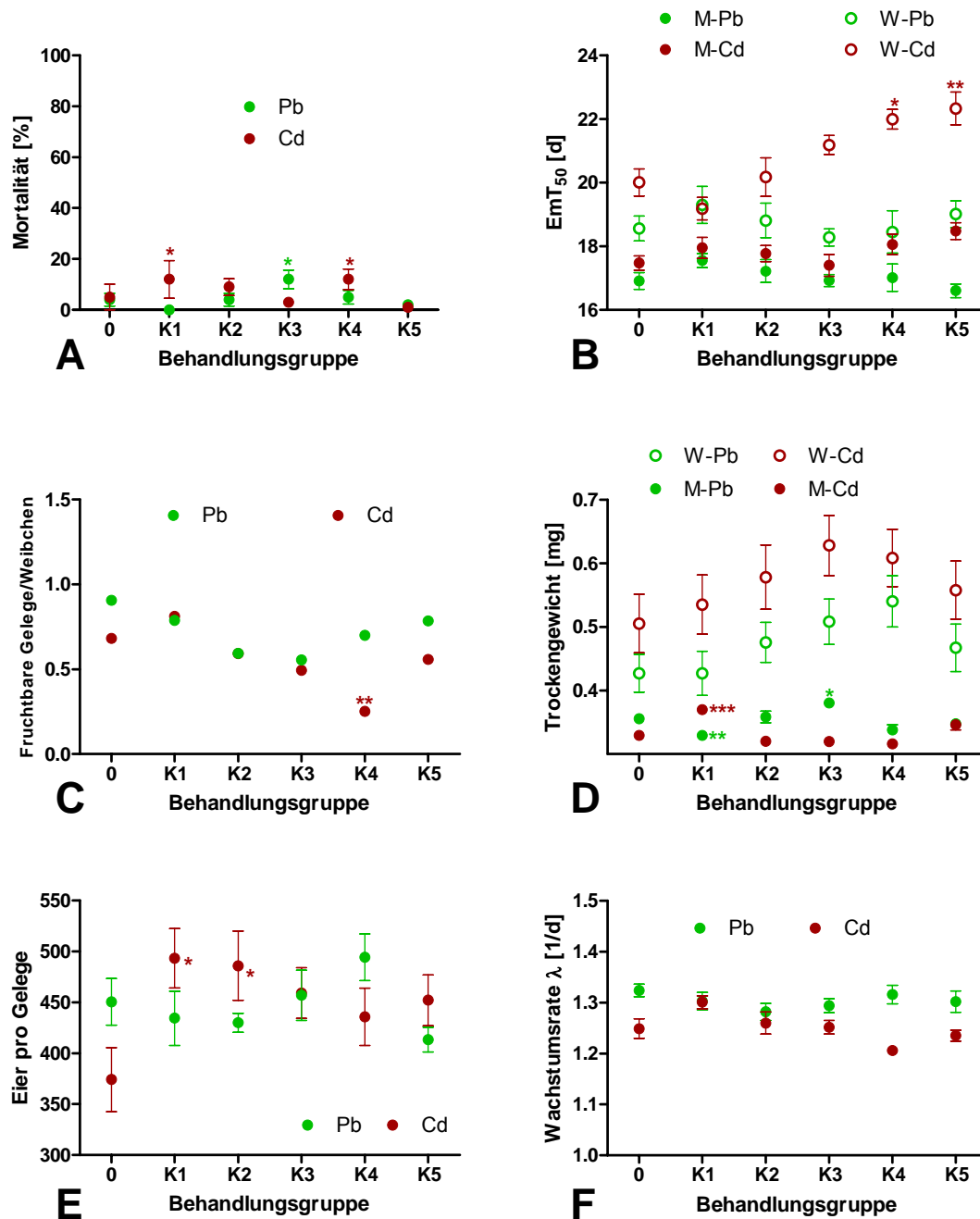


Abb. 3.13: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber Schwermetallen (Pb = Blei, Cd = Cadmium). M = Männchen, W = Weibchen. Die Konzentrationen (K1-K5) für Pb sind 0,65; 3,25; 6,5; 32,5 und 65 mg/kg und für Cd 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 und 2,4 mg/kg. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 5$.

Industriechemikalien

Der Vergleich der Ergebnisse von 4-Nonylphenol (NP) und 4-tert-Octylphenol (OP) zeigt, dass beide Substanzen vernachlässigbare Effekte auf das Überleben hatten (Abbildung 3.14A). Die Emergenz bei OP war generell später als bei NP (Abbildung 3.14B), die EmT_{50} der beiden Geschlechter lag aber bei NP dichter zusammen als bei OP.

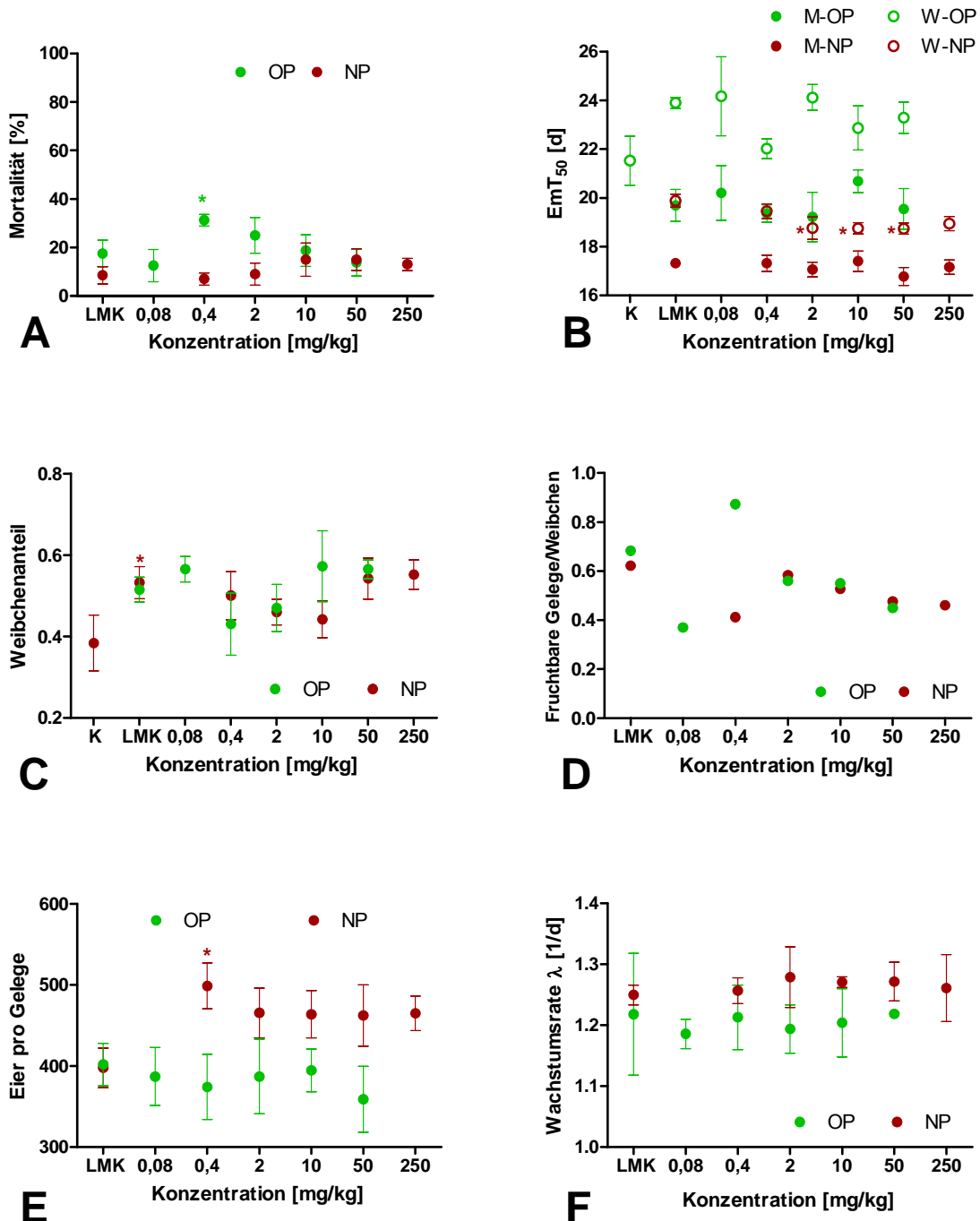


Abb. 3.14: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer Exposition von *Chironomus riparius* gegenüber Industriechemikalien (NP = 4-Nonylphenol, OP = 4-tert-Octylphenol). M = Männchen, W = Weibchen. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler, * $p < 0,05$, $n = 4-5$.

Beide Substanzen hatten keine Effekte auf das Geschlechterverhältnis (Abbildung 3.14C). Bei Konzentrationen von 2 bis 50 mg/kg produzierten die Weibchen ähnlich viele fruchtbare Gelege (Abbildung 3.14D). Die Eigelege waren nach einer Exposition gegenüber NP größer als in der Kontrolle, bei OP jedoch kleiner (Abbildung 3.14E). Die Exposition gegenüber OP führte zu einer geringeren Populationswachstumsrate im Vergleich zu NP (Abbildung 3.14F).

3.2 Molekularbiologische Untersuchung

3.2.1 Tributylzinn

26 Klone, die nach der Datenbankrecherche für 25 Gene stehen, wurden bei den *Chironomus*-Larven nach einer Exposition gegenüber 50 µg Sn/kg differentiell reguliert (mindestens 1,8-fach gegenüber der Kontrolle). Davon waren zwölf Gene überexprimiert, zwölf wurden reprimiert, und die NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5 zeigte sowohl eine Überexpression als auch eine Repression. Für fünf Gene fand sich bei der Annotationsuche keine Übereinstimmung mit in der Datenbank hinterlegten Sequenzen. Von diesen fünf waren drei überexprimiert. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der Proteinrecherche mit den biologischen Prozessen und den molekularen Funktionen aufgeführt. Der Großteil der Gene, die beim Zellwachstum, Proteinmetabolismus oder auch beim Sauerstofftransport eine Rolle spielen, wurden überexprimiert (Tabelle 3.4). Die Gene der Signaltransduktion, der DNA-Synthese und des Energiemetabolismus wurden überwiegend reprimiert. Die meisten Proteine mit einem sicheren Erwartungswert ($E > 10^{-10}$) spielen im Energiestoffwechsel (26,3%) und beim Sauerstofftransport (21,1%) eine Rolle.

3.2.2 Blei

Eine Exposition gegenüber 2,5 mg Pb/kg führte bei den Larven zu der differentiellen Expression von insgesamt 24 Klonen (17 Gene) stehen. Davon zeigten 13 Gene eine Überexpression, fünf wurden reprimiert (Tabelle 3.5). Für zwei Gene fand sich bei der Annotationsuche keine Übereinstimmung mit in der Datenbank hinterlegten Sequenzen, und bei drei weiteren war der Erwartungswert zu gering. Mit einer Ausnahme wurden alle Proteine mit unbekannter Funktion exprimiert, auch alle Globine zeigten eine Überexpression. Der am häufigsten beeinflusste biologische Prozess der Proteine mit einem sicheren Erwartungswert ist der Sauerstofftransport (57,9%).

Tab. 3.4: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Tributylzinn. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
04_H05	Alpha-Tubulin	<i>Chironomus tentans</i>	$9 \cdot 10^{-131}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	Strukturelle molekulare Aktivität, GTP-Bindung
06_D06	CG30463-PA, Isoform A	<i>Drosophila melanogaster</i>	$2 \cdot 10^{-42}$	↑	Proteinmetabolismus	Glykolysierung
08_B02	Tetraspanin	<i>Aedes aegypti</i>	$8 \cdot 10^{-32}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	Proteinbindung, Membranproteinsignalgebung, Zellproliferation, Zellbeweglichkeit
06_H05 PCR	Ribonucleotid-Reduktase	<i>A. aegypti</i>	$4 \cdot 10^{-110}$	↓	DNA-Synthese, DNA-Replikation	ATP-Bindung, Nukleotidbindung, Oxidoreduktase
C1_2_12_G05	ATP Synthase f0 Untereinheit		$1 \cdot 10^{-32}$	↓	Energiemetabolismus	ATP-Synthese verbundener Elektronentransport
E5_1_06/1_A11	60S Ribosomales Protein L23	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-65}$	↓	Proteinmetabolismus	RNA-Bindung, struktureller Konstituent der Ribosome, Translation
E5_1_07/1_C07	18 Wheeler	<i>D. melanogaster</i>	$3 \cdot 10^{-10}$	↓	Zellwachstum und Zytoskelett	Transmembranrezeptoraktivität
E5_1_08/1_E11	Peritrophinähnliches Protein 3	<i>Ctenocephalides felis</i>	0,016	↓	Chitinmetabolismus	Chitinbindung
F3_1_01_D09	Esterase		$3 \cdot 10^{-11}$	↑	Energiemetabolismus	Hydrolyse
F3_1_03_C04	UDP-Glykolyse-Pyrophosphorylase	<i>A. aegypti</i>	$2 \cdot 10^{-70}$	↓	Energiemetabolismus	Glykogensynthese
M5_1_09/1_A05	Globin CTT-VI	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-76}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport

Tab. 3.4: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Tributylzinn. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
M5_1_09/1_A06	CG34398-PA, Isoform A	<i>D. melanogaster</i>	1,5	↓	Unbekannt	Unbekannt
M5_1_10/1_E02	Kalziumtransportierende ATPase (Kalziumpumpe)	<i>A. aegypti</i>	$5 \cdot 10^{-27}$	↓	Signaltransduktion	Transmembrantransport, ATP-Bindung, Ionen-transport
M5_1_10/1_E04	Kutikulaprotein ACP65A	<i>D. melanogaster</i>	$7 \cdot 10^{-21}$	↓	Unbekannt	Struktureller Konstituent der Kutikula, Nukleinsäurebindung
Pb2_3_11_E09	Globin CTT-VIIB-6	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-51}$	↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
Pb2_3_18_B05	Globin CTT-VIIB-5/CTT-VIIB-9	<i>C. riparius</i>	$3 \cdot 10^{-42}$	↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
Pb2_3_19_E01	Globin CTT-VIII	<i>C. riparius</i>	$2 \cdot 10^{-81}$	↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
TBT50_02_D01	Ecdysteronkontrolliertes Gen I-18c	<i>C. tentans</i>	$1 \cdot 10^{-30}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
TBT50_04_H05	Endopeptidase vom Serintyp (Chymotrypsin)	<i>A. aegypti</i>	$8 \cdot 10^{-66}$	↑	Proteinmetabolismus	Katalysiert Hydrolyse der nicht-terminalen Peptidbindungen in Oligo- oder Polypeptide
06_F02 Pb2_3_05_G02	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5	<i>D. melanogaster</i> <i>Anopheles funestes</i>	$7 \cdot 10^{-45}$ $5 \cdot 10^{-97}$	↑ ↓	Energiemetabolismus	ATP-Synthese verbundener Elektronentransport
C1_2_05_D11 M5_1_10/1_G04 TBT50_02_F05 F3-1_01_E06 Pb2-3_08_G12	Unbekannt			↓ ↓ ↑ ↑ ↑		

Tab. 3.5: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Blei. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
07_A04	IWS1-ähnliches Protein		$4 \cdot 10^{-56}$	↑	Transkription	DNA-abhängige Regulierung der Transkription, RNA-Verlängerung
07_F06	Ähnlichkeit mit CG3171-PA	<i>Tribolium castaneum</i>	$3 \cdot 10^{-17}$	↓	Signaltransduktion	Transmembranrezeptoraktivität
08_C02	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor eIF-2-beta	<i>Aedes aegypti</i>	$2 \cdot 10^{-32}$	↓	Proteinmetabolismus	Translationsinitiierung, Proteinbindung
C1_2_10_D09	Tropomyosin 1	<i>Lonomia obliqua</i>	$1 \cdot 10^{-101}$	↓	Zellwachstum und Zytoskelett	Strukturelle molekulare Aktivität, besonders in Muskelzellen (Wechselwirkung mit Aktin)
F3_1_01_B02	RecJ Exonuclease	<i>Pseudomonas fluorescens PfO-1</i>	$2 \cdot 10^{-42}$	↓	DNA-Metabolismus	DNA-Reparatur und Rekombination, Antwort auf Stimulus (endogene DNA-Schäden)
F3_1_10_F01	Globin CTT-II beta	<i>Chironomus riparius</i>	$5 \cdot 10^{-59}$	↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
M5_1_05_D08	Lysyl-tRNA Synthetase, Isoform B	<i>Drosophila melanogaster</i>	3,7	↑	Proteinmetabolismus	Translation, Nukleotid- und ATP-Bindung
M5_1_05_G02	Clathrin coat-Aufbauprotein AP19	<i>A. aegypti</i>	$5 \cdot 10^{-68}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	Proteinbindung, intrazellulärer Proteintransport
Pb2_3_02_A12	Hämoglobin A	<i>C. riparius</i>	$6 \cdot 10^{-72}$	↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_05_A06 Pb2_3_10_A07 F3_1_04_B12	Globin CTT-III	<i>C. riparius</i>	$6 \cdot 10^{-72}$ $5 \cdot 10^{-76}$ $7 \cdot 10^{-71}$	↑ ↑ ↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport

Tab. 3.5: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Blei. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
C1_2_06_D07 C1_2_06_F01 E5_1_06/1_F09 F3_1_08_E05 Pb2_3_04_A04	Globin CTT-VI	<i>C. riparius</i>	5·10 ⁻⁷⁶ 2·10 ⁻⁷⁶ 3·10 ⁻⁵⁶ 2·10 ⁻⁷⁵ 1·10 ⁻⁵²	↑ ↑ ↑ ↑ ↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
05_H01	Prolinreiches Protein		1·10 ⁻⁵	↓	Unbekannt	Unbekannt
04 H07 Plasmid Pb2_3_04_A04	Hypothetisches Protein	<i>A. aegypti</i>	3·10 ⁻⁵ 1·10 ⁻¹²	↑ ↑	Unbekannt	Unbekannt
E5_1_01_C05 M5_1_03_B09	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>A. aegypti</i>	2·10 ⁻⁶¹ 6·10 ⁻¹⁴	↑ ↑	Unbekannt	Unbekannt
06 H03 Plasmid M5_1_02_C10	Unbekannt			↑ ↑		

3.2.3 Carbamazepin

Die unbekannt differenziell exprimierten Gene nach einer Exposition gegenüber 0,63 mg/kg Carbamazepin (CBZ) wurden aufgrund der Zahl in einer separaten Tabelle (Tabelle 3.6) aufgeführt. Bei diesen Genen gab es keine Übereinstimmung mit in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen. 76,2% der unbekannt Genen zeigten eine Überexpression.

Tab. 3.6: Unbekannte differenziell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Carbamazepin.

Reprimiert	Überexprimiert
04_F07	E5_1_06/1_B01
C1_2_09_F12	E5_1_06/1_C01
C1_2_09_H04	E5_1_07/1_H01
F3_1_09_H02	E5_1_08/1_A09
TBT50_01_E09	E5_1_08/1_H09
	F3_1_04_H11
	M5_1_07/1_G09
	M5_1_07/1_H09
	M5_1_09/1_D09
	M5_1_09/1_H04
	M5_1_09/1_H06
	M5_1_10/1_C05
	Pb2_3_02_E08
	Pb2_3_02_G08
	Pb2_3_05_F01
	TBT50_03_C08

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der Proteinrecherche (ohne die Gene, deren Sequenz nicht verwendbar war) aufgeführt. Vier der nicht verwertbaren Gene wurden überexprimiert. 72 Klone (49 Gene) wurden bei den *Chironomus*-Larven infolge einer Exposition gegenüber CBZ differenziell reguliert. 36 Gene zeigten eine Überexpression, elf wurden reprimiert. Bei Cytochrom b und Alpha-Tubulin wurden einige Klone überexprimiert, andere reprimiert, so dass hier keine eindeutigen Aussagen zu treffen sind. Alle Gene, die am Proteinmetabolismus beteiligt sind, waren überexprimiert. Die Gene, die beim Zellwachstum eine Rolle spielen, zeigten ein uneinheitliches Bild (Tabelle 3.7). 27,8% der Proteine mit einem sicheren Erwartungswert sind am Zellwachstum und dem Zytoskelett und 25% am Sauerstofftransport beteiligt. Der Proteinmetabolismus ist mit 16,7% der dritthäufigste durch CBZ beeinflusste Prozess. Für weitere 13,9% der Proteine sind die beteiligten biologischen Prozesse und Funktionen unbekannt; diese Proteine wurden überwiegend überexprimiert (Tabelle 3.7).

Tab. 3.7: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Carbamazepin. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
05_F08	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 3 und 5	<i>Chironomus sp.</i>	$4 \cdot 10^{-52}$	↓	Energiemetabolismus	ATP-Synthese verbundener Elektronentransport
C1_2_01_G01	Natrium-/Kaliumabhängige ATPase beta-2 Untereinheit	<i>Aedes aegypti</i>	$4 \cdot 10^{-30}$	↑	Energiemetabolismus	Natrium-/Kaliumionentransport
C1_2_06_D04	Globin CTT-IV	<i>C. riparius</i>	$2 \cdot 10^{-61}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_06_G03	Spermaprotein 17	<i>C. tentans</i>	$1 \cdot 10^{-11}$	↑	Signaltransduktion	Proteinbindung
C1_2_09_B12	Seneszenz-assoziiertes Protein	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	$3 \cdot 10^{-16}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	Katalysiert Schwefeltransfer
C1_2_10_G08	Hypothetisches Protein	<i>P. yoelii yoelii</i>	0,017	↓	Unbekannt	Unbekannt
E5_1_06/1_G05	Bm 40-Vorstufe	<i>A. aegypti</i>	$5 \cdot 10^{-28}$	↑	Proteinmetabolismus	Proteinbindung, Kalziumionenbindung
E5_1_06/1_G12	Oxidoreduktase	<i>A. aegypti</i>	$3 \cdot 10^{-19}$	↑	Energiemetabolismus	SDR Familienmitglied 11-Vorläufer, NAD-abhängige Oxidoreduktase-Aktivität
E5_1_07/1_E02	Peptidase S1A, Chymotrypsin	<i>Anopheles gambiae</i>	0,046	↑	Proteinmetabolismus	Katalysiert Hydrolyse der nicht-terminalen Peptidbindungen in Oligo- oder Polypeptide
M5_1_08/1_A01	40S Ribosomales Protein S21	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-35}$	↑	Proteinmetabolismus	RNA-Bindung, struktureller Konstituent der Ribosome, Translation
M5_1_09/1_B06	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4	<i>Drosophila sulfurigaster sulfurigaster</i>	$2 \cdot 10^{-37}$	↑	Energiemetabolismus	ATP-Synthese verbundener Elektronentransport
M5_1_09/1_F06	Serinprotease-ähnliches Protein, Isoform 1	<i>Penaeus monodon</i>	$8 \cdot 10^{-3}$	↑	Proteinmetabolismus	Katalysiert Hydrolyse der nicht-terminalen Peptidbindungen in Oligo- oder Polypeptide
TBT50_02_C08	Aktin	<i>A. aegypti</i>	$3 \cdot 10^{-146}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	ATP-Bindung, Proteinbindung, Zellbeweglichkeit

Tab. 3.7: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Carbamazepin. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
TBT50_02_G08	Peptidoglykanerkennungsprotein sc2	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-38}$	↑	Proteinmetabolismus	Immunantwort, Hydrolase
TBT50_03_C07	Glutathion-S-Transferase	<i>A. aegypti</i>	$9 \cdot 10^{-48}$	↑	Stressmetabolismus	Entgiftung von Xenobiotika
TBT50_03_C12	Globin-II beta	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-31}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
TBT50_04_H05	Endopeptidase vom Serintyp (Chymotrypsin)	<i>A. aegypti</i>	$8 \cdot 10^{-66}$	↑	Proteinmetabolismus	Katalysiert Hydrolyse der nicht-terminalen Peptidbindungen in Oligo- oder Polypeptide
C1_2_06_H09 C1_2_04_G03	Tetraspanin	<i>A. aegypti</i>	$2 \cdot 10^{-30}$ $4 \cdot 10^{-31}$	↑ ↑	Zellwachstum und Zytoskelett	Proteinbindung, Membranproteinsignalgebung, Zellproliferation
C1_2_10_C04 C1_2_10_D04	CG9360-PA (SDR Familienmitglied 11-Vorstufe)	<i>D. melanogaster</i>	$2 \cdot 10^{-27}$ $5 \cdot 10^{-24}$	↓ ↓	Zellwachstum und Zytoskelett	NAD-abhängige Oxidoreduktase-Aktivität
C1_2_06_B11 E5_1_09/1_E09	Globin CTT-VI	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-75}$ $7 \cdot 10^{-17}$	↑ ↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_04_A12 M5_1_07/1_G02	Globin CTT-VIIB-5/ CTT-VIIB-9	<i>C. riparius</i>	$2 \cdot 10^{-41}$ $1 \cdot 10^{-42}$	↑ ↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
E5_1_08/1_E01 E5_1_08/1_F02	Cytochrom C1	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-64}$ $2 \cdot 10^{-64}$	↑ ↑	Energiemetabolismus	Hämbindung, Elektronenträgeraktivität
E5_1_06/1_D10 E5_1_06/1_F05 E5_1_06/1_F06	Globin CTT-VIII	<i>C. riparius</i>	$6 \cdot 10^{-78}$ $6 \cdot 10^{-78}$ $1 \cdot 10^{-81}$	↑ ↑ ↑	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
E5_1_06/1_H09 M5_1_08/1_B02	40S Ribosomales Protein S20	<i>A. albopictus</i> <i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-51}$ $2 \cdot 10^{-37}$	↑ ↑	Proteinmetabolismus	RNA-Bindung, struktureller Konstituent der Ribosome, Translation

Tab. 3.7: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Carbamazepin. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
C1_2_04_E09	Alpha-Tubulin	<i>C. tentans</i>	$3 \cdot 10^{-91}$	↓	Zellwachstum und Zytoskelett	Strukturelle molekulare Aktivität, GTP-Bindung
C1_2_05_B06		<i>C. tentans</i>	$8 \cdot 10^{-93}$	↓		
C1_2_05_B08		<i>A. aegypti</i>	$2 \cdot 10^{-33}$	↓		
C1_2_05_E11		<i>C. tentans</i>	$1 \cdot 10^{-115}$	↑		
C1_2_01_F12	Cytochrom b	<i>Leptopelis natalensis</i>	$2 \cdot 10^{-8}$	↓	Energiemetabolismus	Hämbindung, Elektronenträgeraktivität
C1_2_04_B08		<i>D. melanogaster</i>	$7 \cdot 10^{-94}$	↓		
C1_2_06_E07		<i>D. melanogaster</i>	$2 \cdot 10^{-96}$	↓		
C1_2_06_F06		<i>D. melanogaster</i>	$2 \cdot 10^{-100}$	↓		
E5_1_06/1_A03		<i>D. melanogaster</i>	$8 \cdot 10^{-98}$	↑		
E5_1_07/1_D02		<i>Cydistomyia duplonotata</i>	$1 \cdot 10^{-101}$	↑		
Pb2_3_04_C08	Ecdysteronkontrolliertes Gen I-18c	<i>C. tentans</i>	$4 \cdot 10^{-27}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
Pb2_3_04_H12			$5 \cdot 10^{-28}$	↑		
Pb2_3_01_A08			$1 \cdot 10^{-23}$	↑		
TBT50_03_E04			$7 \cdot 10^{-20}$	↑		

3.2.4 Fluoxetin

Die unbekannt differenziell exprimierte Gene nach einer Exposition gegenüber 0,9 mg/kg Fluoxetin wurden aufgrund der Zahl in einer separaten Tabelle (Tabelle 3.8) aufgeführt.

Tab. 3.8: Unbekannte differenziell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Fluoxetin.

Reprimiert	Überexprimiert
C1_2_09_B10	M5_1_08/1_G04 E5_1_08/1_E02 E5_1_06/1_C01 M5_1_09/1_H10 M5_1_10/1_A08 M5_1_10/1_F11 Pb2_3_01_H08 Pb2_3_03_C02 Pb2_3_05_H12 Pb2_3_13_C02 Pb2_3_15_F03

In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse der Proteinrecherche aufgeführt. 32 Klone (29 Gene) wurden differenziell exprimiert. Davon zeigten 25 Gene eine Überexpression, vier wurden reprimiert. Alle Gene der Prozesse Transkription, Protein- und Energiemetabolismus wurden überexprimiert. Fünf von sechs Genen, deren Funktion unbekannt ist, zeigten eine Überexpression. Nur eines der unbekannt Genen, die keine Übereinstimmung mit Sequenzen der Datenbanken zeigten, wurde reprimiert (Tabelle 3.9). Der am häufigsten beeinflusste Prozess der Proteine mit sicherem Erwartungswert war der Energiestoffwechsel (22,2%). Der Anteil der Transkription und des Proteinstoffwechsels und auch der unbekannt Prozesse betrug jeweils 16,7%.

Tab. 3.9: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Fluoxetin. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
05_G06	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>Aedes aegypti</i>	$3 \cdot 10^{-17}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
06_H08	Ähnlichkeit mit Forkhead box K1	<i>Apis mellifera</i>	$4 \cdot 10^{-63}$	↑	Transkription	Regulierung der DNA-abhängige Transkription
07_A04	GA22119-PA	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	$9 \cdot 10^{-78}$	↑	Transkription	DNA-abhängige Regulierung der Transkription, Verlängerung der RNA
08_H04	Nipsnap	<i>A. aegypti</i>	$7 \cdot 10^{-85}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
C1_2_09_C04	Ähnlichkeit mit Chromobox-Protein-Homolog 5 (Heterochromatinprotein 1)		$6 \cdot 10^{-26}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett, Chromatinaufbau und/oder -abbau	DNA-Bindung, Chromatinbindung, Nukleinsäurebindung
C1_2_10_D06	Hypothetisches Protein AaeL_AAEL009537	<i>A. aegypti</i>	$5 \cdot 10^{-13}$	↓	Unbekannt	Unbekannt
E5_1_07/1_E10	Saposin	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-40}$	↑	Lipidmetabolismus	Aktiviert lysosomale lipidabbauende Enzyme
E5_1_07/1_G09	Ähnlichkeit mit Glucosamin-6-Phosphat-Deaminase 2 Variante	<i>Pan troglodytes</i>	$4 \cdot 10^{-33}$	↑	Energiemetabolismus	Deaminase-Aktivität, intramolekulare Isomerase-Aktivität, Hydrolase
E5_1_08/1_C12	Proteasomuntereinheit beta-Typ	<i>A. aegypti</i>	$1 \cdot 10^{-76}$	↑	Proteinmetabolismus	Proteo- und Peptidolyse
F3_1_09_E08	Juvenilhormonsäure-Methyltransferase	<i>D. melanogaster</i>	$7 \cdot 10^{-13}$	↑	Entwicklung	Wandelt im letzten Schritt der Juvenilhormon(JH-) Biosynthese inaktive Vorstufen des JH oder JH-Säuren in aktive Juvenilhormone um
M5_1_05_F05	Pyruvatkinase	<i>A. aegypti</i>	$4 \cdot 10^{-99}$	↓	Energiemetabolismus	Glykolyse
Pb2_3_05_G06	Mögliche Phosphoserinaminotransferase (PSAT)		$3 \cdot 10^{-97}$	↑	Proteinmetabolismus	L-Serinbiosynthese

Tab. 3.9: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber Fluoxetin. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
Pb2_3_10_G12	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>A. aegypti</i>	$3 \cdot 10^{-14}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
Pb2_3_15_H03	Ribosomales Protein, Untereinheit 3	<i>Culicoides sonorensis</i>	$4 \cdot 10^{-81}$	↑	Proteinmetabolismus	Struktureller Konstituent des Ribosoms, strukturelle molekulare Aktivität
E5_1_04_A09 E5_1_04_G09	Globin CTT-VI	<i>C. riparius</i>	$5 \cdot 10^{-75}$ $5 \cdot 10^{-75}$	↓ ↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
F3_1_02_E11 Pb2_3_02_A08	GA18251-PA (TBC1 Domäne, Familienmitglied 23)	<i>D. pseudoobscura</i>	$2 \cdot 10^{-30}$ $1 \cdot 10^{-29}$	↑ ↑	Energiemetabolismus	Hormonaktivität, Rezeptorbindung, struktureller Konstituent der Kutikula, strukturelle molekulare und enzymregulatorische Aktivität
Pb2_3_08_H11 C1_2_01_G03	BR2.2	<i>C. pallidivitus</i>	$4 \cdot 10^{-11}$ $4 \cdot 10^{-9}$	↑ ↑	Unbekannt	Unbekannt

3.2.5 17 α -Methyltestosteron

Eine Exposition gegenüber 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Methyltestosteron führte bei den Larven zu der differentiellen Expression (1,8-fach) von insgesamt 18 Klonen (neun Genen). Davon zeigten zwei Gene eine Überexpression, sieben wurden reprimiert. In Tabelle 3.10 sind die Ergebnisse der Proteinrecherche aufgeführt. Für ein Gen fand sich bei der Annotationsuche keine Übereinstimmung mit in der Datenbank hinterlegten Sequenzen, und bei drei weiteren war der Erwartungswert zu niedrig. 84,6% der differentiell regulierten Proteine mit sicherem Erwartungswert sind Globine und am Sauerstofftransport beteiligt. Alle Globine wurden in ihrer Expression unterdrückt.

3.2.6 17 α -Ethinylöstradiol

20 Gene wurden bei den *Chironomus*-Larven infolge einer Exposition gegenüber Ethinylöstradiol differentiell reguliert. Davon waren sieben Gene überexprimiert, 13 wurden reprimiert. In Tabelle 3.11 sind die Ergebnisse der Proteinrecherche aufgeführt. Zwei Gene zeigten bei der Datenbanksuche keine Übereinstimmung mit den dort hinterlegten Proteinen, und bei zwei weiteren war die Übereinstimmung zufällig. Ein Viertel der exprimierten Proteine mit einem Erwartungswert $> 10^{-10}$ sind am Sauerstofftransport beteiligt, und 31,3% spielen im Proteinstoffwechsel eine Rolle. Alle Globine wurden in ihrer Expression unterdrückt. Auch bei den anderen beeinflussten Prozessen wurden die Gene überwiegend reprimiert.

Tab. 3.10: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber 17 α -Methyltestosteron. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
03_D02	Unbekannt			↑		
F3_1_110_E04	Myosin 1A	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	$6 \cdot 10^{-4}$	↑	Zellwachstum und Zytoskelett	ATP-Bindung, Proteinbindung, Zellbeweglichkeit
TBT50_01_C11	Hypothetisches Protein	<i>Photobacterium luminescens subsp. Laumondii</i>	2,5	↓	Unbekannt	Unbekannt
TBT50_04_B05	Cytochrom P450	<i>Ochlerotatus sollicitans</i>	$8 \cdot 10^{-63}$	↓	Stressmetabolismus	Elektronentransport, Oxidoreduktase-Aktivität
TBT50_04_C08	Alpha-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase E1		$9 \cdot 10^{-67}$	↓	Energiemetabolismus	Glykolyse
C1_2_05_A06 F3_1_10_C05 Pb2_3_10_A07 C1_2_05_F10	Globin CTT-III	<i>Chironomus riparius</i>	$3 \cdot 10^{-62}$ $3 \cdot 10^{-54}$ $9 \cdot 10^{-61}$ $2 \cdot 10^{-70}$	↓ ↓ ↓ ↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_06_D04	Globin CTT-IV	<i>C. riparius</i>	$2 \cdot 10^{-61}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_06_E07 Pb2_3_03_G02 Pb2_3_05_A02	Globin CTT-VIIB-6	<i>C. riparius</i>	$7 \cdot 10^{-40}$ $5 \cdot 10^{-76}$ $5 \cdot 10^{-69}$	↓ ↓ ↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
F3_1_09_G12 Pb2_3_09_B11 Pb2_3_11_C03	Globin CTT-II beta	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-72}$	↓ ↓ ↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport

Tab. 3.11: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber 17 α -Ethinylöstradiol. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins.

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
07_H07	GA21779-PA (Lysosomale Thiolreduktase IP30-Vorstufe)	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	$8 \cdot 10^{-20}$	↑	Immunantwort, Antigenverarbeitung	Katalysiert die Reduktion der Disulfidbindung, Antigenverarbeitung
08_A09	Proteinphosphatasehemmer 2	<i>Aedes aegypti</i>	$2 \cdot 10^{-39}$	↑	Signaltransduktion	Regulierung der Signaltransduktion
C1_2_05_A10	Globin CTT-VIIB-3	<i>Chironomus riparius</i>	$5 \cdot 10^{-78}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
C1_2_05_E08	Lcp65Ac CG6956-PA (Larvale Kutikulaprotein-Vorstufe)	<i>D. melanogaster</i>	$1 \cdot 10^{-21}$	↓	Proteinmetabolismus	Kutikula-Entwicklung, Chitinbindung
C1_2_10_F03	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4	<i>Anopheles funestus</i>	$5 \cdot 10^{-51}$	↑	Energiemetabolismus	ATP-Synthese verbundener Elektronentransport
F3_1_01_G06	Pili-Aufbau-Chaperon	<i>Pseudomonas putida F1</i>	$1 \cdot 10^{-52}$	↑	Proteinmetabolismus	Biogenese der langen polaren Fimbria, Zellwandorganisation
F3_1_09_G12	Globin CTT-II beta	<i>C. riparius</i>	$5 \cdot 10^{-73}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
F3_1_10_D03	L2-Hydroxyglutarat-Dehydrogenase	<i>A. gambiae</i>	$3 \cdot 10^{-35}$	↓	Energiemetabolismus	Elektronentransfer, Atmungskette
F3_1_10_G04	N-Carbamoyl-L-Aminosäure-Amidohydrolase	<i>Pseudomonas fluorescens PFO-1</i>	$2 \cdot 10^{-70}$	↓	Proteinmetabolismus	Monoxygenase-Aktivität, Eisenionenbindung, Proteolyse
F3_1_10_H04	Peptidase U32	<i>P. fluorescens PFO-1</i>	$5 \cdot 10^{-70}$	↓	Proteinmetabolismus	ATP-Bindung, reguliert Rezeptorsignalgebung, Proteolyse
Pb2_3_01_E02	IP18281 (FAM20-Vorstufe)	<i>D. melanogaster</i>	$2 \cdot 10^{-19}$	↑	Unbekannt	Unbekannt
Pb2_3_02_B07	Hypothetisches Protein	<i>Thiomicrospira crunogena</i>	8,7	↓	Unbekannt	Unbekannt

Tab. 3.11: Differentiell exprimierte Gene von *Chironomus riparius* bei Exposition gegenüber 17 α -Ethinylöstradiol. Die Spalte „Gen“ enthält die funktionelle Annotation aufgrund der vorhergesagten Ähnlichkeit, „Taxon“ den Organismus mit der höchsten Sequenzähnlichkeit des Proteins. (Fortsetzung)

ID	Gen	Taxon	E-Wert	Expression	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion
Pb2_3_02_D06	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase-Bestandteil der Pyruvatdehydrogenase	<i>A. aegypti</i>	$3 \cdot 10^{-40}$	↓	Energiemetabolismus	Glykolyse
Pb2_3_03_D04	Hypothetisches Protein	<i>Plasmodium falciparum</i>	7,8	↓	Unbekannt	Unbekannt
Pb2_3_08_F10	Globin CTT-III A	<i>C. riparius</i>	$1 \cdot 10^{-72}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
Pb2_3_12_H10	Globin CTT-IV	<i>C. riparius</i>	$2 \cdot 10^{-55}$	↓	Sauerstofftransport	Sauerstoffbindung, Eisenionbindung, Hämtransport
Pb2_3_16_D06	60S Ribosomales Protein L36	<i>A. aegypti</i>	$6 \cdot 10^{-50}$	↑	Proteinmetabolismus	RNA-Bindung, struktureller Konstituent des Ribosoms, Translation
Pb2_3_18_D03	Hsp70-Interagierendes Protein	<i>A. aegypti</i>	$7 \cdot 10^{-99}$	↓	Stressmetabolismus	ATP-Bindung, reguliert Rezeptorsignalgebung
C1_2_04_E04 Pb2_3_02_B01	Unbekannt			↑ ↓		

3.2.7 Zusammenfassung

Die Datenbankrecherche ergab bei allen Substanzen differentiell regulierte Gene, die keine Übereinstimmung mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen zeigten, oder bei denen die Übereinstimmung vermutlich auf einem Zufall beruhte. Der Anteil dieser Gene an allen differentiell exprimierten Genen reichte von 20% (bei einer Exposition gegenüber EE₂) bis zu 40,6% (Fluoxetin). Nach einer Exposition gegenüber Carbamazepin zeigten auch mehr Gene keine Übereinstimmung mit den in den Datenbanken hinterlegten Proteinen; diese Gene machten aber nur 37,5% aller Gene aus. Bei Berücksichtigung der fünf nicht auswertbaren Sequenzen erhöhte sich der Anteil der nicht identifizierten Gene auf 44,4%. Tabelle 3.12 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl der differentiell regulierten Klone bzw. Gene. Unterschiede zwischen der Anzahl der Klone und der Gene sind dadurch bedingt, dass in einigen Fällen mehrere Klone das gleiche Gen kodierten.

Tab. 3.12: Differentiell regulierte Klone und Gene von *Chironomus riparius* nach einer Exposition gegenüber verschiedenen Schadstoffen.

Substanz	Differentiell regulierte Klone			Differentiell regulierte Gene	
	Gesamtzahl	Unbekannter Klon	Unbekannte Funktion	Gesamtzahl	Unbekannte Funktion
Tributylzinn	13 ↑ 13 ↓	3 ↑ 2 ↓	1 ↑ 1 ↓	10 ↑ 10 ↓	1 ↑ 1 ↓
Blei	19 ↑ 5 ↓	2 ↑	4 ↑ 1 ↓	10 ↑ 5 ↓	3 ↑ 1 ↓
Carbamazepin	49 ↑ 18 ↓	16 ↑ 5 ↓	5 ↑ 1 ↓	22 ↑ 7 ↓	2 ↑ 1 ↓
Fluoxetin	27 ↑ 5 ↓	11 ↑ 1 ↓	5 ↑ 1 ↓	13 ↑ 4 ↓	4 ↑ 1 ↓
Methyltestosteron	2 ↑ 16 ↓	1 ↑	1 ↓	1 ↑ 7 ↓	1 ↓
Ethinylöstradiol	7 ↑ 13 ↓	1 ↑ 1 ↓	1 ↑ 2 ↓	6 ↑ 12 ↓	1 ↑ 2 ↓

4 Diskussion

4.1 Ökotoxikologische Untersuchung

Chironomiden kommen weltweit vor und sind die häufigsten Makroinvertebraten in limnischen Ökosystemen (ARMITAGE ET AL., 1995). Sie haben eine wichtige Position in der Nahrungskette und sind eine Hauptnahrungsquelle von Fischen, anderen Wirbeltieren und räuberische Invertebraten (LEE & CHOI, 2006). Lange Zeit galten Chironomiden aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit in der Ökotoxikologie als relativ unempfindliche Organismen (BETTINETTI & PROVINI, 2002). Diese Erkenntnis basierte auf Ergebnissen der häufig angewendeten kurzzeitigen Toxizitätstests mit L4-Larven. Diese Tests unterschätzen aber oft die Empfindlichkeit der Mücken gegenüber Chemikalien. Chronische Studien zeigten, dass L1-Larven empfindlicher sind, und deshalb werden sie nun standardmäßig laut anerkannter Versuchsprotokolle (OECD 218, OECD 219) eingesetzt (GAUSS ET AL., 1985, WILLIAMS ET AL., 1986, POWLESLAND & GEORGE, 1986, PASCOE ET AL., 1989, OECD, 2004a, b). Um chronische subletale Effekte nachzuweisen, werden in der Ökotoxikologie vermehrt Versuche über den ganzen Lebenszyklus des Organismus durchgeführt, vor allem um endokrine Effekte feststellen zu können (SEGNER ET AL., 2003, TAENZLER ET AL., 2007).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Übertragbarkeit der Ergebnisse wird die Diskussion in den nachfolgenden Kapiteln und auch im molekularbiologischen Kapitel auf die Ergebnisse der Versuche mit Invertebraten (aquatische und terrestrische) sowie mit Fischen (da aquatische Organismen) beschränkt.

4.1.1 Salinität und Temperatur

Salinität

Obwohl die Salinität ein natürlicher Faktor und kein Schadstoff ist, ist es mittlerweile akzeptiert, dass erhöhte oder erniedrigte Salinitäten deutliche Stresseffekte bei limnischen Organismen hervorrufen und diese untersucht werden sollen (DUNLOP ET AL., 2005). Die zunehmende Versalzung (Akkumulation von gelösten anorganischen Salzen) der limnischen Ökosysteme ist seit Mitte der 80er-Jahre von immer größerer Umweltrelevanz (WILLIAMS, 1987). Es gibt vermehrt Studien über akuttoxische Effekte von erhöhten Salinitäten, aber kaum Informationen über chronische und/oder subletale Effekte (HASSELL ET AL., 2006). Viele Studien zur Salinitättoleranz limnischer Makroinvertebraten konzentrieren sich auf die Untersuchung der älteren Lebensstadien, da sie vermutlich toleranter als die Eistadien und

frisch geschlüpfte Tiere reagieren. Diese Studien wurden meist als Akuttests durchgeführt und somit wurden die Effekte der Salinität meist unterschätzt. Die Salinität hat deutliche Effekte auf die physiologische Organisation des Organismus, wie zum Beispiel auf den Austausch von Wasser und Ionen (BERVOETS ET AL., 1996a). Es gibt Hinweise darauf, dass *Chironomus riparius* bei höheren Salinitäten vorkommt, dies sind aber meist Einzelnennungen (BERVOETS ET AL., 1996b). Direkte Vergleiche zwischen den einzelnen Studien über die Effekte von erhöhten Salinitäten sind nicht einfach, da die Salinität oft unterschiedlich angegeben wird; in Promille, als elektrische Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$) oder als Menge des gesamten gelösten anorganischen Materials (TDS) (GOETSCH & PALMER, 1997). Zwischen den einzelnen Parametern besteht eine gute Korrelation, jedoch nicht bei hohen Salinitäten.

Die meisten limnischen Makroinvertebraten sind intolerant gegenüber salinen Umweltbedingungen (JAMES ET AL., 2003, BEREZINA, 2003). 5 – 8 g/L gelten als Obergrenze für Salinitäten in limnischen Gewässern (BEREZINA, 2003). Mortalitäten und subletale Effekte (physiologische und Verhaltensänderungen) treten bei Konzentrationen um 0,8 g/L auf (BAILEY & JAMES, 2000). Die Empfindlichkeit gegenüber erhöhten Salinitäten wird durch den physiologischen Zustand (z.B. Körpergröße, Geschlecht und Ernährungsstatus), den Akklimationsgrad und das Alter des Organismus beeinflusst (HART ET AL., 1991). Die Toleranz gegenüber Salinität wird auch durch andere Stressfaktoren wie Temperatur (geringere Toleranzen bei höheren Temperaturen), Umweltverschmutzung und zeitliche Veränderungen der Salinitätkonzentration beeinflusst, wobei fluktuierende Salinitäten stärkere Effekte als eine konstant höhere Salinität haben (BERVOETS ET AL., 1996c, HALL & BURNS, 2002).

Chironomiden gelten allgemein als tolerant gegenüber veränderten Salinitäten (HART ET AL., 1991). *Chironomus riparius* wurde in Fließgewässern mit Salinitäten bis zu 3,04 g/L gefunden (BERVOETS ET AL., 1996c). Die Toleranz der Puppen ist niedriger als die der Larven, vermutlich weil sie keine Möglichkeit für eine osmotische Regulierung haben und ihre Entwicklung nicht vollständig ist (BEREZINA, 2003). Invertebraten halten ihre Ionenkonzentrationen durch passive Mechanismen aufrecht (JAMES ET AL., 2003). Die Kutikula verhindert oder hemmt die Diffusion von Wasser und Salzen aus dem umgebenden Medium ins Blut (HART ET AL., 1991). Es gibt kaum Informationen über die Ionen- und Osmoregulierung von limnischen Chironomiden. *C. plumosus*, eng verwandt mit *C. riparius*, kann hohe Salzkonzentrationen nicht regulieren. Die Obergrenze für die tolerierte Salinität ist gleich der Salzkonzentration in der Hämolymphe (etwa 10 g NaCl/L) (LAUER, 1969). Auch *C. tentans* hat eine begrenzte Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen (BARJAKTAROVIC & BENDELL-YOUNG, 2001). In hyperosmotischen Organismen kann der Energiebedarf der Osmoregulierung bei erhöhten Salinitäten durch die Erhöhung der Permeabilität der Austauschoberflä-

che reduziert werden. Infolgedessen haben Chironomiden bei erhöhter Salinität auch eine höhere Membrandurchlässigkeit für Kationen, so dass die Aufnahme von Metallen (z.B. Cadmium) über diesen Stoffwechselweg erhöht ist (BERVOETS ET AL., 1996a, BARJAKTAROVIC & BENDELL-YOUNG, 2001). Aufgrund des größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses haben juvenile Stadien oft einen erhöhten Wasser- und Ionenaustausch. Von den akuttoxischen Effekten abgesehen, führen erhöhte Salinitäten (ab 1 g/L, etwa 1,6 mS/cm) auch zu sublethalen Effekten und insbesondere zu Veränderungen in der Zusammensetzung der limnischen Invertebratengemeinschaften (KEFFORD ET AL., 2003). Die Verzögerung in der Entwicklung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sowohl bei niedrigen als auch bei höheren Salinitäten mehr Energie für die Osmoseregulierung aufgewendet werden muß.

Die Mücken der vorliegenden Studie reagierten auf erhöhte Salinitäten mit einer errechneten LC_{10} von 0,66‰ (KI: 0,26 – 1,68‰), etwa 2,64 μ S/cm. In anderen Studien hatten Salinitäten bis zu 10‰ keinen Effekt auf das Überleben, jedoch wurden die Versuche mit Larven im 4. Larvenstadium (L4) durchgeführt (BERVOETS ET AL., 1996a, c). Obwohl die Empfindlichkeiten sich auf den ersten Blick unterscheiden, ist es durchaus möglich, dass die Mücken ähnlich empfindlich sind, da die Salinitätstoleranz auch durch das Larvenstadium und die Versuchsdauer beeinflusst wird, wie eine Studie von KEFFORD ET AL. (2004) zeigte. Die ersten Larvenstadien von *C. tepperi* zeigten LC_{50} -Werte (48 h) von 20 mS/cm im Vergleich zu Larven im vierten Stadium (LC_{50} : 10 mS/cm) (KEFFORD ET AL., 2004). Die unterschiedlichen Sensitivitäten können aber auch mit unterschiedlich angepassten Chironomiden erklärt werden, da BERVOETS ET AL. Freilandlarven für ihre Versuche verwendet haben (BERVOETS ET AL., 1996a, c). DUNLOP ET AL. (2008) errechneten für Chironomiden eine LC_{50} von 14,7 mS/cm. Bei einer Salinität von 12 g/L war die Mortalität der *Chironomus*-Larven (L4) 100% (SOARES ET AL., 2005). Eine gemeinsame Exposition von verschiedenen Chironomidenarten ergab eine LC_{10} (3 d) von 3,4 mS/cm (etwa 1,5‰) (KEFFORD ET AL., 2003).

Eine verzögerte Emergenz, und somit eine Verlängerung der larvalen Phase, mit steigenden Salinitäten ist möglicherweise ein Hinweis auf kompensatorische Reaktionen der Mücken. Erhöhte Salinitäten beeinflussen unter anderem die Wachstumsrate (CLARK ET AL., 2004). Dipteren können die Verpuppung bei erhöhten Salinitäten solange hinauszögern, bis ein kritisches Gewicht erreicht ist, jedoch kann eine Verlängerung der larvalen Phase die verringerte Wachstumsrate nicht unbedingt kompensieren (CLARK ET AL., 2004). Der mittlere Schlupfzeitpunkt war sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen ab 5‰ signifikant verzögert. Auch hier sind die Mücken ähnlich empfindlich wie in anderen Untersuchungen. Die Salinität beeinflusste bei *Chironomus* sp. die Zeit bis zur ersten Emergenz (HASSELL ET AL., 2006). Bei zunehmenden Salinitäten war die Emergenz um 15 bis 88% verzö-

gert, und ab 20 mS/cm (etwa 5‰) schlüpften keine Mücken mehr. Die Reaktion der Mücken zeigt eine umgekehrte U-Form mit der höchsten Zahl der geschlüpften Mücken bei mittleren Salinitäten (HASSELL ET AL., 2006), was im vorliegenden Versuch ebenfalls festgestellt werden konnte. Die signifikanten Unterschiede im Gewicht der Männchen bei zunehmenden Salinitäten der vorliegenden Studie ist im Gegensatz zu der Studie von HASSELL ET AL. (2006), in der die Mücken trotz einer verzögerten Emergenz keine Veränderungen in der Größe zeigten.

Die erhöhte Zahl unfruchtbarer Gelege ab 5‰ (21,3 mS/cm) ist vergleichbar mit anderen Studien. Versuche mit *C. tepperi* zeigten reduzierte larvale Schlupfraten ab einer Salinität von 12,6 mS/cm (KEFFORD ET AL., 2004). Die Eier waren toleranter gegenüber erhöhten Salinitäten im Vergleich zu den frisch geschlüpften Larven, was vermutlich aber an der gallerartigen Schutzhülle lag (KEFFORD ET AL., 2004). Eine Studie mit Daphnien zeigte, dass die Zahl der Bruten als auch die Gesamtzahl der Nachkommen mit zunehmenden Salzgehalten abnahm und dass die Anzahl der Nachkommen pro Brut ebenfalls geringer war (MARTÍNEZ-JERÓNIMO & MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2007).

Die signifikant geringere Populationswachstumsraten ab 5‰ sind in Übereinstimmung mit anderen Studien in der die Wachstumsrate ebenfalls mit zunehmenden Salinitäten abnahm (CLARK ET AL., 2004, HASSELL ET AL., 2006). Die Effekte der Salinität auf das juvenile Wachstum und die Körpergröße haben möglicherweise Effekte auf das Wachstum der Population sowie auf den Reproduktionserfolg (HALL & BURNS, 2002). Jedoch kann die Abnahme der Wachstumsraten auch durch eine verringerte Nahrungsaufnahme oder eine erhöhte Osmoregulierung verursacht sein (CLARK ET AL., 2004, KEFFORD & NUGEGODA, 2005). Die vorliegende Studie zeigte, dass Salinitäten von 7‰ sehr drastische Effekte für Freilandpopulationen haben können, da aufgrund der unfruchtbaren Eigelege die Population zusammenbrechen würde.

Tab. 4.1: Effektkonzentrationen für Salinität, angegeben in Promille [‰].

Endpunkt	NOEC	LOEC
Mortalität	< 1	1
EmT ₅₀ (Weibchen)	3	5
EmT ₅₀ (Männchen)	3	5
Gelege pro Weibchen	5	7
Anzahl fruchtbare Gelege	3	5
Populationswachstumsrate	3	5

Die berechneten NOEC- und LOEC-Werte für Salinität sind in der Tabelle 4.1 angegeben. Parameter, die bis zur höchsten Konzentration (7‰) keinen Effekt zeigten, sind nicht auf-

geführt. Die signifikant erhöhte Gelegezahl bei 2,5‰ liegt an der höheren Überlebensrate der adulten Mücken im Vergleich zur Kontrolle. Obwohl sich beim Gewicht der Männchen signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten, ist keine eindeutige Tendenz auszumachen und die Unterschiede somit von geringer biologischen Relevanz.

Temperatur

Mit der aktuellen Diskussion um Klimaveränderungen und globale Erwärmung ist auch das Interesse an geeigneten Indikatoren für Temperatur- und Klimaveränderungen gestiegen. In dieser Hinsicht spielen Chironomiden eine große Rolle (BRODERSEN & ANDERSON, 2002). *Chironomus riparius* gehört zu den Ektothermen, die ihre Körpertemperatur nicht konstant halten können und deren Körpertemperatur sich folglich der Umgebungstemperatur anpasst (PÉRY & GARRIC, 2006). Infolge der erhöhten Wassertemperaturen hat eine Klimaerwärmung auch Auswirkungen auf die Zusammensetzung und Verbreitung des Makrozoobenthos sowie auf die Fitness und das Verhalten der Organismen (ROOT ET AL., 2003). Die vermehrte Einleitung von warmem Kühlwasser durch Energiekraftwerke hat ebenfalls Folgen für die aquatische Lebensgemeinschaft.

Die wichtigsten Faktoren, welche die Wassertemperatur von Oberflächengewässern beeinflussen, sind das Klima, die Hydrologie und die Sonneneinstrahlung, wobei aber insbesondere die Lufttemperatur einen direkten Einfluss auf die Wassertemperatur hat (WARD, 1985). Dabei zeigte sich, dass Temperaturschwankungen für biologische Prozesse eine größere Rolle als die konstant höhere Temperaturen spielen (WARD, 1985). Da in den kaltemperierten Regionen die Wassertemperaturen auch im Sommer kaum 20°C erreichen, werden stark erhöhte Temperaturen deutliche Effekte haben. Aber auch sehr viel niedrigere Temperaturen können die Entwicklung der aquatischen Organismen durch eine Verringerung der Aktivität und des Stoffwechsels negativ beeinflussen. In belasteten Sedimenten kann eine geringere Stoffwechselrate von Vorteil sein, da weniger Schadstoffe aufgenommen werden. Jedoch verzögert sich die Entwicklung durch die niedrigere Stoffwechselrate und somit erhöht sich wiederum die Aufenthaltsdauer im belasteten Sediment.

Je nach Herkunft haben Chironomiden ein unterschiedliches Temperaturoptimum (ROSSARO, 1991). Viele Entwicklungsprozesse wie z.B. der Schlupf der Larven, der Beginn der Emergenz, die Anzahl der Generationen pro Jahr und die Abundanz der Population, werden durch die Temperatur beeinflusst (VAN DEN HOEK & VERDONSCHOT, 2001, AIRAS ET AL., 2008). Der Zusammenhang zwischen den Interaktionen ist durch die Dauer einer bestimmten Mindesttemperatur gekennzeichnet. Viele Lebenszyklusstadien beeinflussen einander. So führt

eine Eiablage im Herbst zu kleineren Individuen im Vergleich zu den Larven, die nach einer Eiablage im Sommer schlüpfen (VANNOTE & SWEENEY, 1980). Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Temperatur, aber die Entwicklung wird auch durch Nahrungsaufnahme und Konkurrenz beeinflusst. Die Temperatur beeinflusst die Dauer des Lebenszyklusses von *C. riparius*, aber nicht die Zahl der pro Generation produzierten Nachkommen (PÉRY & GARRIC, 2006). Temperaturveränderungen können zudem die Toxizität von Chemikalien auf verschiedenen Wegen verstärken: Schwächung der Individuen durch suboptimale Temperaturen, erhöhte Aufnahme der Substanz oder beschleunigte Umwandlung der Substanz in toxischere Metabolite (BERVOETS ET AL., 1996c, LYDY ET AL., 1999, JEYASINGHAM & LING, 2000, AIRAS ET AL., 2008). So führt eine Temperaturerhöhung zu einer Zunahme der Toxizität von Blei, Kupfer und Zink aber zu einer geringeren Toxizität von Cadmium (KHAN ET AL., 2007). Umgekehrt kann Schadstoffstress zu einer verringerten Temperaturtoleranz von Organismen führen.

Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der Zuckmücken. Sie kann das Wachstum verstärken oder verlangsamen und so die Zeit bis zur Emergenz beeinflussen. Die Mücken schlüpfen bei einer Temperatur von 14°C signifikant später als bei 20°C, und bei 26°C signifikant früher. Dies ist in Übereinstimmung mit weiteren Studien mit *Chironomus decorus* und *C. riparius*, bei denen die Emergenz bei niedrigeren Temperaturen doppelt so lang dauerte wie bei 20°C und die Mücken bei höheren Temperaturen etwa 10 Tage früher schlüpfen (MAIER ET AL., 1990, AIRAS ET AL., 2008). Eine Studie von REMPEL und CARTER (1987) mit aquatischen Dipteren kam zu dem Erkenntnis, dass die Entwicklung bei höheren Temperaturen schneller war, und dass dies zu einer höheren allgemeinen Überlebensrate führte. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen (bezogen auf die Populationswachstumsrate) des vorliegenden Versuches. Die größeren Eigelege bei niedrigeren Temperaturen sind vergleichbar mit Ergebnissen von FROUZ ET AL. (2002). Die Temperaturabhängigkeit der Gelegegröße hat nach Ansicht der Autoren auch einen Einfluss auf das Wachstum der Population, was sich bei der vorliegenden Studie nicht bemerkbar machte (siehe unten). Sowohl bei 14°C als auch bei 26°C gab es mehr unfruchtbare Eigelege als bei 20°C. Im Gegensatz hierzu hatten hohe Temperaturen keinen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Gelege von *C. crassicaudatus* (FROUZ ET AL., 2002).

In einer Studie mit *C. riparius* waren die Larven bei 10°C signifikant kleiner als bei 20°C, was auf einen reduzierten Stoffwechsel und verringerte Nahrungsaufnahme zurückgeführt wurde (AIRAS ET AL., 2008). Im Gegensatz dazu waren die Mücken der vorliegenden Studie bei 14°C schwerer als bei 20°C. Durch die temperaturbedingte längere Verweildauer der Larven im Sediment können sie mehr Nahrung aufnehmen. Obwohl der Stoffwechsel bei

niedrigen Temperaturen verlangsamt ist, wurde die Nahrungsaufnahme in der vorliegenden Studie anscheinend nicht beeinflusst. Die Studie von MAIER ET AL. (1990) zeigte, dass beide Geschlechter bei 28°C nur halb so groß im Vergleich zu den niedrigeren Temperaturen waren. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf das Gewicht der Männchen, das größere Gewicht der Weibchen bei 26°C ist damit jedoch nicht erklärt. Vermutlich beruht das höhere Gewicht auf der reduzierten Eiablage der Weibchen.

Die Populationswachstumsrate war bei 14°C signifikant geringer und bei 26°C signifikant höher als bei 20°C. In einer Studie von PÉRY & GARRIC (2006) mit *C. riparius* wurde im Temperaturbereich von 15 – 27°C die Wachstumsrate, aber nicht die Reproduktion und das Überleben der Tiere beeinflusst. Die Wachstumsrate ist nicht bestimmend für das Überleben und die Verbreitung der Organismen und führt nicht unbedingt zu einer höheren Fruchtbarkeit, besserer Konkurrenzfähigkeit oder größeren Individuen (VANNOTE & SWEENEY, 1980). In einem Review wurde aufgezeigt, dass bei 83,5% der Studien eine erhöhte Temperatur zu einem verringerten Wachstum führte, obwohl die Wachstumsrate zunahm (ATKINSON, 1994). Es zeigte sich, dass die Organismen bei einer erhöhten Temperatur mehr Energie aufwandten, um diese Erhöhung zu kompensieren. Diese Energie fehlte dann für das Wachstum und die Entwicklung, was sich zum Beispiel in einer verringerten Körpergröße niederschlug (VANNOTE & SWEENEY, 1980, ATKINSON, 1994). Kleinere Individuen produzierten weniger Nachkommen, da die Anzahl gelegter Eier vom Gewicht der Weibchen abhängig ist (HUMPESCH, 1978). Dieser Zusammenhang war auch in der vorliegenden Studie festzustellen. Bei *C. crassicaudatus* hängt die Zahl der Generationen pro Jahr von der Temperatur ab und reicht von sechs Generationen bei 15°C bis 11 Generationen bei 28°C (FROUZ ET AL., 2002).

4.1.2 Psychopharmaka

Arzneimittel und pharmazeutisch aktive Substanzen bestehen aktuell aus etwa 3 000 unterschiedlichen Verbindungen und umfassen viele chemische Strukturen (FENT ET AL., 2006). Sie werden auch als eine neue Umweltschadstoffklasse klassifiziert (HUA ET AL., 2006). Pharmazeutisch aktive Komponenten werden jährlich in großen Mengen produziert und verwendet. Etwa 200 verschiedene pharmazeutische Bestandteile werden heutzutage in der EU eingesetzt (TERNES ET AL., 2007). Von Belang sind jedoch nicht unbedingt die hohen Produktionsmengen, sondern die Persistenz und die biologische Aktivität der Verbindungen. Das Umweltverhalten und die ökotoxikologischen Effekte vieler Pharmaka sind noch nicht vollständig untersucht. Die zur Zeit verfügbaren ökotoxikologischen Daten und gemessenen Umweltkonzentrationen decken weniger als 1% aller aktiven Bestandteile und Produkte ab,

was vermutlich daran liegt, dass die Umweltkonzentrationen meist unter den Werten liegen, die weitere ökotoxikologische Untersuchungen begründen würden (SANDERSON ET AL., 2004). Arzneimittel werden seit etwa 30 Jahren auch in der aquatischen Umwelt nachgewiesen (BOUND & VOULVOULIS, 2004). Haupteintragspfad sind die kommerziellen Kläranlagen, da ein Großteil der eingenommenen Medikamente im Körper nur unvollständig abgebaut wird und unverändert über Urin und Faeces in das Abwasser gelangt. Die Kläranlagen sind jedoch zurzeit nicht darauf ausgelegt, die Arzneimittel während der Reinigung des Abwassers zu eliminieren. Aquakulturen und der Abfluss von Bauernhöfen sind weitere wichtige Quellen für Arzneimittel in der Umwelt (ZUCCATO ET AL., 2006).

Pharmaka können auf niedrigere Wirbeltiere und Invertebraten aufgrund ähnlicher Rezeptoren ähnliche Wirkungen wie beim Menschen haben (TERNES, 1998, BOUND & VOULVOULIS, 2004), aber auch aufgrund biologischer Unterschiede in der Pharmakodynamik, -kinetik und der Physiologie andere chronische Effekte bewirken (FENT ET AL., 2006). Aquatische Organismen werden während ihres gesamten Lebens gegenüber Pharmakarückständen exponiert. Einige der verwendeten Arzneimittel sind sogenannte endokrine Disruptoren und können das Hormonsystem der Organismen beeinflussen. Aufgrund der niedrigen Umweltkonzentrationen der Pharmaka sind keine akuten Effekte zu erwarten. Pharmaka können in der Umwelt jedoch lange Halbwertszeiten haben und aufgrund dessen nachweisbare und biologisch aktive Konzentrationen erreichen und chronisch wirken (BOUND & VOULVOULIS, 2004, ZUCCATO ET AL., 2006). Aus diesem Grund wurden zwei endokrine Arzneimittel (17 α -Ethinylöstradiol und 17 α -Methyltestosteron) sowie die beiden Psychopharmaka Carbamazepin und Fluoxetin ausgewählt. Die Auswahl der Substanzkonzentrationen erfolgte so, dass die realen Umweltkonzentrationen abgedeckt wurden.

Carbamazepin

Aufgrund der Tatsache, dass im Versuch mit Carbamazepin (CBZ) die gleichen Konzentrationen und die gleichen Sedimente wie bei NENTWIG (2006) verwendet wurden, wurde auf eine Rückstandsanalytik verzichtet. Aus diesem Grund wird ebenfalls angenommen, dass sich die Substanzen im vorliegenden Versuch ähnlich verhalten haben wie in den Versuchen von NENTWIG (2006). Die Literaturangaben der Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich von 1,4 – 74 ng/L bzw. 2 μ g/kg TG, die Nachweisgrenzen bei 22,2 – 50 ng/L (CARBALLA ET AL., 2004, HAN ET AL., 2006, NENTWIG, 2006, VIENO ET AL., 2007). Die Wiederfindungsrate für CBZ liegen bei Werten von 67 – 75% (CARBALLA ET AL., 2004, OETKEN ET AL., 2005, HAN ET AL., 2006). Dies deutet darauf hin, dass CBZ im Sediment abgebaut wird oder in die Wasserpha-

se übergeht und dass die Organismen gegenüber geringeren Konzentrationen als die Nominalkonzentrationen exponiert wurden.

Carbamazepin ist eine relevante Umweltchemikalie und vor allem in Kläranlagen, aber auch in vielen Gewässern ubiquitär zu finden (TERNES, 1998). Nur etwa 3% werden unverändert freigesetzt, der Rest wird in veränderter Form (konjugiert, hydrolysiert) ausgeschieden; die Eliminierungsrate in den Kläranlagen beträgt etwa 7% (TERNES, 1998, BOUND & VOULVOULIS, 2004). Der Hauptgrund für die hohen Umweltkonzentrationen ist demnach die geringe Entfernungsrates während des Klärprozesses. Die Ablaufkonzentrationen schwanken von 0,29 – 2,4 µg/L, und die Frachtmengen betragen 0,013 – 2,75 kg/d (TERNES, 1998, TIXIER ET AL., 2003, FERRARI ET AL., 2003, WIEGEL ET AL., 2004, ZUCCATO ET AL., 2005, VIENO ET AL., 2007). In Oberflächengewässern findet man 0,02 – 2,1 µg CBZ/L, wobei die Gehalte in kleineren Gewässern oft höher sind (TERNES, 1998, SACHER ET AL., 1998, TIXIER ET AL., 2003, METCALFE ET AL., 2003, WIEGEL ET AL., 2004, BRUN ET AL., 2006).

Bis zu einer Konzentration von 2,5 mg CBZ/kg schlüpften die Weibchen früher, und in den beiden höchsten Konzentrationen war der Schlupf später als in der Kontrolle. Versuche von NENTWIG ET AL. (2004) und OETKEN ET AL. (2005) zeigten, dass CBZ in den höchsten Konzentrationen (die den Konzentrationen dieser Arbeit entsprachen) die Verpuppung und Emergenz von *C. riparius* hemmte (NOEC: 0,63 mg/kg). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich dieser Effekt erst in den höchsten Konzentrationen, dennoch besteht aufgrund der Effektkonzentrationen und der berechneten Umweltkonzentrationen (LIEBIG, 2005) ein Risiko für *C. riparius*. Der stark verzögerte Schlupf der Weibchen bei 10 mg CBZ/kg könnte aber ein Hinweis auf die in anderen Studien festgestellten Effekte von CBZ sein. Die LC₁₀ für das Überleben von *C. tentans* nach einer Exposition gegenüber CBZ in der Wasserphase lag bei 9,5 mg/L, die EC₁₀ für das Wachstum bei 2,6 mg/L (DUSSAULT ET AL., 2008). In der Studie von OETKEN ET AL. (2005) entsprach eine nominale Sedimentkonzentration von 10 mg CBZ/kg einer gemessenen Konzentration von 2,9 mg CBZ/kg. Im Überstandswasser wurden 2,9 mg CBZ/L gemessen. Damit können bei der höchsten untersuchten CBZ-Konzentration der vorliegenden Arbeit laut DUSSAULT ET AL. (2008) durchaus Effekte bei Chironomiden auftreten. In einer weiteren Studie mit *C. tentans*, die gegenüber CBZ im Sediment exponiert wurden, gab es allerdings bis zu 56 mg/kg keine toxischen Effekte (DUSSAULT ET AL., 2008).

Vermutlich wirkt CBZ hemmend auf einen bestimmten Stoffwechselprozess ein, der für die Entwicklung der Larve zur Puppe und letztendlich zum Imago eine wichtige Rolle spielt (NENTWIG ET AL., 2004). Ein alternativer Wirkmechanismus wäre die Beeinträchtigung der Tätigkeit der Juvenilhormone oder der Ecdysteroide (NENTWIG ET AL., 2004). AMBRÓSIO ET AL.

(2002) stellten fest, dass CBZ die Neurotransmitter bei Säugetieren rezeptorvermittelt hemmte, was die Theorie einer polaren Narkose als Wirkmechanismus von CBZ unterstützt (DUSSAULT ET AL., 2008). Vermutlich fehlen durch die narkotisierende Wirkung wichtige Signale für die Stoffwechselprozesse der Metamorphose.

Viele Studien über Pharmaka konzentrieren sich auf die Untersuchung der Konzentrationen der Substanzen in der Umwelt, sei es in Kläranlagenabläufen oder in Oberflächengewässern. Im Vergleich dazu berichten nur wenige Studien von Effekten auf aquatische Organismen. Für diese Studien werden häufig Wasserflöhe und Algen als Versuchsorganismus verwendet. Mit Ausnahme zweier Studien (NENTWIG ET AL., 2004, OETKEN ET AL., 2005) wurden alle Expositionen über die Wasserphase durchgeführt. Zudem gibt es kaum Daten zur chronischen Toxizität der Pharmaka, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Die Konzentrationen von Carbamazepin im LCT mit *C. riparius* lagen im Bereich von 0,6 bis 10 mg/kg. Die erhöhte Mortalität in der höchsten Konzentration hat vermutlich auch Auswirkungen auf ein Überleben der Population. Die NOEC für *C. riparius* war 10 mg/kg. Bei *Daphnia magna* hatte CBZ letale Effekte mit einer LC₅₀ (48 h) von 111 mg/L (HAN ET AL., 2006). Bei anderen Organismen liegen die akuten Effektschwellen bei 13,8 – 97,8 mg/L und die chronischen bei 0,01 – 50 mg/L (FERRARI ET AL., 2003, JOS ET AL., 2003, DE LANGE ET AL., 2006, KIM ET AL., 2007b).

Tab. 4.2: Effektkonzentrationen für Carbamazepin, angegeben in mg/kg.

Endpunkt	NOEC	LOEC
Mortalität	5	10
EmT ₅₀ (Weibchen)	5	10
Anzahl fruchtbare Gelege	2,5	5
Populationswachstumsrate	5	10

Die berechneten NOEC- und LOEC-Werte für Carbamazepin sind in der Tabelle 4.2 angegeben. Parameter, die bis zur höchsten Konzentration (10 mg/kg) keinen Effekt zeigten, sind nicht aufgeführt. Beim Parameter „Fruchtbare Gelege pro Weibchen“ zeigte schon das Lösemittel einen starken Effekt, so dass keine Berechnung der LOEC möglich ist, zudem zeigen die Mücken eine unterschiedliche Reaktion. Die geringere Wachstumsrate bei 10 mg/kg ist bedingt durch die erhöhte Mortalität und die geringere Eizahl.

Fluoxetin

Aufgrund der Tatsache, dass im Versuch mit Fluoxetin die gleichen Konzentrationen und die gleichen Sedimente wie bei NENTWIG (2006) verwendet wurden, wurde im Rahmen dieser Dissertation auf eine Rückstandsanalytik verzichtet. Aus diesem Grund wird angenom-

men, dass sich die Substanzen im vorliegenden Versuch ähnlich verhalten haben, wie in den Versuchen von NENTWIG (2006).

Die Wiederfindungsraten in der Literatur schwanken sehr stark mit Angaben von 35 – 107% (JOHNSON ET AL., 2005, BROOKS ET AL., 2005, VASSKOG ET AL., 2006, NENTWIG, 2006, CHRISTENSEN ET AL., 2007). Fluoxetin wird anscheinend rasch abgebaut, jedoch hat der Metabolit Norfluoxetin eine ähnliche Toxizität (KWON & ARMBRUST, 2006). Die Nachweisgrenze für Fluoxetin im Sediment beträgt 1 µg/kg, die Bestimmungsgrenze 12 µg/kg (KWON & ARMBRUST, 2006, NENTWIG, 2007). Die Nachweisgrenze für Fluoxetingehalte im Wasser liegt je nach Methode zwischen 0,25 und 1,6 µg/L, die Bestimmungsgrenze bei 120 pg/L (JOHNSON ET AL., 2005, VASSKOG ET AL., 2006).

Serotonin an sich hat viele artabhängige Eigenschaften, so dass veränderte Serotoninkonzentrationen verschiedene artspezifische Effekte haben können (RICHARDS & COLE, 2006). Derzeit sind fünf Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) auf dem Markt, wobei Citalopram, Fluoxetin und Paroxetin geringere tägliche Dosen im Vergleich zu Sertralin und Fluvoxamin benötigen (CHRISTENSEN ET AL., 2007). 1 – 2% werden als Ausgangssubstanz ausgeschieden, hinzu kommen noch aktive und inaktive Metabolite (CHRISTENSEN ET AL., 2007).

Alle SSRI haben prinzipiell den gleichen Wirkmechanismus. SSRI blockieren die Wiederaufnahme von Serotonin an den Synapsen. Serotoninrezeptoren wurden bei mehreren Fischarten nachgewiesen (BROOKS ET AL., 2005). Serotonin ist für einige biologische Funktionen der aquatischen Organismen (Fische, Krebstiere, Muscheln) wichtig und wird mit der Reifung der Gonaden, der Metamorphose, Verhaltensregulierung und der Laichung in Zusammenhang gebracht (HUBER ET AL., 1997, HENRY ET AL., 2004). DAUGHTON & TERNES (1999) berichteten in ihrem Review, dass Serotonin bei Krebstieren Neurohormone freisetzt und bei Mollusken die Reproduktion, das Verhalten und die Reflexe beeinflusst. Durch Hemmung von Cytochrom-P2-Enzymen kann Fluoxetin die Wirkung anderer Antidepressiva erhöhen (WONG ET AL., 1995). Bei Invertebraten ist der Wirkmechanismus von Fluoxetin und dessen Metaboliten unbekannt bzw. kaum verstanden (FONG, 1998, BROOKS ET AL., 2005). SSRI in der Umwelt können unter anderem Appetit, Immunsystem und Reproduktion der aquatischen Organismen verändern (FORAN ET AL., 2004).

Wenn in den Gewässern vorhanden, kann Fluoxetin die reproduktive und endokrine Funktion in Fischen beeinträchtigen (FORAN ET AL., 2004). Fluoxetin hat ein akkumulierendes Potential in Gewässern, was bedeutet, dass die Substanz auch in den Organismen akkumulieren kann (FORAN ET AL., 2004, BROOKS ET AL., 2005). Nach einem Eintrag ins Gewässer ver-

schwindet Fluoxetin sehr schnell aus der Wasserphase und verteilt sich im Sediment (KWON & ARMBRUST, 2006). Die Sedimentkonzentrationen sind mit durchschnittlich 1,8 mg/kg etwa 963 – 6 105 mal höher als die Wasserkonzentrationen (BROOKS ET AL., 2005).

Das Wissen über das Umweltverhalten von Fluoxetin, das Vorkommen in Sedimenten und Gewässern sowie die mögliche Wirkung auf aquatische Organismen ist noch gering (BROOKS ET AL., 2003a, b). Die Fluoxetinkonzentrationen in Oberflächengewässern sind jedoch hoch genug, um Effekte bei aquatischen Lebensgemeinschaften hervorzurufen (RICHARDS ET AL., 2004, HENRY ET AL., 2004). Fluoxetin ist zudem nicht die einzige Substanz, die als Serotonin-Wiederaufnahmehemmer wirkt, und somit kann der gleichzeitige Eintrag der fünf verschiedenen SSRI mit ähnlichem Wirkmechanismus die Effekte der einzelnen Substanzen verstärken. Andere Pharmaka (z.B. Ciprofloxazin, Ibuprofen) können ebenfalls gemeinsam mit den SSRI additive Wirkungen erzeugen (RICHARDS ET AL., 2004). Für Fluoxetin stehen die meisten ökotoxikologischen Daten zur Verfügung, jedoch fand in fast allen Studien die Exposition über die Wasserphase statt.

Tab. 4.3: Effektkonzentrationen für Fluoxetin, angegeben in mg/kg.

Endpunkt	NOEC	LOEC
EmT ₅₀ (Weibchen)	0,2	0,4
EmT ₅₀ (Männchen)	0,2	0,4
Gewicht (Weibchen)	2,3	5,9

Die berechneten NOEC- und LOEC-Werte für Fluoxetin sind in der Tabelle 4.3 angegeben. Parameter, die bis zur höchsten Konzentration (5,9 mg/kg) keinen Effekt zeigten, sind nicht aufgeführt. Obwohl bei der Mortalität statistisch signifikante Unterschiede auftraten, ist dies biologisch nicht relevant, da 100% der Kontrolltiere überlebten und die Tiere generell eine gute Fitness zeigten. Die signifikant weniger Gelege und die vermehrte Unfruchtbarkeit derselben bei 0,9 mg/kg sind als Ausreißer zu betrachten, da die anderen Konzentrationen bei diesen Parametern ein einheitliches Bild zeigen. Die geringere Populationswachstumsrate bei 0,9 mg FX/kg ist dann auch bedingt durch die höhere Mortalität und die geringere Gelegezahl. Die Gelege der exponierten Tiere waren generell kleiner als in der Kontrolle, nur in der höchsten Konzentration waren sie größer. Dies ist vermutlich ebenfalls ein Ausreißereffekt.

Wie bei der Studie von NENTWIG (2007) hatte Fluoxetin auf das Überleben von *Chironomus riparius* keinen Effekt. Versuche mit *C. tentans* ergaben eine LC₅₀ (10 d) von 15,2 mg/kg, wobei höhere Fluoxetinkonzentrationen (1,4 – 22,4 mg/kg) untersucht wurden als im vorliegenden Versuch (BROOKS ET AL., 2003b). Bei einer Exposition gegenüber Fluoxetin schlüpf-

ten die Mücken generell später als in der Kontrolle mit einer NOEC (Emergenz) von 0,2 mg/kg. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von BROOKS ET AL. (2003b), die zeigen konnten, dass Fluoxetin auf *C. tentans* einen wachstumsverzögernden Effekt hatte. In einem Versuch mit *C. riparius* mit den gleichen Konzentrationen wie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur in der höchsten Konzentration ein Effekt auf die Emergenz (NENTWIG, 2007). Die LOEC (Wachstum) für *C. tentans* lag bei 1,3 mg/kg und für *C. riparius* bei 1,12 mg/kg. Damit reagiert *C. riparius* in diesem Endpunkt ähnlich empfindlich auf Fluoxetin als *C. tentans*. Die etwas höhere LOEC für *C. tentans* kann aber auch daher kommen, dass keine geringeren Konzentrationen als 1,4 mg/kg getestet wurden (BROOKS ET AL., 2003b). Chironomiden reagieren vermutlich aufgrund der höheren Exposition durch die Aufnahme über das Sediment empfindlicher auf Fluoxetin als *Hyallela azteca* (BROOKS ET AL., 2003b).

Beim Gewicht als Endpunkt zeigte sich, dass die Weibchen mit einer NOEC von 2,3 mg/kg empfindlicher sind als die Männchen. Die Tatsache, dass die exponierten Weibchen im vorliegenden Versuch stets tendenziell schwerer als in der Kontrolle waren, lässt sich ebenfalls durch die wachstumsverzögernden Effekte von Fluoxetin erklären. Wenn Weibchen nicht zur Eiablage kommen, sind sie oft schwerer als die anderen Weibchen. Dies ist in diesem Fall aber keine Erklärung des höheren Trockengewichtes, da kein Zusammenhang mit der Anzahl der Gelege pro Weibchen besteht. Generell produzierten die exponierten Weibchen mehr Gelege als in der Kontrolle, signifikante Effekte traten jedoch nicht auf (NOEC: 5,9 mg/kg). Die vermehrt unfruchtbaren Eigelege bei 0,9 mg/kg sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FORAN ET AL. (2004), die Effekte von SSRI auf den Japanischen Reiskörpfling (*Oryzias latipes*) untersuchten. Sie vermuteten, dass die Fekundität aufgrund der durch die Wirkung von Fluoxetin erhöhten Serotoninkonzentrationen verringert wird, und dass die Reproduktion von den Serotoningehalten abhängig ist (HERNANDEZ-RAUDA ET AL., 1999, AZMITIA, 1999, FORAN ET AL., 2004). Bei Versuchen mit Wasserflöhen und *Hyallela azteca* zeigte eine Exposition gegenüber Fluoxetin jedoch eine Stimulierung der Fekundität, was die Forscher mit erhöhten Serotoninkonzentrationen in den Synapsen erklärten (BROOKS ET AL., 2003b).

Fluoxetin wird, basierend auf Modellen und nicht auf experimentellen Beweisen, generell als eine abbaubare Substanz eingestuft (CARLSSON ET AL., 2006). Sedimentanalysen von NENTWIG (2006) bestätigen diese Annahme und zeigen, dass am Ende eines Versuches die Fluoxetinkonzentrationen deutlich abgenommen haben, und dass deutlich mehr Norfluoxetin vorhanden war als am Anfang. Berechnungen und Vergleiche der Gesamtkörperdosen zeigen, dass bei aquatischen Organismen schon bei viel geringeren Konzentrationen als bei

vergleichbaren pharmakologisch aktiven Konzentrationen in Säugetieren Effekte auftreten können (FENT ET AL., 2006). Die LOEC für Fluoxetin für das Zooplankton und für benthische Organismen ist nah an den gemessenen maximalen Konzentrationen in den Kläranlagenabläufen. Der Sicherheitsbereich ist demnach gering, so dass chronische Effekte, speziell an hochbelasteten Stellen und unter Berücksichtigung der möglichen Mischungseffekte, nicht auszuschließen sind (FENT ET AL., 2006).

4.1.3 Pestizide

Endosulfan

Die Umweltkonzentrationen von Endosulfan liegen bei 43 – 639 µg/kg bzw. 0,08 – 0,2 µg/L (GÜLDEN ET AL., 1997, JERGENTZ ET AL., 2004, WAN ET AL., 2005). Abhängig von der Ausgangssubstanz (α - oder β -Endosulfan, Endosulfansulfat) liegt die 10-d-LC₅₀ für *Chironomus tentans* bei 0,96 – 5,22 mg/kg organischer Kohlenstoff (YOU ET AL., 2004). *C. plumosus* zeigte eine LC₅₀ (24 h) von 24 µg/L (JERGENTZ ET AL., 2004). Die akuttoxischen Konzentrationen von Endosulfan für andere Invertebraten und Fische liegen bei 0,7 – 1 600 µg/L bzw. 162 µg/kg (LEIGHT & VAN DOLAH, 1999, LEONARD ET AL., 2001, WAN ET AL., 2005). Vergleichende Untersuchungen zur Sediment- und Wassertoxizität von Endosulfan und dessen Isomeren zeigten, dass die Toxizitäten der Substanzen bei einer Wasserexposition deutlich höher als bei einer Sedimentexposition waren (LEONARD ET AL., 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Endosulfan in gelöster Form von den Organismen aufgenommen wird (LEONARD ET AL., 2001).

Endosulfan ist für aquatische Invertebraten weniger toxisch als für Fische, dennoch verursacht eine Exposition eine Abnahme der Sauerstoffaufnahme, der Fettsäurekonzentration in der Hämolymphe, der Succinatdehydrogenase und des Herzschlags und verändert die Osmoregulierung (NAQVI & VAISHNAVI, 1993). Endosulfan ist auch bekannt dafür, dass sie bei Organismen die Nahrungsaufnahme hemmt, die neurologische Funktionen beeinträchtigt und auch die metabolischen Aktivitäten verlangsamt (NAQVI & VAISHNAVI, 1993, ELLIS-TABANOR & HYSTOP, 2005).

Bei der Exposition der Chironomiden im Lebenszyklustest waren nur die Mortalität (NOEC: 4,5 µg/kg, LOEC: 15 µg/kg) und die Fruchtbarkeit der Gelege (NOEC: < 4,5 µg/kg, LOEC: 4,5 µg/kg) empfindliche Parameter. Jedoch sind die Effekte auf das Überleben nicht von einer biologischen Relevanz. Im allgemeinen führte eine Exposition gegenüber Endosulfan zu einem leicht verzögerten Schlupf bei beiden Geschlechtern. Die Gelegegrößen sowie die Populationswachstumsraten waren tendenziell negativ beeinflusst. In einem Labor- und

Feldversuch hemmten 0,55 – 2,3 µg/L Endosulfan das Wachstum von *C. riparius*, wohingegen die larvale Entwicklung nicht beeinträchtigt wurde (FARIA ET AL., 2007). Eine Verminderung des Wachstums von Chironomiden kann zu einer reduzierten Fitness mit folgender Abnahme der Populationsdichte führen, was auch bei anderen Invertebraten nach einer Exposition gegenüber Endosulfan festgestellt wurde (LIBER ET AL., 1996, SIBLEY ET AL., 1997b, ELLIS-TABANOR & HYSTOP, 2005). Endosulfan reduziert bei anderen Invertebraten ebenfalls die Fekundität und die Wachstumsrate (FERNANDEZ-CASALDERRY ET AL., 1993, ELLIS-TABANOR & HYSTOP, 2005, XI ET AL., 2007). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint *C. riparius* empfindlicher als andere Arten auf Endosulfan zu reagieren.

Es wird oft vermutet, dass schwere Weibchen nicht zur Eiablage gekommen sind. Bei der Untersuchung dieser Theorie bei den Experimenten fällt auf, dass bei den Pestiziden Endosulfan und Tributylzinn die beiden Endpunkte Gewicht der Weibchen als auch Gelege pro Weibchen zum Teil sehr unterschiedliche Kurvenverläufe haben. Die Überprüfung der Korrelation zwischen beiden Endpunkten zeigte nur für Endosulfan einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Eigelegezahl pro Weibchen und dem Trockengewicht der Weibchen ($p = 0,023$), so dass diese Theorie in diesem Fall wohl zutrifft (Abbildung 4.1).

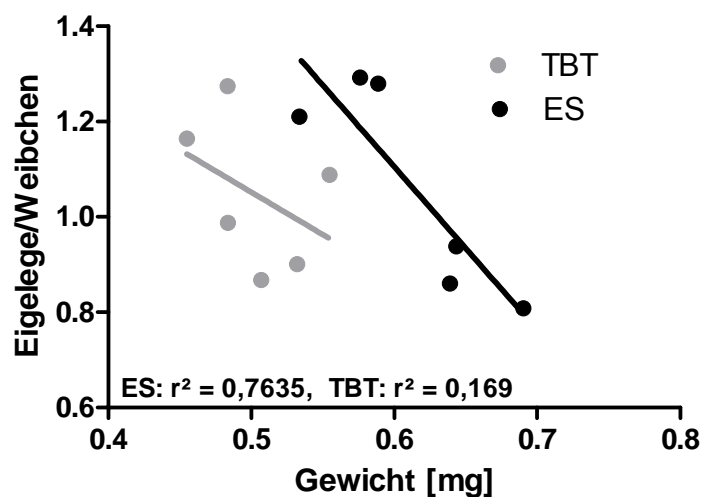


Abb. 4.1: *Chironomus riparius* und Pestizidexposition. Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Endpunkten Gewicht der Weibchen und Eigelege pro Weibchen. Die Konzentrationen (K1-K5) für Tributylzinn (TBT) sind 50; 80; 100; 120 und 160 µg/kg und für Endosulfan (ES) 4,5; 15; 45; 150 und 450 µg/kg.

Tributylzinn

Die Analytik der mit Tributylzinn (TBT) dotierten Sedimente ergab Wiederfindungsraten von 18,0 – 74,8% (siehe Kapitel 3.1.3). Bis auf die höchste Konzentration waren die gemessenen Konzentrationen immer niedriger als die nominalen Konzentrationen. Die Wiederfindungsrate des Referenzmaterials im Sediment betrug 93% und die Bestimmungsgrenze lag bei 1 µg/kg TG. Diese Werte sind geringer als genannte Wiederfindungsraten von 80 – 97% (PADRÓS ET AL., 2003), jedoch höher als die Ergebnisse von VOGT ET AL. (2007a). Vermutlich sind die unterschiedlichen Wiederfindungsraten auf die unterschiedlichen Sedimente zurückzuführen. Das Sediment in den Versuchen von VOGT ET AL. (2007a) bestand nur aus Quarzsand im Gegensatz zum vorliegenden Versuch, der mit standardisiertem Sediment durchgeführt wurde.

Tributylzinn ist eine der toxischsten Organozinnverbindungen (OZV) und war ab 1960 bis 2002 aufgrund der bioziden Eigenschaften ein wichtiger Bestandteil der Antifoulinganstriche für Schiffsrümpfe (BUA, 2003). TBT verhindert den Aufwuchs von Meeresorganismen und hilft somit, den Treibstoffverbrauch der Schiffe zu senken. OZV finden sich auch in Pflanzen- und Holzschutzmitteln, als Stabilisatoren in Kunststoffen und werden in der Textilindustrie (Windeln, Sportkleidung) sowie bei der Papierherstellung verwendet (SATTELBERGER, 2002). Frankreich war das erste Land, das den Einsatz von Antifoulinganstrichen gesetzlich regelte, nachdem in der Austernzucht Schalendeformitäten festgestellt wurden (OEHLMANN, 2004). Die Verwendung von organozinnhaltigen Schiffsanstrichen wurde 1982 für kleine Boote verboten, und seit 1987 gibt es auch in anderen Staaten ähnliche Regelungen. In der EU wurde der Einsatz von OZV in Antifoulinganstrichen für Schiffe unter 25 m Länge bereits 1989 reguliert. Die aktuelle legislative Regelung erfolgte durch die Internationale Maritimorganisation (IMO), die 2002 ein Verbot für die Verwendung von organozinnhaltigen Schiffsanstrichen für alle Boote und Schiffe ab 2003 aussprach und die Anwesenheit dieser Anstriche auf Schiffsrümpfen nur noch bis 2008 erlaubt (IMO, 2002).

Bei aquatischen Organismen kann TBT bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen das Wachstum beeinflussen und Missbildungen hervorrufen. Dadurch sind vor allem bei einer längeren Exposition insbesondere juvenile Fische, Muscheln und Krebstiere sowie deren Larven gefährdet (SATTELBERGER, 2002). TBT ist die bisher einzig bekannte androgen wirkende, nicht steroidale Substanz, die bei Neogastropoden die Cytochrom P450-Aromatase, ein wichtiges Enzym für die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen, hemmt (FENT & BUCHELI, 1994, BETTIN ET AL., 1996, SATTELBERGER, 2002, OEHLMANN & SCHULTE-OEHLMANN, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft wird TBT in die Schadstoffklasse der endokrinen Disruptoren eingeordnet. Durch die Inaktivierung der Aromatase führt TBT bei weiblichen Schne-

cken zu Vermännlichungserscheinungen. Süßwasserschnecken scheinen bezüglich der Induktion von Imposex mit einer etwa 28-fach höheren LOEC weniger empfindlich als marine Schneckenarten zu sein (SATTELBERGER, 2002). Studien mit *C. riparius* zeigten bereits im µg/L-Bereich deutliche akuttoxische Effekte (FARGAŠOVÁ, 1998, HAHN & SCHULZ, 2002, GILDEMEISTER, 2007).

Der LCT mit *C. riparius* wurde mit Konzentrationen von 50 – 160 µg Sn/kg durchgeführt und zeigte keine populationsrelevanten Effekte auf die Mortalität. Dies ist konsistent mit den Daten von DAY ET AL. (1998), die bis zu einer Konzentration von 12,3 mg/kg keine Effekte auf die Mortalität bei *C. riparius* gefunden haben. Andere Studien zeigten hingegen, dass Chironomiden weitaus empfindlicher auf OZV reagieren, mit LC₅₀-Werten von 0,02 – 2,95 µg/L (96 h; FARGAŠOVÁ, 1998) beziehungsweise 7,5 – 51,1 µg/L (24 h; VOGT ET AL., 2007b). Die chronische LC₅₀ von TBT bei *C. riparius* liegt zwischen 6,7 und 8 µg Sn/kg (VOGT ET AL., 2007b). Obwohl Huminsäuren die Bioverfügbarkeit von TBT für benthische Organismen verringern können, ist es unwahrscheinlich, dass die Huminsäuren aus dem Torf im verwendeten Sediment der Grund dafür sind, dass sich in den Versuchen dieser Arbeit keine Mortalitätseffekte zeigen, da relativ große Mengen Huminsäuren nötig sind, um eine merkliche Reduzierung der Bioverfügbarkeit herbei zu führen (LOOSER ET AL., 1998, 2000, SATTELBERGER, 2002).

Eine Exposition gegenüber TBT wirkt bei den Weibchen leicht schlupfverzögernd mit deutlicheren Effekten als bei den Männchen. VOGT ET AL. (2007a) fanden in ihren Versuchen auch eine Schlupfverzögerung, jedoch keine Effekte auf die Dauer der Emergenz. Auch bei anderen aquatischen Organismen wirkte eine Exposition gegenüber TBT und/oder anderen OZV wachstumshemmend (DAY ET AL., 1998, HAHN & SCHULZ, 2002, RÜDEL ET AL., 2003, LEUNG ET AL., 2007). Die Gewichtsabnahme der Männchen in den höchsten Konzentrationen ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von VOGT ET AL. (2007a). Auf die weiteren Endpunkte hatte TBT keinen Effekt (NOEC: 160 µg Sn/kg). Bei VOGT ET AL. (2007a) hatte TBT keinen Einfluss auf die Eigelegegröße oder die Fruchtbarkeit der Eigelege, jedoch war die Eiablage in den beiden höchsten Konzentrationen gehemmt. Andere Studien, vor allem mit Mollusken, zeigen deutliche negative Effekte von OZV auf die Reproduktion (DAY ET AL., 1998, CZECH ET AL., 2001, SATTELBERGER, 2002, DUFT ET AL., 2003a, LEUNG ET AL., 2007).

Die berechneten NOEC- und LOEC-Werte für Tributylzinn sind in der Tabelle 4.4 angegeben. Parameter, die bis zur höchsten Konzentration (160 µg Sn/kg) keinen Effekt zeigten, sind nicht aufgeführt. Obwohl bei der Mortalität statistisch signifikante Unterschiede auftraten, ist dies biologisch nicht relevant, da die Tiere generell eine gute Fitness zeigten

und die Mortalitäten der einzelnen Konzentrationen unter dem Validitätsgrenze der OECD lagen. Die geringere Populationswachstumsrate bei 100 µg Sn/kg ist dann auch bedingt durch die höhere Mortalität und der verzögerte Schlupf der Weibchen.

Tab. 4.4: Effektkonzentrationen für Tributylzinn, angegeben in µg Sn/kg.

Endpunkt	NOEC	LOEC
EmT ₅₀ (Weibchen)	80	100
Gewicht (Männchen)	100	120
Anzahl fruchtbare Gelege	120	160

4.1.4 Synthetische Hormone

17α-Methyltestosteron

Androgene oder Substanzen mit ähnlichen Effekten kommen in den Kläranlagenausläufen in Konzentrationen von 2 – 4 033 ng/L Dihydrotestosteronäquivalenten vor; diese Konzentrationen sind somit auch höher als die der Steroidöstrogene (RODGERS-GRAY ET AL., 2000, THOMAS ET AL., 2002, LEÓN ET AL., 2007). In Flüssen wurden bis zu 100 ng/L Androgene nachgewiesen (JENKINS ET AL., 2001, DURHAN ET AL., 2002). Aufgrund der anabolen und androgenen Eigenschaften werden Androgene unter anderem in der Fisch- und Rinderzucht eingesetzt (VICK & HAYTON, 2001, ANKLEY ET AL., 2003, JENSEN ET AL., 2006). Milchwirtschaftsbetriebe, Oberflächenabfluss in Regenzeiten und Aquakulturen tragen auch zu den Steroidkonzentrationen in Oberflächengewässern bei (KOŁODZIEJ ET AL., 2004). Steroidhormone werden von den Fischen in Zeiten vor und nach der Reproduktion ausgeschieden, und die Freisetzungsraten der Androgene sind mit Mengen von 170 – 1 000 µg/d ähnlich hoch wie die der Östrogene (KOŁODZIEJ ET AL., 2004). Die vorhergesagte Umweltkonzentration von Methyltestosteron (MET) liegt bei 0,4 ng/L (SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004). Die Konzentrationen der Hormone in der Umwelt haben möglicherweise negative Effekte auf aquatische Organismen (JENSEN ET AL., 2006).

MET ist ein synthetischer und aromatisierbarer androgener Rezeptoragonist (TILLMANN ET AL., 2001, SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004, SELZSAM ET AL., 2005). Die meisten androgenen Substanzen aktivieren die androgenrezeptor-regulierte Transkription in Säugerzellen durch rezeptorregulierte Mechanismen (FANG ET AL., 2003). Viele ökotoxikologische Studien zu MET wurden mit Schnecken und Fischen durchgeführt. Die Studien mit Insekten beschäftigten sich eher mit terrestrischen Insekten. Es gibt nur wenige Studien mit anderen aquatischen Invertebraten, so dass der Vergleich der Ergebnisse nicht einfach ist. Trotz Nachweis von Testosteron und Östrogenen in Insekten und Invertebraten ist deren physiologische

Rolle immer noch unklar (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001, JANER ET AL., 2005). In einem *Drosophila*-Zellinientest zeigte MET bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M keine Aktivität als Ecdysteroidantagonist oder -agonist (DINAN ET AL., 2001). Da Ecdysteroiden (Häutungshormone der Insekten) eine signifikant andere chemische Struktur als Wirbeltier-Steroidhormone haben, ist es unwahrscheinlich, dass letztere wie Hormone bei Insekten wirken (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001).

Chironomus riparius wurde in einem Lebenszyklustest gegenüber 3 – 243 µg MET/kg exponiert. Die Exposition hatte keinen negativen Effekt auf das Überleben, was auch schon in einer Studie mit Spitzschlammschnecken (*Lymnaea stagnalis*) festgestellt wurde (CZECH ET AL., 2001). Zwischen der EmT_{50} der Männchen und Weibchen bei der Kontrolle lagen 2,23 Tage, dies ist mehr als bei den Ansätzen, die gegenüber MET exponiert waren. Der große Unterschied zwischen den Schlupfzeitpunkten der Kontrolltiere ist mit ein Grund dafür, dass sich Effekte von Methyltestosteron auf die Reproduktion bemerkbar machten. Dies ist aber nicht unbedingt ein Hinweis auf eine nachteilige Wirkung der Substanz. Jedoch ist der Schlupfabstand der Geschlechter, verglichen mit den anderen Versuchen der vorliegenden Arbeit, im normalen Bereich.

Die wachstumsbezogenen Effekte bei anderen Organismen sind sehr widersprüchlich. So kommt es bei einer Exposition gegenüber (Methyl-)testosteron sowohl zu verlangsamten Entwicklungen als auch zu einer Wachstumsförderung (VICK & HAYTON, 2001, PARROTT & WOOD, 2002, MU & LEBLANC, 2002). Im vorliegenden Versuch sind die Effekte von MET auf das Wachstum und die Entwicklung der Mücken nicht eindeutig, jedoch zeigten sich bei der Emergenz und dem Gewicht deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Wachstum zeigten sich auch bei Reisfischen (LEÓN ET AL., 2007). Die Autoren begründen diese Unterschiede mit geschlechtsspezifischen Metabolismen. Letztendlich überwiegen bei den Mücken die wachstumsfördernde Effekte von Methyltestosteron, da bei allen Konzentrationen (außer 9 µg MT/kg) signifikant höhere Populationswachstumsraten als in der Kontrolle festzustellen waren.

Die größeren Eigelege bei höheren MET-Konzentrationen im vorliegenden Versuch sind ein Hinweis auf eine mögliche östrogene Wirkung von MET durch die Umwandlung zu Methylöstradiol (PARROTT & WOOD, 2002). Die LOEC- bzw. EC_{50} -Werte von MET bei Fischen und Mollusken liegen im Bereich von 0,01 – 0,5 µg/L (ANKLEY ET AL., 2003, SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004, JENSEN ET AL., 2006). Generell zeigten die durchgeführten Studien mit Invertebraten und Fischen negative Effekte auf die Fekundität der Weibchen sowie auf die Eizahlen und die Embryoproduktion (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001, MU & LEBLANC, 2002, ANKLEY ET AL., 2003,

SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004, JENSEN ET AL., 2006), wie es auch in der vorliegenden Studie der Fall ist. Die beobachteten Effekte beruhen vermutlich eher auf toxische Wirkung der Substanz als auf eine Störung der Ecdysteroide oder deren Rezeptoren (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001). Die Embryotoxizität ist vermutlich ein alleiniges Phänomen von Wirbeltierandrogenen, da eine gleichzeitige Exposition gegenüber 20-Hydroxyecdysol die Wirkung aufhebt (MU & LEBLANC, 2002). Dies ist zudem ein Hinweis darauf, dass Methyltestosteron als Ecdysteroidantagonist wirken kann (MU & LEBLANC, 2002).

Bei vielen untersuchten Organismen hatten niedrige Konzentrationen von Methyltestosteron und anderen Androgenen vermännlichende Effekte (VERMA & FLICKINGER, 1971, PARROTT & WOOD, 2002, MU & LEBLANC, 2002, ANKLEY ET AL., 2003). Höhere Konzentrationen führen dagegen eher zu verweiblichenden Effekten (TILLMANN ET AL., 2001, PARROTT & WOOD, 2002, ANKLEY ET AL., 2003, SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004, JENSEN ET AL., 2006). Vermutlich wirkt MET auch als Östrogenrezeptor-Agonist (ANKLEY ET AL., 2003). Die vermehrt festgestellten östrogenähnlichen Effekte von MET aufgrund der Umwandlung zu Methylöstradiol oder anderen östrogenen Derivaten deutet darauf hin, dass Methyltestosteron nicht unbedingt die beste Wahl als Modell-Androgen ist (PARROTT & WOOD, 2002).

Nur beim Gewicht der Männchen und der Anzahl der fruchtbaren Gelege war eine NOEC- und LOEC-Berechnung möglich. In beiden Fällen lag die NOEC bei 9 µg/kg und die LOEC bei 27 µg/kg. Die Effekte auf das Gewicht der Männchen zeigte in den höchsten Konzentrationen ein einheitliches Bild, jedoch ist zu beachten, dass sich Effekte des Lösemittels bemerkbar machen können, da der Unterschied zur Kontrolle signifikant war. Die signifikanten Unterschiede der Mortalität der exponierten Mücken im Vergleich zur Kontrolle sind bedingt durch die schlechte Fitness der Kontrolltiere. Aus diesem Grund kann für die Mortalität, die EmT_{50} und die PWR keine Berechnung vorgenommen werden.

17 α -Ethinylöstradiol

In Europa liegen die Ethinylöstradiol-Konzentrationen im Abwasser bei 0,4 – 10 ng/L (SPENGLER ET AL., 2001, MEREGALLI & OLLEVIER, 2001, HEBERER, 2002). In den Oberflächengewässern liegen die Konzentrationen bei 0,2 – 4 ng/L, in den meisten Fällen sogar unter 0,1 ng/L (HENSE ET AL., 2005, KRISTENSEN ET AL., 2005). In Sedimenten wurden 0,05 – 22,8 mg/kg Ethinylöstradiol (EE₂) gemessen (TERNES ET AL., 2002, KUSTER ET AL., 2004). Aufgrund der Umweltkonzentrationen ist (vom endokrinen Potential abgesehen) nicht von einer generellen Toxizität auszugehen (HENSE ET AL., 2005). Ethinylöstradiol kommt in der aquatischen Umwelt in Konzentrationen vor, die bei Fischen die Reproduk-

tion beeinflussen. Der NOEC für Ethinylöstradiol bei verschiedenen Fischarten liegt im Bereich von 10 ng/L (SCHOLZ & GUTZEIT, 2000, LÄNGE ET AL., 2001, SCHULTZ ET AL., 2003, KRISTENSEN ET AL., 2005). Die Spannweite der Effektschwellenwerte von EE₂ ist sehr groß und umfasst bei anderen Invertebraten 0,001 – 88 µg/L; Mortalitäten treten bei 0,7 – 1,1 mg/L auf (ANDERSEN ET AL., 2001, DUFT ET AL., 2007).

Der LCT mit *Chironomus riparius* wurde mit 3 – 243 µg EE₂/kg durchgeführt. Das Überleben war nicht beeinflusst und entspricht weiteren Studien mit LC₅₀-Werten (1 – 10 d) für *C. riparius* von 8,83 – 9,14 mg/L (MEREGALLI & OLLEVIER, 2001, SEGNER ET AL., 2003, LEE & CHOI, 2007). Bei nicht-umweltrelevanten Konzentrationen (1 mg/L) wurde die Larvenentwicklung negativ beeinflusst, die Verpuppung und das Wachstum behindert sowie eine generelle Toxizität von EE₂ auf den gesamten Organismus festgestellt (SEGNER ET AL., 2003, WATTS ET AL., 2003). In der vorliegenden Studie wurden umweltrelevante Konzentrationen getestet, was vermutlich der Grund für die festgestellten Unterschiede und die stets geringeren Effekte ist.

In einer Studie von WATTS ET AL. (2001) schlüpfen die Mücken früher als in der Kontrolle, und die Männchen schlüpfen signifikant früher als die Weibchen. Der Anteil der geschlüpften Adulten und die EmT₅₀ wird im vorliegenden Versuch durch eine EE₂-Exposition beeinflusst, allerdings gibt es keine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Beide Geschlechter reagierten ähnlich auf eine Exposition gegenüber EE₂. Die Emergenz war bei den Weibchen stärker beeinflusst. Der große Unterschied zwischen den Schlupfzeitpunkten der Kontrolltiere ist mit ein Grund dafür, dass sich Effekte bemerkbar machten. Dies ist aber nicht unbedingt ein Hinweis für eine nachteilige Wirkung von EE₂. Auffällig ist, dass sich die Schlupfzeitpunkte der Geschlechter mit zunehmender Konzentration immer mehr annäherten. Dies steht im Kontrast zu der Studie von WATTS ET AL. (2001). In der ebenfalls mit Chironomiden durchgeführten Studie von LEE und CHOI (2007) hemmte EE₂ den Schlupf bei 100 µg/L, so dass die Gesamtemergenzrate abnahm. Der Verwandlung von der Larve zum Adulten war dort im Vergleich zu der Umwandlung von der Puppe zum Adulten stärker gehemmt. Die Effekte auf den Schlupf der Chironomiden kann durch Interaktionen von östrogenen Chemikalien mit den Ecdysteroidrezeptoren von *C. riparius* verursacht werden (SEGNER ET AL., 2003).

Das erhöhte Trockengewicht bei den exponierten Männchen ist ein Hinweis darauf, dass EE₂ physiologische Prozesse von *C. riparius* stört. Es kann aber auch auf eine Absenkung des Wassergehalts in den Larven und somit auf Veränderungen der larvalen osmoregulatorischen Prozesse deuten (LEE & CHOI, 2007). Bei anderen Organismen hatte EE₂ deutliche

wachstumsverringende Effekte (PARROTT & WOOD, 2002, ZHA ET AL., 2007). Bei *Lumbriculus variegatus* hatte Ethinylöstradiol bei einer Konzentration von 300 µg/kg Sediment keine Effekte auf Wachstum und Reproduktion (LIEBIG ET AL., 2005). Mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration gab es generell mehr fruchtbare Gelege pro Weibchen als in der Kontrolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu mehr Weibchen festgestellt, im Gegensatz zu anderen Studien mit *C. riparius* (WATTS ET AL., 2001, LEE & CHOI, 2007). In diesen Studien hatte eine Exposition gegenüber EE₂ signifikante Effekte auf die Zahl der Adulten und das Geschlechterverhältnis. Vermutlich liegen diese Unterschiede in der Natur der angewendeten Tests begründet: LEE und CHOI (2007) untersuchten die Effekte auf Larven im 4. Stadium. Auch andere untersuchte Organismen zeigten eine Verweiblichung (PARROTT & WOOD, 2002, KRISTENSEN ET AL., 2005, PETTERSSON & BERG, 2007). Die Exposition gegenüber niedrigen Konzentrationen (< 4 ng/L) hatte vorrangig Effekte auf die Männchen, wohingegen bei höheren Konzentrationen auch die Weibchen beeinflusst wurden (PARROTT & WOOD, 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass EE₂ den Anteil der Weibchen reduzierte (PARROTT & BLUNT, 2005).

In die Berechnung der Populationswachstumsrate fließen viele der oben genannten Endpunkte mit ein. Der große Unterschied zwischen den Schlupfzeitpunkten der Kontrolltiere hat Folgen für die weiteren Parameter, zum Beispiel weniger, kleinere und vermehrt unfruchtbare Eigelege. Bei exponierten Mücken waren die Wachstumsraten durchweg höher als in der Kontrolle, was eine logische Folge des oben genannten ist. Dies ist aber nicht unbedingt ein Hinweis für eine nachteilige Wirkung von EE₂.

Die signifikanten Unterschiede der Mortalität und auch der generell verfrühter Schlupf der exponierten Mücken im Vergleich zur Kontrolle sind wie bei Methyltestosteron bedingt durch die schlechte Fitness der Kontrolltiere. Aus diesem Grund kann für die Mortalität, die EmT₅₀ und die PWR keine Berechnung einer NOEC oder LOEC vorgenommen werden. Auch für die anderen Parameter waren die Effekte auf die einzelnen Parameter nicht eindeutig, so dass die NOEC für alle Parameter bei 243 µg EE₂/kg liegt.

4.1.5 Insektizide

Methopren

Seit der Entdeckung der chemischen Struktur der Insekten-Juvenilhormone in 1967 wurden synthetische Analoge produziert, die „Insektizide der dritten Generation“ genannt wurden

(ROLLER ET AL., 1976). Diese Insektizide (auch als Insektenwachstumsregulatoren bekannt) sind weniger toxisch und wurden speziell entwickelt, um bei der Anwendung gegen Schadinsekten die Belastung der Nahrung und der Umwelt möglichst gering zu halten (CAMPICHE ET AL., 2006). Methopren ist einer der am weitesten verbreiteten Insektenwachstumsregulatoren (GHEKIERE ET AL., 2006b).

Methopren gelangt entweder durch die direkte Applikation oder durch den indirekten Eintrag durch Oberflächenabfluss oder Erosion von angrenzenden behandelten landwirtschaftlichen Flächen in die Gewässer (DHADIALLA ET AL., 1998). Die Umweltkonzentrationen werden auf etwa 10 µg/L geschätzt (HERSHEY ET AL., 1995, INGERSOLL ET AL., 1999). Die aktuellen Methoprenkonzentrationen und auch die Zusammensetzung der Abbauprodukte sind abhängig von den physikalischen, chemischen und biologischen Merkmalen des Gebietes (SCHOFF & ANKLEY, 2004).

Methopren hat eine geringe Phytotoxizität, eine sehr niedrige Säugertoxizität und ist leicht toxisch für tropische limnische Fische und Kaltwasserfische (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999). Obwohl die amerikanische Umweltbehörde (US-EPA) keine besonderen Effekte, die auf ein signifikantes Risiko schließen lassen, feststellen konnte, wiesen verschiedene Forscher negative Effekte auf Nicht-Zielorganismen, insbesondere Krebstiere, nach (MCKENNEY & CELESTIAL, 1996, US-EPA, 2001, OLMSTEAD & LEBLANC, 2001a, MU & LEBLANC, 2004). Eine Studie von HERSHEY ET AL. (1998) zeigte, dass Methopren für sehr viele aquatische Insektenarten toxisch ist und dass hauptsächlich Chironomiden betroffen sind. Zu den Effekten, die bei aquatischen Insekten festgestellt wurden, zählen unter anderem Effekte auf Entwicklung, Wachstum, Morphologie, Mortalität, Population und Reproduktion (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999). Jedoch wird die Wirkung von Methopren als geringfügig eingestuft, da die Substanz schnell abgebaut wird und die Insektenpopulationen sich nach einer Exposition schnell erholen (GLARE & O'CALLAGHAN, 1999).

Bezüglich der Wirkung ist Methopren einer der effektivsten Juvenilhormon-Analoga (DHADIALLA ET AL., 1998). Da die Puppen in ihrer Entwicklung zum adulten Tier gehemmt werden, ist die normale Entwicklung der Insekten gestört (GHEKIERE ET AL., 2006b). Auch frühe embryonale Stadien können in ihrer Entwicklung durch Methopren negativ beeinflusst werden (DHADIALLA ET AL., 1998). Methopren ist demnach für aquatische Insekten nicht direkt toxisch, aber durch die Störung der Entwicklung kommt es zum Tod bzw. nicht erfolgreicher Reproduktion zu einem bestimmten Zeitpunkt im Lebenszyklus (GHEKIERE ET AL., 2006b). Es gibt Hinweise darauf, dass Methopren kein Ecdysteroidrezeptor-Antagonist ist, jedoch ist der genaue Wirkmechanismus der Substanz noch unklar (DINAN ET AL., 2001, GHEKIERE ET AL.,

2006b). Bei Stechmücken störte Methopren die Lyse und Re-Absorption der alten Endokutikula und verhinderte die Synthese der neuen Prokutikula (CSONDES, 2004). Methopren zeigte bei Daphnien eine Aktivität als Juvenilhormonagonist mit einer Hemmung der Reproduktion und einer Verschiebung des Geschlechterverhältnis hin zu mehr Männchen (TATARAZAKO ET AL., 2003, WANG ET AL., 2005).

Die akuttoxischen Konzentrationen für aquatische Invertebraten liegen im Bereich von 125 – 1 250 µg/L (MCKENNEY & CELESTIAL, 1996, VERSLYCKE ET AL., 2004, SIEMERING, 2004). Methopren verursachte im vorliegenden Versuch keine deutliche Mortalität. In einem Freilandexperiment verursachte Methopren ebenfalls keine Mortalität beim Benthos, aber die Chironomiden- und Köcherfliegenlarven verschwanden (YASUNO & SATAKE, 1990). Bei *Folsomia candida* war die Hemmung der Reproduktion bei einer Exposition gegenüber Methopren stark mit dem Überleben der Adulten korreliert, mit einer EC₅₀ von 173 mg/kg und einer LC₅₀ von 178 mg/kg (CAMPICHE ET AL., 2006). Fenoxycarb, ein weiteres Juvenilhormon-Analogon, hatte zwar geringere Effekte auf die Mortalität, aber die EC₅₀ lag mit 113 mg/kg in einer vergleichbaren Größenordnung (CAMPICHE ET AL., 2006). Die NOEC liegt bei 130 mg/kg (CAMPICHE ET AL., 2006). *C. riparius* scheint gegenüber Methopren empfindlicher zu reagieren als *F. candida*.

Bei einer Exposition gegenüber Methopren schlüpften die Mücken generell früher als in der Kontrolle mit einer NOEC < 2 µg/kg und einer LOEC von 2 µg/kg. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von GHEKIERE ET AL. (2006b), bei denen Methopren die Häutung und das Wachstum der Schwebegarnele (*Neomysis integer*) bei subletalen Konzentrationen (100 µg/L) durch eine Verringerung der Wachstumsrate und eine Verlängerung der Stadien zwischen den Häutungen hemmte. Auffällig ist die Tatsache, dass es bei 162 µg MP/kg signifikant mehr Schlupfunfälle und tote Puppen gab als bei der Kontrolle. Bei Studien mit der Schwebegarnele verursachte Methopren eine konzentrationsabhängige Abnahme des Häutungserfolgs (GHEKIERE ET AL., 2006a). Bei einer Exposition von *Chironomus* sp. gegenüber Juvenilhormonen und deren Analoga ab dem ersten Larvenstadium zeigte sich, dass die Entwicklung bis zum vierten Larvenstadium normal verlief und sich eine Vielzahl von Effekten erst am Ende des vorpupalen Stadiums bemerkbar machten (LAUFER ET AL., 1986, HERSEY ET AL., 1998). Auch COATS (1994) stellte fest, dass Methopren durch die Störung der Entwicklung zu einer fehlgeschlagenen Emergenz führt. Eine Exposition gegenüber Methopren führt dazu, dass weniger Energie für Wachstum und Reproduktion zur Verfügung steht (VERSLYCKE ET AL., 2004). Dies ist vermutlich die Ursache für die kleineren und vermehrt unfruchtbaren Gelege in den höchsten Konzentrationen im vorliegenden Versuch.

Die NOEC für die Zahl der unfruchtbaren Gelege liegt bei 54 µg/kg und die LOEC bei 162 µg/kg.

Die Tatsache, dass die exponierten Weibchen in der vorliegenden Arbeit generell leichter waren, entspricht den Studien von OLMSTEAD und LEBLANC (2000) und GHEKIERE ET AL. (2006b). Sie stellten fest, dass exponierte Daphnien und Garnelen signifikant kleiner als die Kontrolltiere waren, was vermutlich auf Veränderungen im Energiehaushalt zurückzuführen ist (VERSLYCKE ET AL., 2004). Obwohl die verfügbare Energiemenge in exponierten Tieren höher war, war auch der Energieverbrauch signifikant erhöht (VERSLYCKE ET AL., 2004). Der erhöhte Energieverbrauch führte zu signifikanten Veränderungen in der bereitgestellten Energie mit einer Verschiebung zu den energieintensiven Prozessen der Schadstoffmetabolisierung.

Methopren verursachte signifikante Veränderungen im Steroidmetabolismus der Schwebegarnele und führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung in der metabolischen Androgenisierungsrate (VERSLYCKE ET AL., 2004). Die Androgenisierung erfolgte durch die Abnahme der Eliminierung von Testosteron (VERSLYCKE ET AL., 2004). Dies kann möglicherweise eine Erklärung für das höhere Gewicht der exponierten Männchen in der vorliegenden Studie sein. OLMSTEAD und LEBLANC (2001b) stellten fest, dass Methopren bestimmte Komponenten der sexuellen reproduktiven Phasen bei Daphnien verändern kann.

Bei den weiteren Endpunkten Gelege pro Weibchen, Geschlechtsverhältnis und Populationswachstumsrate waren keine Effekte zu beobachten. Bei anderen Organismen wurden im Gegensatz hierzu signifikante Effekte auf reproduktionsrelevante Parameter festgestellt (MCKENNEY, 2005). In der höchsten Konzentration war die Populationswachstumsrate (PWR) mit $0,74 \text{ d}^{-1}$ geringer als in der Kontrolle. Durch die hohe Standardabweichung, bedingt durch den Ausfall von Replikaten, war dieses Ergebnis jedoch nicht signifikant. Ist aber die PWR kleiner als 1, stirbt die Population mit der Zeit aus.

Luteolin

Schon bei der geringsten Konzentration zeigten sich die Effekte von Luteolin auf das Überleben von *Chironomus riparius*. Die NOEC für die Emergenz ist 2 µg/kg für die Weibchen und < 2 µg/kg für die Männchen, die LOEC 6 bzw. 2 µg/kg. Die LOEC für die Männchen ist eine konservative Angabe, da die EmT_{50} erst wieder in der höchsten Konzentration signifikant später als die Kontrolle ist. Dennoch zeigt die Emergenz eine eindeutige Tendenz eines verspäteten Schlupfs mit zunehmender Konzentration. Übereinstimmend hierzu führte Luteolin in einem Laborversuch zu einem verringerten Wachstum von Nachfalterlarven

(JOHNSON ET AL., 2002). Bei allen anderen Endpunkten waren keine Expositionseffekte zu verzeichnen, und somit ist die NOEC 162 µg/kg. Die leicht U-förmige Effektkurve des Gewichts der Männchen zeigt nur bei 18 µg MP/kg einen signifikanten Unterschied und ist biologisch nicht relevant.

Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Studien an Nagetieren und mit Zellkulturen durchgeführt wurden, ist es nicht einfach, die Effekte von Luteolin zu bewerten. Durch die Koevolution von Pflanzen und Tieren ist es sehr wahrscheinlich, dass die Effekte der Phytochemikalien auf Tiere im Allgemeinen eher gering sind (CHAPIN ET AL., 1996). Viele der biologischen Effekte von Luteolin beruhen auf dessen anti-oxidativen Eigenschaften, weswegen die Substanz in der humanen Krebstherapie eingesetzt wird (CHAPIN ET AL., 1996, NOROOZI ET AL., 1998). Die negativen Effekte wirken sich hauptsächlich auf die geschlechtliche Differenzierung im Gehirn, die Reifung und Pubertät aus, Luteolin kann jedoch auch das Zellwachstum und die Zellteilung beeinflussen (CHAPIN ET AL., 1996).

Flavonoide können den anti-oxidativen Verteidigungsmechanismus beeinträchtigen und auf diese Weise einen direkten oxidativen Stress in den Zellen herbeiführen. Die beobachteten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen deuten darauf hin, dass die Effekte nicht nur durch eine Ähnlichkeit mit Östradiol zu erklären sind (CHAPIN ET AL., 1996). Luteolin kann östrogenähnliche Effekte durch die Bindung am Östrogenrezeptor bewirken, die Stärke der Bindung am Östrogenrezeptor wird jedoch sehr kontrovers diskutiert (HAN ET AL., 2002a, SCIPPO ET AL., 2004, FOX ET AL., 2004). Vermutlich hat Luteolin sowohl östrogene als auch anti-östrogene Wirkungen, die aber dosisabhängig sind (HAN ET AL., 2002a). Flavone sind potente und spezifische Hemmer der Aromatase und haben in einem Konzentrationsbereich von 50 – 100 µM toxische Effekte auf Zellkulturen; ein anderer möglicher Wirkmechanismus ist die Hemmung der Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (WHITEHEAD & RICE, 2006).

4.1.6 Schwermetalle

Cadmium

Die Akkumulation von Metallen in Sedimenten im aquatischen Ökosystem reflektiert die Gehalte der letzten Jahren verglichen mit den Wasserkonzentrationen, die durch kurzfristige Faktoren beeinflusst werden (GLADYSHEV ET AL., 2001). Eine Metallakkumulation hat bei aquatischen und terrestrischen Insekten genotoxische Effekte und kann zu einer abnormalen

Entwicklung, Kurzlebigkeit und niedrigeren Überlebensraten führen (MICHAILOVA ET AL., 2001, WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA ET AL., 2005).

Cadmium (Cd) gelangt beim Erzbergbau und der Metallverhüttung, durch Verbrennungsprozesse oder bei der Verwendung als Düngemittel in die Umwelt (OLIVER, 1997). BLIEFERT (2002) schätzte den weltweiten jährlichen Cadmiumeintrag in terrestrische und aquatische Ökosysteme auf etwa 8 000 Tonnen. In Sedimenten wurden 0,2 – 2 356 mg Cd/kg und im Wasser 0,1 – 8,9 µg/L nachgewiesen (LEPPÄNEN ET AL., 1998, BERVOETS ET AL., 2004, RIBA ET AL., 2006). Cadmium wird nicht aus den aquatischen Ökosystemen eliminiert, sondern akkumuliert in den Sedimenten (VETILLARD & BAILHACHE, 2005). Das Metall gelangt nach dem Eintrag in die Gewässer (durch Starkregenereignisse, Schneeschmelze oder Oberflächenabfluss) durch Adsorption an Festpartikel, Sedimentation und anschließender Bioturbation durch Anneliden ins Sediment (DELMOTTE ET AL., 2007). Bioturbation führt aber auch zu einer bedeutenden Freisetzung von Metallen (in partikulärer Form) aus dem Sediment, diese sind jedoch für benthische oder pelagische Arten schwer bioverfügbar (WALL ET AL., 1996, CIUTAT & BOUDOU, 2003). Die Toleranz aquatischer Organismen gegenüber Spurenmetallen kann auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden, einmal durch Akklimation (Veränderungen der physiologischen Prozesse im Organismus) oder durch Anpassung (genetische Weitergabe der Toleranz) (GUAN & WANG, 2006). Eine Studie zur Anpassung von Daphnien an Cadmium ergab, dass adaptierte Individuen kleiner waren (reduzierte Schwimmgeschwindigkeit), eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber anderen Schadstoffen aufwiesen und eine reduzierte genetische Variabilität hatten (WARD & ROBINSON, 2005). Alle Punkte stellen einzeln, aber auch in Kombination ein erhöhtes Risiko für das Aussterben der angepassten Population dar.

In Organismen wirkt Cadmium als Enzymgift (OEHLMANN & MARKERT, 1997). Der Hauptexpositionsweg ist über die Verdauung und Absorption von Cd aus dem Sediment (WATTS & PASCOE, 2000b). Tests mit *Daphnia magna* ergaben 48 h-LC₅₀ von 66 – 81 µg/L (WARD & ROBINSON, 2005). Viele Studien zeigten, dass Cadmium einen Effekt auf die Entwicklung und Reproduktion von *Chironomus riparius* hatte (WATTS & PASCOE, 2000b, PEDINA, 2001, MILANI ET AL., 2003, VOGT ET AL., 2007a). Vermutlich wird das meiste Cadmium über die Nahrung aus dem Sediment aufgenommen, und es wurde auch gezeigt, dass die Cadmiumakkumulation in den Organismen konzentrationsabhängig zunimmt (HARE ET AL., 2001). Bei *C. riparius* gab es eine Korrelation zwischen den Sediment- bzw. Wasserkonzentrationen und den Metallgehalten in den Larven (BERVOETS ET AL., 2004).

Der Lebenszyklustest wurde mit Konzentrationen von 0,15 – 2,4 mg Cd/kg durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen waren vergleichbar mit den nominalen Konzentrationen mit Wiederfindungsraten von 41,3 – 80%. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit VOGT ET AL. (2007a), die Wiederfindungsraten von 55-85% hatten. Ein empfindlicher Parameter mit Effekten schon bei den niedrigsten Konzentrationen war die Mortalität. Jedoch waren die erhöhten Mortalitäten nicht populationsrelevant und lagen trotz der Signifikanz einiger Unterschiede noch unter der OECD-Validitätsgrenze von 25%. Die Ergebnisse entsprechen anderen Studien, die zeigen konnten, dass Chironomiden relativ tolerant gegenüber einer Exposition mit Cadmium sind (WATTS & PASCOE, 2000a, PÉRY ET AL., 2006, VOGT ET AL., 2007a). Langfristige Expositionen von *C. riparius* gegenüber Cadmium führten anfangs zu Wachstumsstörungen und erhöhten Mortalitäten, aber die überlebenden Larven erholten sich schnell (vermutlich weil mehr Nahrung vorhanden war) und schlüpfen sogar noch vor der Kontrolle (TIMMERMANS ET AL., 1992). Die ersten Larvenstadien sind empfindlicher als das vierte mit LC₅₀-Werten (24 h) von 2,1 mg/L im Vergleich zu 2 g/L (WILLIAMS ET AL., 1986). Chronische LC₅₀-Werte für *C. riparius* liegen je nach Anteil des organischen Gehaltes des Sedimentes bei 0,85 – 39 mg/kg (WATTS & PASCOE, 2000b, PEDINA, 2001, MILANI ET AL., 2003, VOGT ET AL., 2007a).

Bei Konzentrationen unter 0,15 mg/L treten Effekte auf Wachstum, Entwicklung und Emergenz der Chironomiden auf, und die Konzentrationen, die in chronischen Tests negative Effekte verursachen, liegen etwa 100-mal niedriger als die Akutwerte für die Mortalität (PASCOE ET AL., 1989, TIMMERMANS ET AL., 1992). Wie in anderen chronischen Versuchen zeigte sich kein Effekt auf das Geschlechterverhältnis (PASCOE ET AL., 1989, VOGT ET AL., 2007a). Im vorliegenden Versuch war der Schlupf bei beiden Geschlechtern verzögert, bei den Weibchen waren stärkere Effekte zu verzeichnen. Die NOEC liegt bei 0,6 mg/kg, die LOEC bei 1,2 mg/kg und die EC₅₀ bei 0,53 mg/kg (KI: 0,29 – 0,97). Dies stimmt mit weiteren Studien überein (PASCOE ET AL., 1989, WATTS & PASCOE, 2000a, VOGT ET AL., 2007a). Mit zunehmenden Konzentrationen kam es zu einem verlängerten Emergenzintervall und einer verzögerten Emergenz, insbesondere bei den Männchen (VOGT ET AL., 2007a).

Das Gewicht der cadmiumexponierten Männchen in der vorliegenden Arbeit (0,316 – 0,370 mg) ist durchaus vergleichbar mit den Gewichten von exponierten Freilandpopulationen (POSTMA ET AL., 1995). Die exponierten Männchen waren bei allen Konzentrationen (außer der niedrigsten, was aber vermutlich auf einen hormetischen Effekt zurückzuführen ist) leichter als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu waren die Männchen bei einer Cadmiumkonzentration von 17,9 µg/L durchschnittlich 30 µg schwerer als bei den niedrigeren Konzentrationen und der Kontrolle (POSTMA & DAVIDS, 1995). Ein geringeres Gewicht kann auf ein

schnelleres Wachstum zurückgeführt werden, wie es bei der Studie von TIMMERMANS ET AL. (1992) der Fall war. Jedoch war der Schlupf der exponierten Mücken bei beiden Geschlechtern in der vorliegenden Studie verzögert (EC_{50} (Weibchen): 0,53 mg/kg). Studien zeigten, dass Chironomiden bei höheren Konzentrationen und/oder mit zunehmender Expositionsdauer deutlich langsamer wachsen (ANDERSON ET AL., 1980, SUEDEL ET AL., 1997). Die Populationswachstumsrate war bei der Exposition gegenüber Cadmium in der höchsten Konzentration signifikant geringer als in der Kontrolle. Dies entspricht den Ergebnissen aus weiteren Studien mit Invertebraten (POSTMA ET AL., 1994, LOPES ET AL., 2005). PÉRY ET AL. (2006) modellierten die Ergebnisse ihrer Studie und stellten fest, dass die Populationswachstumsrate ein empfindlicher Endpunkt ist, unabhängig davon, ob Cadmium eine verringerte Nahrungsaufnahme oder einer Erhöhung der Wachstums(Energie-)kosten bewirkt (Schwellenwerte 0,42 bzw. 0,58 mg Cd/kg).

Die Effekte von Cadmium auf die Eigelegeparameter entsprechen den Ergebnissen anderer Studien mit Chironomiden. Generell waren die Gelege der exponierten Tieren größer als die der Kontrolle (NOEC: < 0,15 mg/kg, LOEC: 0,15 mg/kg). Die signifikanten Effekte in den beiden niedrigsten Konzentrationen können auch ein Hinweis auf ein hormetischer Effekt sein. Cadmium hemmte die Reproduktion und führte zu einer Verringerung der Eigeleggröße und der Fruchtbarkeit der Gelege (WILLIAMS ET AL., 1987, PÉRY ET AL., 2006, VOGT ET AL., 2007a). Die reduzierte Anzahl der Gelege und auch die vermehrte unfruchtbaren Gelege pro Weibchen sind bedingt durch die in der entsprechenden Konzentration erhöhten Mortalitäten. Bei Fischen hemmt Cadmium die Vitellogenese und wirkt als endokriner Disruptor durch die Hemmung der östradiolstimulierten Gene in der Leber (VETILLARD & BAILHACHE, 2005). Cadmium kann die Reproduktion aber auch durch nicht-östrogene Mechanismen beeinflussen, und ein Teil der Toxizität beruht auf der Veränderung der Kalziumhomöostase (WAISBERG ET AL., 2003).

Von vier untersuchten benthischen Arten waren *Hyalella azteca* und *C. riparius* bezüglich der Reaktion auf Cadmium am empfindlichsten (MILANI ET AL., 2003). Nicht-adaptierte *Chironomus*-Larven hatten eine erhöhte Mortalität bei einer Exposition gegenüber metallbelasteten Sedimenten und auch eine reduzierte Nahrungsaufnahme (LEPPÄNEN ET AL., 1998). Die aufgenommene Nahrung spielt bei der Bioakkumulation von sedimentgebundenen Schadstoffen eine wichtige Rolle (LEPPÄNEN ET AL., 1998). Im Freiland liegen die Schadstoffe in unterschiedlichen Mischungen vor, so dass die Toxizität der einzelnen Substanz nicht eins zu eins auf das Freiland übertragen werden kann. Dennoch hat Cadmium an der Gesamtoxizität der Sedimente vermutlich einen hohen Anteil (HARRAHY & CLEMENTS, 1997).

Blei

Blei und seine Verbindungen gehören zu den starken Umweltgiften (OLADIMEJI & OFFEM, 1989). Bleigehalte in Kläranlagen stammen unter anderem aus Abschwemmungen von Straßen und Dächern sowie von noch in Altbauten vorhandenen Bleileitungen. Blei akkumuliert, wie andere Schwermetalle, in Klärschlämmen und Sedimenten, aber auch in Lebewesen. Bei mehreren Invertebraten spielt die Körpergröße bei der Metallakkumulation eine wichtige Rolle. Blei bindet am äußeren Skelett und das so gebundene Blei dominiert in einigen Fällen die gesamte Bleiakkumulation (MACLEAN ET AL., 1996). Bei Oligochaeten gibt es eine positive Korrelation der Akkumulation im Organismus mit den Sedimentkonzentrationen, aber eine negative Korrelation mit den Wassergehalten (VAN GRIETHUYSEN ET AL., 2004).

Einige Autoren sind der Meinung, dass, obwohl Chironomiden Metalle aus dem Sediment akkumulieren können, sie durch die in der Umwelt vorkommenden Wasser- und Sedimentkonzentrationen nicht beeinträchtigt werden (HARRAHY & CLEMENTS, 1997, JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1998, MICHAILOVA ET AL., 2001, BERVOETS ET AL., 2004). Dennoch liegen Bleikonzentrationen von 0,05 – 100 mg/L bei Chironomiden im subletalen Effektbereich (JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1998, VERMEULEN ET AL., 2000, GLADYSHEV ET AL. 2001, GROSELL ET AL., 2006).

Der *Chironomus*-Versuch wurde mit Bleikonzentrationen von 0,65 – 65 mg/kg durchgeführt. Die Wiederfindungsraten von Blei sind generell hoch, aber die gemessenen Konzentrationen sind immer niedriger als die Nominalkonzentrationen (ANDERSON ET AL., 1980, HARRAHY & CLEMENTS, 1997, GLADYSHEV ET AL. 2001, TIMMERMANS ET AL., 2002, BERVOETS ET AL., 2004). Die Wiederfindungsraten in den Sedimenten des vorliegenden Versuches mit Blei betragen 50,8 – 107,7% und entsprechen damit den oben genannten Studien. In Sedimenten wurden 4 – 250 mg/kg und im Wasser 1 – 44,4 µg/L nachgewiesen, die Gewebekonzentrationen in aquatischen Organismen reichten von 0,09 – 23 mg/kg (GLADYSHEV ET AL., 2001, VAN GRIETHUYSEN ET AL., 2004, BERVOETS ET AL., 2004).

Akutttests mit Chironomiden ergaben LC₅₀-Werte von 2,68 – 220 mg/L und EC₅₀-Werte von 11,2 – 34,7 mg/L (KHANGAROT & RAY, 1989, OLADIMEJI & OFFEM, 1989, HARRAHY & CLEMENTS, 1997, VERMEULEN ET AL., 2000, BAT & AKBULUT, 2001). Ein chronischer Test mit *Chironomus tentans* zeigte Effektschwellenwerte von 497 µg/L (GROSELL ET AL., 2006). Mit steigenden Konzentrationen stieg die Mortalität und mieden immer mehr *Chironomus*-Larven das Sediment, was ein Hinweis darauf ist, dass *C. riparius* Metalle im Sediment erkennen und vermeiden kann (HARRAHY & CLEMENTS, 1997, VERMEULEN ET AL., 2000, BAT & AKBULUT, 2001). Aufgrund der Ergebnisse für Mortalität und Wachstum kommen die Autoren zu der Erkennt-

nis, dass *C. riparius* relativ resistent gegenüber belasteten Sedimenten ist, was sich auch in dem vorliegenden Versuch bezüglich der Mortalität zeigte. Im Vergleich zu anderen aquatischen Organismen sind Chironomiden unempfindlicher gegenüber Blei (OLADIMEJI & OFFEM, 1989, MACLEAN ET AL., 1996, WARD & ROBINSON, 2005, GROSELL ET AL., 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Zeit bis zur Emergenz in höheren Konzentrationen verlängert und dass die Überlebensrate auch signifikant verringert war (GROSELL ET AL., 2006). In der vorliegenden Studie waren die Effekte einer Blei-Exposition auf die Emergenz nicht eindeutig. Die exponierten Männchen schlüpften mit zunehmender Konzentration immer früher als die Kontrolle, während die Weibchen tendenziell eine Schlupfverzögerung zeigten. Eine Blei-Exposition hat negative Effekte auf die Häutungsrate von *C. riparius* und führte bei Konzentrationen von 10 und 100 mg/L zu einer Verzögerung der Häutung (VERMEULEN ET AL., 2000). Bei *Drosophila melanogaster* und *Lymnea stagnalis* war die Reifung infolge einer Blei-Exposition verzögert (COHN ET AL., 1992, GROSELL ET AL., 2006). Mit zunehmender Entwicklung der Fruchtfliegen nahm die Verzögerung in der Entwicklung zu, woraus die Autoren schließen, dass in der Entwicklung kein Zeitfenster für die toxischen Effekte von Blei vorhanden ist (COHN ET AL., 1992).

Ein oft beschriebener Effekt bei einer Exposition von Chironomiden gegenüber Blei sind Deformitäten der Mundwerkzeuge, vor allem bei einer Exposition ab dem Eistadium (KRANTZBERG & STOKES, 1989, VERMEULEN ET AL., 2000, MARTINEZ ET AL., 2001). Dieser Parameter wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Deformitäten der Mundwerkzeuge können auch eine Ursache für die Effekte auf die Emergenz sein und möglicherweise auch bei den Gewichtseffekten eine Rolle spielen. Eine mögliche Folge dieser Deformitäten ist eine verringerte Nahrungsaufnahme der Larven und damit auch ein verringertes Gewicht der Mücken (MARTINEZ ET AL., 2001). Bei mittleren Konzentrationen waren die männlichen Mücken schwerer, ansonsten leichter als die Kontrolle. TIMMERMANS ET AL. (1992) nennen Bleigehalte von bis zu 13 mg/g Körpergewicht bei *C. riparius*, zudem war das Wachstum der exponierten Tiere signifikant verlangsamt. BAT und AKBULUT (2001) stellten fest, dass das Körpergewicht der Larven bei steigenden Konzentrationen ebenfalls zunahm, woraus sie schließen, dass kleinere Tiere bei höheren Konzentrationen empfindlicher sind und nur die größeren Larven überleben.

Es wird oft vermutet, dass schwere Mückenweibchen nicht zur Eiablage gekommen sind. Bei der Untersuchung dieser Theorie in den Experimenten fällt auf, dass, obwohl die untersuchten Konzentrationen von Blei zum Teil deutlich höher als die von Cadmium sind, die beiden Endpunkte Gewicht der Weibchen und Eigelege pro Weibchen einen ähnlichen Kur-

verlauf zeigen. Bei der Gegenüberstellung der Endpunkte gab es nur für Blei einen signifikanten Zusammenhang zwischen der verringerten Eigelegezahl pro Weibchen und dem höheren Trockengewicht der Weibchen ($p = 0,008$) (Abbildung 4.2). Möglicherweise wirken beide Substanzen unterschiedlich auf *C. riparius* ein. Blei beeinflusste wie Cadmium die Fruchtbarkeit der Gelege, und bei 6,5 mg/kg war der Anteil unfruchtbarer Eigelege 50% ($p < 0,01$). Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie von JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL. (1998). In dieser Studie starben bei 500 $\mu\text{g Pb/L}$ alle Chironomiden in der dritten Generation trotz niedriger Mortalitäten aufgrund eines geringeren Reproduktionserfolges aus.

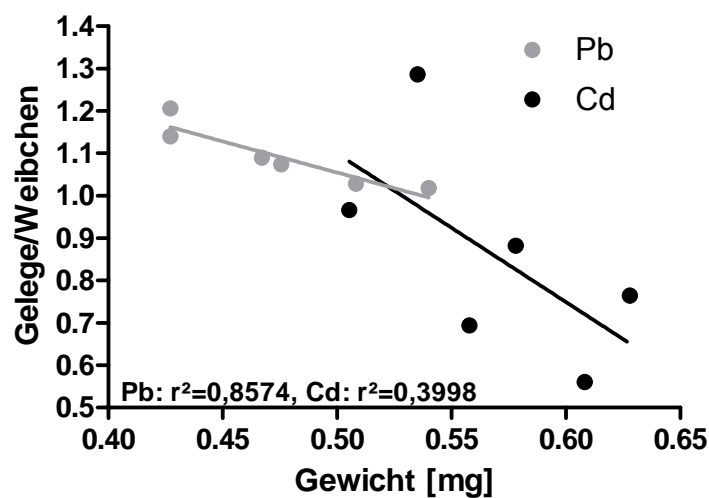


Abb. 4.2: *Chironomus riparius* und Schwermetallexposition. Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Endpunkten Gewicht der Weibchen und Eigelege pro Weibchen. Die Konzentrationen (K1-K5) für Blei (Pb) sind 0,65; 3,25; 6,5; 32,5 und 65 mg/kg und für Cadmium (Cd) 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 und 2,4 mg/kg.

Trotz einiger signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle war keine Berechnung einer NOEC oder LOEC möglich. Somit ist die NOEC parameterübergreifend 65 mg/kg und die LOEC > 65 mg/kg. Obwohl bei der Mortalität statistisch signifikante Unterschiede auftraten, ist dies für die Population nicht relevant, da die Tiere generell eine gute Fitness zeigten. Ebenso sind auch die signifikanten Effekte auf die Anzahl der fruchtbaren Gelege und das Gewicht der Männchen von einer geringen biologischen Relevanz.

4.1.7 Industriechemikalien

4-Nonylphenol

Alkylphenole akkumulieren in Sedimenten und im Gewebe von Fischen und benthischen Organismen (TERNES ET AL., 1999). Konzentrationen im niedrigen $\mu\text{g/L}$ -Bereich beeinflussen

den Steroidstoffwechsel und erhöhen die Östradiolkonzentrationen im Plasma (ARUKWE ET AL., 1997, GIESY ET AL., 2000, HARRIS ET AL., 2001). Obwohl die Umweltkonzentrationen der Alkylphenole geringer sind als die für die Induzierung eines Effektes benötigten Konzentrationen, gibt es Hinweise darauf, dass Tenside die Mobilität anderer Schadstoffe erhöhen können (KROGH ET AL., 2003). 4-Nonylphenol (NP) werden endokrine Eigenschaften zugeschrieben und die Substanz agiert möglicherweise auch additiv mit anderen endokrinen Disruptoren (WHITE ET AL., 1994, MCCORMICK ET AL., 2005, MÄENPÄÄ & KUKKONEN, 2006).

Die Effekte von NP sind vielfältig. Süßwasserarten sind im Vergleich zu marinen Arten unempfindlicher gegenüber NP (VAZQUEZ-DUHALT ET AL., 2005). Obwohl NP bei einigen Arten die Fruchtbarkeit und Eiproduktion stimuliert, sind die Fekundität und das Überleben der Eier beeinträchtigt (SHURIN & DODSON, 1997, PRICE & DEPLEDGE, 1998, BROWN ET AL., 1999). Ein starker Einfluss besteht auch bei der Entwicklung der juvenilen Stadien (z.B. Missbildungen) und auf den endogenen Hormonhaushalt (ZOU & FINGERMAN, 1997, NICE ET AL., 2000, 2003, GARCÍA-REYERO ET AL., 2004). Bei Fischen, Algen und anderen Invertebraten als Chironomiden zeigte NP akuttoxische Effekte (LC₅₀ bzw. EC₅₀) im Bereich von 0,34 – 3 000 µg/L (MCLEESE ET AL., 1981, BROOKE, 1993, VAZQUEZ-DUHALT ET AL., 2005, ISIDORI ET AL., 2006). Die Effekte sind unter anderem eine erhöhte Mortalität und eine Verlangsamung des Wachstums (BROWN ET AL., 1999, LUTZ & KLOAS, 1999, NICE ET AL., 2000). Die starke Bindung von NP am humanen Östrogenrezeptor ist in Übereinstimmung mit der östrogenen Wirkung der Substanz (SCIPPO ET AL., 2004).

Die Empfindlichkeit von Chironomiden gegenüber NP ist stark von der Art abhängig, und die LC₅₀-Werte liegen bei 315 – 680 mg/kg bzw. 0,12 – 160 µg/L (ENGLAND & BUSSARD, 1993, ABC LABORATORIES, 1995, BETTINETTI ET AL., 2002, MÄENPÄÄ & KUKKONEN, 2006, LEE & CHOI, 2006). Die gemessenen chronischen Toxizitäten zeigen, dass Konzentrationen ab 5 µg/L ein Risiko für einen Großteil der aquatischen Lebensgemeinschaft darstellen (VAZQUEZ-DUHALT ET AL., 2005). Die LOEC-Werte der untersuchten Invertebraten lagen dabei im Bereich von 76 – 243 µg/L, die subletalen Effekte treten jedoch bei viel geringeren Konzentrationen als 0,48 – 0,69 µg/L auf (KAHL ET AL., 1997, SCHMUDE ET AL., 1999, LEE & CHOI, 2006). NP beeinflusste die Vitellogenin-Aktivität bei männlichen Chironomiden, bei den Weibchen waren hingegen keine Effekte feststellbar (HAHN ET AL., 2002). *C. riparius* kann NP zum Teil auch besser als andere Arten metabolisieren (VERRENGIA GUERRERO ET AL., 2002, MÄENPÄÄ & KUKKONEN, 2006). LEE & CHOI (2006) kamen zu der Schlussfolgerung, dass oxidativer Stress und Neurotoxizität nicht an der Toxizität von NP beteiligt sind, da die antioxidativen Enzyme sowie Acetylcholinesterase nicht reagierten.

Die Bioakkumulation steigt mit zunehmendem organischem Gehalt des Sedimentes, und die Bindung von NP am organischen Material verringert die chemische Bioverfügbarkeit (MÄENPÄÄ & KUKKONEN, 2006). Bei drei Amphipodenarten reduzierte das organische Material aus dem Sediment die Bioakkumulation von NP (HECHT ET AL., 2004). In einem Versuch mit *Lumbriculus variegatus* wurde auch nach 56 Tagen kein Gleichgewicht der Nonylphenolkonzentrationen im Sediment erreicht (CROCE ET AL., 2005). Es gibt aber nur wenige Studien über die Bioakkumulation oder über Effekte von NP aus dem Sediment auf benthische Organismen. Im Rahmen der Umsetzung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie wird ein Qualitätsstandard von 0,33 µg NP/L für Inlandgewässer vorgeschlagen (LEPPER, 2002). Die Umweltkonzentrationen liegen meist im höheren µg/L-Bereich mit Maximalwerten von 53 – 644 µg/L im Wasser und bis zu 13,7 mg/kg im Sediment (BETTINETTI & PROVINI, 2002, BETTINETTI ET AL., 2002, VAZQUEZ-DUHALT ET AL., 2005).

Der Lebenszyklustest wurde mit Konzentrationen von 0,4 – 250 mg NP/kg durchgeführt. Die Exposition gegenüber Nonylphenol hatte wie bei einer Studie von MEREGALLI ET AL. (2001) keine Effekte auf die Mortalität. Jedoch führte Nonylphenol bei *Chironomus riparius* zu Deformitäten der Mundwerkzeuge (MEREGALLI ET AL., 2001). KAHL ET AL. (1997) konnten keine Effekte auf die Parameter Wachstum, Eigelege pro Weibchen und Fruchtbarkeit der Gelege feststellen, was auch in der vorliegenden Studie der Fall war. LEE und CHOI (2006) stellten fest, dass ab 100 µg NP/L die Gesamtemergenz reduziert, der Endpunkt Verpuppung der Larven aber nicht beeinflusst war. In einem weiteren 28 d *Chironomus*-Sedimenttest zeigte sich für die Emergenz eine EC₅₀ von 380 mg NP/kg (BETTINETTI & PROVINI, 2002).

Auf das Geschlechterverhältnis der geschlüpften Mücken hatte NP wie bei anderen Studien keinen Einfluss (KAHL ET AL., 1997, BETTINETTI & PROVINI, 2002, LEE & CHOI, 2006). Bei BETTINETTI und PROVINI (2002) legten die Weibchen ab einer Konzentration von 250 mg NP/kg TG (EC₁₀) keine Eigelege mehr. Die exponierten Weibchen waren im vorliegenden Versuch generell leichter als in der Kontrolle, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis bestätigt eine Studie von MÄENPÄÄ & KUKKONEN (2006), allerdings bei viel höheren Konzentrationen. In einem chronischen Test führte NP zu einer Abnahme des Körpergewichts der Larven (NOEC: 0,61 µg/kg), zu einer verringerten Kopfkapselgröße und auch zu einer Erhöhung der Mortalität in der höchsten Konzentration, die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung war jedoch unregelmäßig (MÄENPÄÄ & KUKKONEN, 2006).

Auf die Populationswachstumsrate (PWR) von *C. riparius* hatte NP keinen Effekt, was im Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Studien ist. Ein Versuch mit NP und Collembolen zeigte, dass eine stimulierte Fekundität nicht zu einer erhöhten PWR führt (WIDARTO ET AL.,

2007). Effekte auf die Mortalität der Juvenilen führt nicht immer zu einer Abnahme der PWR, da die Überlebenden (insbesondere bei Arten mit hohen Reproduktionsraten) oftmals den Verlust durch eine Erhöhung der eigenen Reproduktion kompensieren (WALTHALL & STARK, 1997, BECHMANN, 1999). Weitere Studien zeigen ebenfalls, dass die PWR oft unempfindlicher als Endpunkte wie Wachstum oder Reproduktion ist (STARK ET AL., 1997, HANSEN ET AL., 1999).

Alle Parameter im vorliegenden Versuch zeigten keine eindeutigen Tendenzen, so dass die NOEC 250 mg/kg betrug und die LOEC darüber liegt. Jedoch war die Emergenz der Weibchen mit einer NOEC von 0,4 mg/kg (LOEC: 2 mg/kg) ein empfindlicher Parameter wohingegen die größeren Gelege bei 0,4 mg/kg vermutlich auf einen fördernden Effekt der Substanz zurückzuführen ist. Die vorliegenden Ergebnissen bestätigen die Ergebnisse aus anderen Studien. Die untersuchten Konzentrationen der vorliegenden Studie waren zwar umweltrelevant, aber zu gering um Effekte hervorzurufen.

In einem weiteren Versuch mit NP mit zum Teil ähnlichen Konzentrationen von 0,8 bis 468,8 mg/kg waren die Mücken erheblich empfindlicher gegenüber Nonylphenol. So lag die NOEC für die Mortalität und die Populationswachstumsrate bei 0,8 mg/kg, für die Emergenz (beide Geschlechter) bei niedrigeren Konzentrationen als 0,8 mg/kg und für alle Eigelegeparameter und das Geschlechterverhältnis bei 93,8 mg/kg. Dieser Versuch fand im März statt, der oben genannte im Mai bzw. im Juni. Vermutlich ist dieser beobachtete Unterschied auf die unterschiedlichen Versuchszeitpunkte zurückzuführen.

4-tert-Octylphenol

4-*tert*-Octylphenol (OP) ist ein östrogenes Alkylphenol mit einer weit verbreiteten Anwendung als Tensid und Kunststoffadditiv und ist eines der potentesten östrogenen Alkylphenolisomere (ROUTLEDGE & SUMPTER, 1996, PEDERSEN ET AL., 1999). OP ist für Regenbogenforellen fünfmal mehr östrogen wirksam als Nonylphenol (JOBBLING & SUMPTER, 1993). Die Umweltkonzentrationen von OP liegen im Bereich von 0,8 – 91 ng/L im Wasser und 0,01 – 0,34 mg/kg im Sediment (BENNIE ET AL., 1997, LYE ET AL., 1999, OSPAR, 2003, NAGY ET AL., 2005). Die Umweltkonzentrationen sind meist geringer als die niedrigsten beobachteten Effektkonzentrationen, aber es ist nicht auszuschließen, dass niedrigere Konzentrationen bei längerer Exposition Effekte induzieren können.

OP bindet an Wirbeltier-Östrogenrezeptoren, ist aber weniger potent als Steroidöstrogene (ROBINSON ET AL., 2004). Die akuttoxischen Effekte (LC₅₀/EC₅₀) von OP auf Invertebraten lie-

gen im Bereich von 0,01 – 1 mg/L und die chronischen LC₅₀/EC₅₀ bei 0,23 bzw. 5,2 mg/L (MCLEESE ET AL., 1981, ZOU & FINGERMAN, 1997, ANDERSEN ET AL., 2001, ROBINSON ET AL., 2004, ISIDORI ET AL., 2006, HOGAN ET AL., 2006). OP wirkt vor allem hemmend auf die Häutung und Entwicklung der Invertebraten. Die Effektschwelle für OP-induzierte Effekte auf den Zebraäbrbling (*Danio rerio*) liegt im µg/L-Bereich mit ähnlichen Effekten wie bei der Behandlung mit Ethinylöstradiol (SEGNER ET AL., 2003). DUFT ET AL. (2007) exponierten die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* unter anderem gegenüber OP. Die NOEC war geringer als 1 µg/L, und die Sedimentexposition ergab eine EC₁₀ von 0,004 µg/kg. In Rattenzellen induzierte OP eine dosisabhängige Stimulierung der Progesteronsekretion und eine dosisabhängige Abnahme der Östradiol- und Testosteronausscheidung, aber nicht aufgrund einer reduzierten Aromataseaktivität, sondern aufgrund der hemmenden Einwirkung von OP auf die cAMP-Produktion (WHITEHEAD & RICE, 2006).

Im Lebenszyklustest mit 4-*tert*-Octylphenol zeigten sich die Mücken ähnlich unempfindlich wie bei vergleichbaren Konzentrationen von Nonylphenol. Die NOEC für alle Endpunkte lag bei 50 mg/kg. Die Gelege der exponierten Mücken waren generell kleiner als die der Kontrolle und es wurden auch durchgehend weniger Gelege produziert. Im Gegensatz dazu zeigte OP bei *P. antipodarum* eine Stimulierung der Embryoproduktion (DUFT ET AL., 2003b, 2007). Die signifikant erhöhte Mortalität bei 0,4 mg/kg ist vermutlich als Ausreißer zu sehen, da die anderen Konzentrationen keinen Effekt zeigten.

4.1.8 Zusammenfassung

Mit einem Lebenszyklustest (LCT) können mehrere Parameter in einem einzelnen Test gemessen werden. Im LCT wird ein Großteil des Lebenszyklus, inklusive der frühen Lebensstadien, einbezogen und der Test kann auch für die Verwendung in Multigenerationsstudien angepasst werden (POSTMA & DAVIDS, 1995, VOGT, 2007, TAENZLER ET AL., 2007). Generell wird der LCT mit *Chironomus riparius* als geeignete Methode für die Bewertung der Chemikalien in der Umwelt eingestuft (TAYLOR ET AL., 1993, BENOIT ET AL., 1997, NORBERG-KING ET AL., 2006, TAENZLER ET AL., 2007). Manche Forscher sind sich uneins zur Eignung des Tests bei bestimmten Substanzen, wie zum Beispiel Östrogene. Nach der Meinung von WATTS ET AL. (2001) ist *C. riparius* unempfindlich für Ethinylöstradiol und LCT somit ungeeignet für östrogene Chemikalien. Jedoch finden sowohl SEGNER ET AL. (2003) als auch TAENZLER ET AL. (2007), dass ein LCT eine gute Methode für den Nachweis subletaler Effekte von Umweltöstrogenen bzw. endokrine Disruptoren ist.

Unterschiedliche Ansichten zur Eignung des LCT mit Chironomiden herrschen auch in Bezug auf die Auswahl der geeignetsten Endpunkte. In der vorliegenden Arbeit waren die empfindlichsten Endpunkte das Überleben, der Anteil fruchtbarer Eigelege, der mittlere Schlupfzeitpunkt der Weibchen sowie das Gewicht der Männchen. Obwohl das Überleben der Mücken bei allen Stressoren beeinflusst wurde, waren die Unterschiede zur Kontrolle in den meisten Fällen nicht populationsrelevant. Dies ist in Übereinstimmung mit weiteren Studien, in denen die Mortalität als unempfindlicher bzw. ungeeigneter Endpunkt eingestuft wird (MILANI ET AL., 2003, NORBERG-KING ET AL., 2006). Ein weiterer ungeeigneter Endpunkt, der in zukünftigen Untersuchungen nicht mehr aufgenommen werden sollte, ist das Trockengewicht der adulten Weibchen. Dies liegt daran, dass das Gewicht sehr stark davon abhängt, ob die Weibchen ihr Eigelege abgelegt haben. Es ist aber auch nicht gesagt, dass leichtere Weibchen ein Eigelege produziert haben. Somit ist das Setzen einer Gewichtsgrenze zur Unterscheidung zwischen Weibchen mit und ohne Eiablage sehr subjektiv.

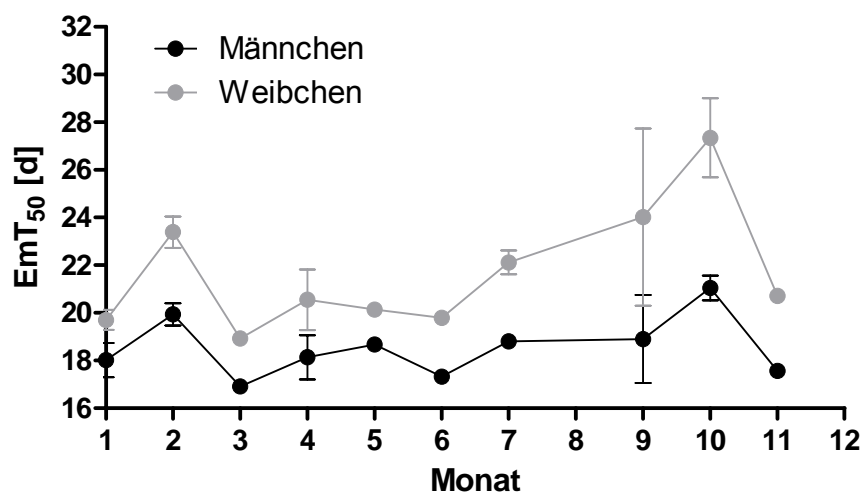


Abb. 4.3: Medianer Schlupfzeitpunkt EmT_{50} (d) von unbelasteten *Chironomus riparius* (Kontrolle und Lösemittelkontrolle) im Jahresverlauf.

Subletale Endpunkte sind meistens empfindlicher als das Überleben der exponierten Mücken. So wird vor allem der Parameter Wachstum als empfindlich eingestuft (SIBLEY ET AL., 1997a, MILANI ET AL., 2003, FARIA ET AL., 2006). Veränderungen im Wachstum, ob positiv oder negativ, können verwendet werden, um Vorhersagen zur Beeinflussung der Reproduktion und Populationsdynamik zu treffen. Sehr häufig werden Effekte auf die Entwicklung der Larven und auf die Emergenz festgestellt (TAYLOR ET AL., 1993, WATTS & PASCOE, 1998, HWANG ET AL., 2001, 2004, FARIA ET AL., 2006), so dass dieser Endpunkt auf jeden Fall aufgenommen werden sollte. Jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die mittleren Schlupfzeitpunkte der Kontrollen auch sehr stark schwanken. Eine Betrachtung

der Schlupfzeitpunkte der Kontrollen zeigte, dass die Schwankungen vermutlich saisonal bedingt sind (Abbildung 4.3). Der Einfluss des Lösemittels auf den Schlupfzeitpunkt ist vernachlässigbar. Somit kann man die Effekte auf den Schlupfzeitpunkt generell immer nur bezogen auf die Kontrolle bewerten.

Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass *C. riparius* in chronischen Sedimenttoxizitätstests das zugegebene Futter bevorzugt (ÅKERBLOM & GOEDKOOP, 2003). Dadurch werden die Expositionswege der Schadstoffe und auch deren Effekte durchaus in größerem Ausmaß beeinflusst. Dieser Faktor ist möglicherweise der Grund dafür, dass sich die Mücken in der vorliegenden Arbeit als relativ unempfindlich gegenüber den untersuchten Schadstoffen gezeigt haben. Die Durchführung von LCT ohne Zufütterung hat aber ebenfalls Effekte auf die Entwicklung von *C. riparius*; Vorstudien der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Tiere schlechter wachsen, wenn kein Futter zugegeben wurde. Auch RISTOLA ET AL. (1999) empfehlen eine Zufütterung bei Lebenszyklustests die mit dem ersten Larvenstadium anfangen. Um den Einfluss auf die Toxizität möglichst gering zu halten, muss die Zufütterung auf ein Minimum reduziert werden (empfohlen: 0,12 mg/Larve/d anstelle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 0,5 mg/Larve/d).

Lebenszyklustests mit *C. riparius* sind eine gute Basis für die Bewertung der Sedimenttoxizität, was auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Versuche bestätigt wird. Jedoch sollte man sich nicht auf die Mortalität als Endpunkt stützen, da die anderen Parameter meistens empfindlicher und eindeutiger reagierten. Lebenszyklustests mit Chironomiden können wichtige Informationen für die Risikobewertung der Chemikalien liefern, sollten aber in Zusammenhang mit erhobenen Daten von anderen empfindlichen Organismen und mit Daten zum Umweltverhalten der Substanzen bewertet werden.

4.2 Molekularbiologische Untersuchung

4.2.1 Allgemeines

Methodik des Mikroarrays

Die durch Xenobiotika induzierte Genexpression wird im Biomonitoring als vielversprechende Methode zur frühzeitigen Identifizierung von Umweltschadstoffen angesehen (HOYT ET AL., 2003, ROBERTS ET AL., 2005, MOENS ET AL., 2006, LEE ET AL., 2006a, IGUCHI ET AL., 2007). Da jedoch diese molekularbiologischen Systeme die Effekte der Substanzen auf den physiologischen Status des Organismus bislang nicht integrieren können, ist ihre ökologische Relevanz

derzeit noch gering (ROH ET AL., 2006). Mit der methodischen Verbesserung und weiteren Entwicklung von Mikroarrays und anderen Methoden zur Untersuchung der Genexpression (z.B. quantitative Real-Time-PCR und Serial Analysis of Gene Expression) wird auch die Bedeutung für Fragestellungen der Ökotoxikologie zunehmen.

Mikroarrays geben Informationen über die Gene, die in einem definierten Gewebe unter bestimmten Bedingungen exprimiert sind und erlauben die vergleichende Untersuchung von Expressionsmustern. Ein Mikroarray ermöglicht die umfassende Analyse der differentiellen Genexpression unter den getesteten Bedingungen, zeigt koregulierte Gennetzwerke auf und gibt wichtige Hinweise zu deren Wirkmechanismen (ISE ET AL., 2005). Der Mikroarray-Ansatz ist jedoch abhängig von der Messung der Signalstärke der Hybridisierung. Die Effizienz der Detektion ist dabei abhängig von der Markierungs- und Hybridisierungseffizienz, so dass die Daten im besten Fall nur semiquantitativ sind. Mikroarrays geben keine quantitative Bewertung der Genexpression, sondern zeigen vornehmlich relative Veränderungen, die jedoch eine Zuordnung zu biochemischen Stoffwechselwegen und Prozessen sowie deren Verknüpfung erlauben (DENSLOW ET AL., 2007). Die Real-Time-PCR ist hingegen eine quantitative Methode und sollte Mikroarray-Analysen nachgeschaltet werden, um die beobachteten Veränderungen zu validieren (DENSLOW ET AL., 2007).

Die Unterschiede in der Expressionsstärke bei technischen und biologischen Mikroarray-Replikaten liegen oft in der Methode begründet. Jede cDNA hat aufgrund ihrer Position auf dem Chip andere Hybridisierungsbedingungen. Deshalb werden die Ergebnisse der Mikroarray-Versuche typischerweise als x-fache Veränderung der Expression in einem Testgewebe im Vergleich zu einer Kontrolle angegeben. Bei umweltrelevanten Konzentrationen von Xenobiotika können nicht-lineare Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bestehen, die in den Mikroarray-Experimenten bezüglich Design und Auswertung der Daten berücksichtigt sein sollten (CALZOLAI ET AL., 2007). Die genaue Messung der Genexpressionsraten und eine zuverlässige Detektion von gering exprimierten Genen mittels Mikroarrays ist zur Zeit nicht in jedem Fall möglich, obwohl sie in ihrem Empfindlichkeitsbereich eine vorhandene differentielle Genexpression und die Richtung der Veränderung (überexprimiert oder reprimiert) für den Großteil der exprimierten Gene sehr genau nachweisen können (DRĂGHICI ET AL., 2006).

Beeinflusste Prozesse

Abbildung 4.4 ordnet die differentiell exprimierten Gene nach einer Exposition von *Chironomus*-Larven gegenüber verschiedenen Schadstoffen den sie regulierenden biochemischen

Prozessen zu. Auffällig ist die Tatsache, dass eine Exposition gegenüber Methyltestosteron nur zu einer Beeinträchtigung von drei bekannten biologischen Prozessen führt, während bei den anderen getesteten Substanzen sieben bis acht bekannte Prozesse beeinflusst waren. Dies deutet daraufhin, dass Methyltestosteron bei *Chironomus riparius* vermutlich einen sehr spezifischen Wirkmechanismus hat.

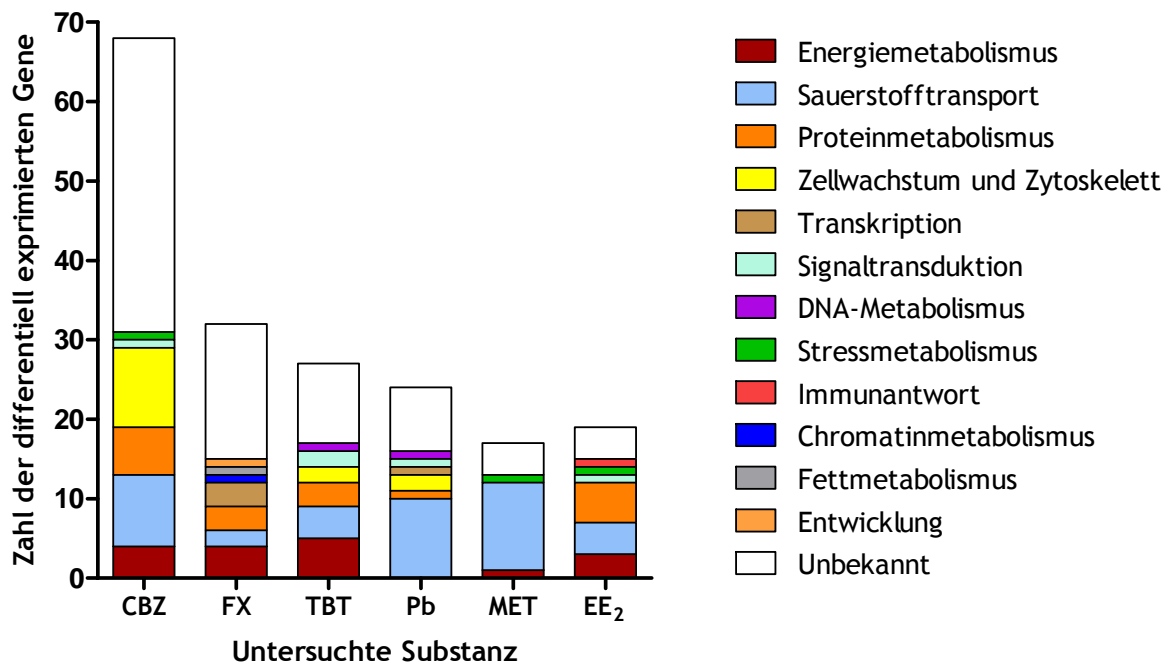


Abb. 4.4: Zuordnung der differentiell exprimierten Gene von *Chironomus riparius* zu den regulierenden biochemischen Prozessen nach einer Exposition gegenüber Schadstoffen (CBZ = Carbamazepin, FX = Fluoxetin, TBT = Tributylzinn, Pb = Blei, MET = 17 α -Methyltestosteron und EE₂ = 17 α -Ethinylöstradiol).

Sauerstofftransport und Hämoglobinexpression

Die Regulation von Globinen und damit der Sauerstofftransport als physiologische Funktion wird von allen Substanzen beeinflusst, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen (Abbildung 4.4). Fluoxetin, Methyltestosteron und Ethinylöstradiol reduzierten die Expression der Globine, während die restlichen untersuchten Substanzen die Expression erhöhten. Bei einer Exposition gegenüber Methyltestosteron war der Anteil des Sauerstofftransports an der Gesamtheit der beeinflussten Prozesse mit 84,6% am größten und mit 10,5% bei Fluoxetin am geringsten. Der Anteil des Sauerstofftransports an den beeinflussten Prozessen war bei Tributylzinn, Ethinylöstradiol und Carbamazepin ähnlich. Die vorliegenden Ergebnisse sind mit denen von LEE ET AL. (2006a) vergleichbar. Sie untersuchten die Expression von Hitzeschockproteinen und Hämoglobinen (Hämoglobin A und B) bei *Chironomus tentans* nach einer 48 h-Exposition gegenüber 13 unterschiedlichen Stressoren, unter anderem Ethinyl-

östradiol und Blei. Alle getesteten Konzentrationen von Ethinylöstradiol unterdrückten die Expression der Hämoglobine, während niedrige Bleikonzentrationen (0,05 und 5 mg/L) die Expression erhöhten. Hohe Bleikonzentrationen (5 mg/L) führten aber zu einer Unterdrückung der Hämoglobinexpression (LEE ET AL., 2006a).

Veränderungen im Hormontiter während der Häutung kontrollieren auch die Hämoglobinproduktion; Juvenilhormone und Hydroxyecdysol sind zumindest indirekt an der selektiven Induktion bzw. generellen Unterdrückung der Hämoglobinsynthese beteiligt (SAFFARINI ET AL., 1991). Die schadstoffinduzierte Globinexpression führten SAFFARINI ET AL. (1991) auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch für schadstoffmetabolisierende Prozesse zurück. Jedoch ist zu beachten, dass nach Ansicht anderer Autoren die Hämoglobinkonzentrationen in Chironomiden am Ende des vierten Larvenstadiums (das Stadium, bei dem die unterschiedliche Genexpression nach Schadstoffexposition in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde) aufgrund einer Abnahme der Synthese und enzymatischem Abbau auch bei nicht exponierten Larven abnimmt (OSMULSKI & LEYKO, 1986).

Tab. 4.5: Proteine von *Chironomus riparius*, die aufgrund einer Exposition gegenüber Schadstoffen mehrfach differentiell reguliert sind. ↑ = überexprimiert, ↓ = reprimiert.

ID	Name	Substanz
C1_2_01_G03	Unbekannt	Fluoxetin (↑) Carbamazepin (↓)
E5_1_06/1_C01	Unbekannt	Fluoxetin (↑) Carbamazepin (↑)
F3_1_09_G12	Globin CTT-II-beta	Methyltestosteron (↓) Ethinylöstradiol (↓)
07_A04_Plasmid	IWS1-Homolog	Blei (↑) Fluoxetin (↑)
C1_2_06_D04	Globin CTT-IV	Methyltestosteron (↓) Carbamazepin (↓)
C1_2_06_E07	Globin CTT-VIIB-6 Cytochrom b	Methyltestosteron (↓) Carbamazepin (↓)
C1_2_A06 Pb2_3_10_A07	Globin CTT-III	Methyltestosteron (↓) Blei (↑)
TBT50_04_H05	Endopeptidase vom Serin- typ (Chymotrypsin)	Carbamazepin (↑) Tributylzinn (↑)

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression der Hämoglobine bei Chironomiden schadstoffspezifische Reaktionen zeigte, wurde die Anwendung der Hämoglobinexpression allgemein als Biomarker für das Monitoring von Freilandgewässern vorgeschlagen (CHOI & ROCHE, 2004, LEE ET AL., 2006a, HA & CHOI, 2008). Eine Unterstützung dieses Vorschlags zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit beim Vergleich der exprimierten Proteine zwischen den Behandlungen. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass alle untersuchten Substanzen Globine differentiell regulierten. Einige Globine wurden durch mehrere Substanzen in ihrer Expression beeinflusst. Von neun Proteinen, die in jeweils zwei Behandlungen differentiell exprimiert wurden, sind fünf Globine (Tabelle 4.5).

Zahl der differentiell exprimierten Gene

Die Exposition von *Chironomus*-Larven gegenüber den in Abbildung 4.4 gezeigten Substanzen führte zu der differentiellen Expression von neun (Methyltestosteron) bis 49 (Carbamazepin) Genen. Auf den ersten Blick mögen diese Zahlen in Bezug auf die Sondenzahl auf dem Array (> 6 000) als relativ gering erscheinen. Die Zahlen sind vermutlich bedingt durch die Auswahl der Klone auf dem Chip, die ohne vorherige Kenntnis der Sequenz erfolgte. Aufgrund der Tatsache, dass wenig über das Genom und die Gene von *Chironomus* sp. bekannt ist, gab es zudem eine Reihe von nicht-annotierbaren Gensonden, die demnach auch nicht weiter klassifiziert werden konnten. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene der vorliegenden Hybridisierungen ist, bezogen auf die Gesamtzahl der Klone auf dem Mikroarray, nicht sehr verschieden von den Ergebnissen anderer Arbeiten (17 – 1 622 differentiell exprimierte Gene), jedoch ist dabei zu beachten, dass in den meisten Fällen eine Vorauswahl aus z.B. östrogenempfindlichen Genen getroffen wurde (VAN DER VEN ET AL., 2005, HOFFMANN ET AL., 2006, LEE ET AL., 2006b, SKILLMAN ET AL., 2006, LARKIN ET AL., 2007, HORST ET AL., 2007). Bei Untersuchungen an Säugetier-Gehirnen wurden nur 400 der 20 000 Gene nach Ischämie stress differentiell reguliert (HANKELN, persönliche Mitteilung).

Für 18 differentiell exprimierte Gene gab es auf dem Mikroarray mindestens zwei bis maximal zehn Klone, bei denen die Datenbankrecherche das gleiche Protein ergab (siehe Kapitel 3.2). Von diesen Genen waren sieben Globine und zwei Cytochrome. Für zukünftige Versionen des ChiroChips wäre es möglicherweise eine Alternative, einige dieser doppelten Klone zu entfernen und dafür andere, neue Klone aus den sechs cDNA-Bibliotheken auszuwählen und auf dem Chip zu spotten. Damit kann die Bandbreite der untersuchten Gene vergrößert werden. Das für dieses Projekt angewandte Vorgehen, zunächst anonyme cDNAs auf den Array zu spotten und die differentiell exprimierten Klone zu sequenzieren und zu annotieren ist trotz der möglichen Sonden-Duplikate kostengünstiger als ein Chip mit zuvor durch EST-Sequenzierung ausgewählter Sonden. Diese Vorgehensweise ist damit für Nicht-Modellorganismen wohl wegweisend. Eine Bestätigung der Methode ist die Tatsache, dass auch vermutlich spezifische Effekte der Substanzen, wie zum Beispiel Methyltestosteron (siehe oben), aufgezeigt werden können.

Stressproteine

Trotz der Tatsache, dass meist nur unbekannte *Chironomus*-Klone auf dem Chip gespottet wurden, ist es auffällig, dass bei der Untersuchung der Proteine in den vorliegenden Versuchen, aus der Literatur bekannte, akut wirkende Stressproteine kaum als differentiell reguliert erkannt wurden. Dies lag vermutlich an der langen Expositionsdauer der Larven von 14

Tagen im Vergleich zu den oft nur Stunden dauernden Expositionen anderer Mikroarray-Experimente in der Literatur. Gene reagieren oft innerhalb von Stunden auf einen Schadstoff (DENSLOW ET AL., 2007). Bei kurzen Zeiträumen oder niedrigen Konzentrationen sind die akut induzierten Gene meist adaptiv und schützen den Organismus vor der Toxizität der Substanz, wie z.B. Metallothioneine und Hitzeschockproteine (DENSLOW ET AL., 2007). Mit steigenden Konzentrationen oder länger andauerndem Stress versucht der Organismus, den Verlust essentieller Stoffwechselwege zu kompensieren und aktiviert neue Stoffwechselwege. Mit weiter steigenden Konzentrationen oder zunehmender Expositionsdauer zeigen sich negative Effekte, eine Anpassung oder Kompensation ist nicht mehr möglich, und die Expressionsveränderungen hängen vermutlich mit einer generellen Toxizität zusammen (DENSLOW ET AL., 2007).

4.2.2 Tributylzinn

Die Untersuchung der Effekte von Tributylzinn (TBT) auf die Genexpression bei verschiedenen Organismen zeigt, dass die Substanz mehrere Prozesse beeinflusst. So werden transkriptionelle und/oder am Zellwachstum beteiligte Gene bei Seescheiden, Bakterien und Mollusken meist unterdrückt (AZUMI ET AL., 2004, DUBEY ET AL., 2006, CASTRO ET AL., 2007, BAKEN ET AL., 2007), während die Signaltransduktionsgene unter anderem bei Quallen und Lachse eine Überexpression zeigen (OSADA ET AL., 2005, SCHROTH ET AL., 2005, MORTENSEN & ARUKWE, 2007a).

Im Allgemeinen hemmt TBT energieverbundene Reaktionen, wie die Energietransduktionsprozesse in den Mitochondrien und verursacht bei Muscheln eine Erhöhung des anaeroben Energiestoffwechsels (FARGAŠOVÁ, 1998, INOUE ET AL., 2007). Dieser Effekt wird möglicherweise durch die Störung der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase hervorgerufen. In vitro-Versuche mit Organozinnverbindungen (OZV) zeigten, dass sie hemmend auf den Stress- und Energiemetabolismus einwirken (HUNZIKER ET AL., 2002, VON BALLMOOS ET AL., 2004). Durch die Bindung am F₀-Teil der ATPase blockieren sie den Protonentransfer durch die Membran (HUNZIKER ET AL., 2002). Die Lipophilie der OZV ermöglicht die Durchdringung der hydrophoben Membrenumgebung und damit den Zugang zum Enzymsystem (FENT & BUCHELI, 1994).

80 – 500 µM TBT wirken durch die Hemmung von schadstoffmetabolisierenden Gene, wie Glutathion-S-Transferase oder UDP-Glucuronyltransferase, auf den Stressmetabolismus ein (AL-GHAIS & ALI, 1999, MORCILLO ET AL., 2004, FENG ET AL., 2007). Je nach Organismus (See-

scheiden, Lachse oder Quallen) werden die stressreaktiven Gene entweder reprimiert oder überexprimiert (AZUMI ET AL., 2004, SCHROTH ET AL., 2005, BAKEN ET AL., 2007). TBT beeinflusst den Stressmetabolismus hauptsächlich durch die Hemmung des Cytochrom P450-1A-Enzymsystems, welches eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von Xenobiotika spielt (ROSENBERG ET AL., 1980, FENT & STEGEMAN, 1991, BRÜSCHWEILER ET AL., 1996, PADRÓS ET AL., 2000). Dabei ist der Mechanismus eine nicht-kompetitive Hemmung der Enzymaktivität (BRÜSCHWEILER ET AL., 1996). Bei *Chironomus riparius* beeinflusst TBT die noch nicht ganz verstandene Ecdysteroidsynthese (HAHN & SCHULZ, 2002). Mehrere Schlüsselenzyme der Häutungshormone gehören jedoch zur Cytochrom P450-Familie und anderen Komponenten des Mischfunktionsoxidase-Systems, auf die TBT störend einwirken kann (HAHN & SCHULZ, 2002).

Die Vielfalt der Hämoglobine bei einigen aquatischen Organismen wie Forellen, Amphibien oder Chironomiden beruht wahrscheinlich auf der größeren Variabilität des Sauerstoffregimes, dem diese Organismen ausgesetzt sind (ZOLESE ET AL., 1999, ROESNER ET AL., 2005). Bei diesen Organismen beeinflussen 20 – 154 μM OZV den Sauerstofftransport über eine differentielle Expression der Hämoglobine (SANTRONI ET AL., 1997, ZOLESE ET AL., 1999, LEE ET AL., 2006a). Die Interaktion zwischen den Globinen und TBT führt zu Veränderungen der physiko-chemischen Eigenschaften der Plasmamembran und zu Veränderungen in der hämolytischen Rate (ZOLESE ET AL., 1999). TBT führt zu einer Destabilisierung der Häm-Globin-Interaktion bei Hb I und Hb IV von Forellen, wodurch es zu verschiedenen Oxidationsraten kommt (SANTRONI ET AL., 1997). LEE ET AL. (2006a) wiesen bei *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber Pestiziden (z.B. Endosulfan und Chlorpyrifos) einen Zusammenhang zwischen der Expression des Hämoglobins (Unterdrückung der Expression) und möglichen Effekten auf höhere Organisationsebenen des Organismus (Rückgang des larvalen Frischgewichts) nach. Im vorliegenden Experiment mit *C. riparius* wurde die Expression der Globine durch TBT (der Schadstoffklasse der Pestizide zugehörig) erhöht, aber es gab bei der untersuchten Konzentration keine Effekte auf den Gesamtorganismus im Lebenszyklustest. Dieser Unterschied ist möglicherweise durch unterschiedliche Wirkmechanismen der jeweiligen untersuchten Substanzen begründet.

Die Expressionsraten der an Zellwachstum und Zytoskelett beteiligten Gene Alpha-Tubulin und Tetraspanin waren nach der Exposition von *C. riparius* gegenüber TBT erhöht. Die negative Beeinflussung (Repression) dieser Gene wurde sowohl bei TBT als auch bei Schwermetallen nachgewiesen (LENCIONI ET AL., 1999, CIMA & BALLARIN, 2000, MATTINGLY ET AL., 2001). Die unterschiedliche Beeinflussung der Genexpression ist wahrscheinlich durch eine organismusspezifische Wirkung der Substanz verursacht. Möglicherweise hat *C. riparius*

andere Stoffwechselwege für TBT als die oben untersuchten Organismen. Bei *C. tentans* induzierte eine Cadmiumexposition die Häufigkeit von Alpha-Tubulin-RNA (MATTINGLY ET AL., 2001). Mikrotubuli sind wichtige intrazelluläre Organellen, die den Transport der Vesikel und die Bewegung der Chromosomen während der Zellteilung regeln und sie sind einer der Hauptkomponenten des Zellskeletts. Eine Destabilisierung des Zellskeletts ist oftmals irreversibel und führt letztendlich zum Zelltod (LENCIONI ET AL., 1999, CIMA & BALLARIN, 2000).

Die 25 differentiell exprimierten Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 50 µg Sn/kg können in sechs verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist der Energiemetabolismus (25%), dann folgen Sauerstofftransport (21%), Proteinmetabolismus (16%) und Zellwachstum und Zytoskelett (11%). Alle Gene in den jeweiligen Prozessen werden überwiegend reprimiert, mit Ausnahme der Gene, die am Proteinmetabolismus und am Sauerstofftransport beteiligte Proteine kodieren. Aufgrund der geringen TBT-Konzentrationen ist es eher unwahrscheinlich, dass die differentiell exprimierten Gene Veränderungen im Gesamtmetabolismus bewirken. Eine Unterdrückung der Expression der Globine bedingt zum Beispiel nicht ursächlich einen verringerten Sauerstoffumsatz. Direkte Änderungen des Stoffwechsels sind abhängig von der differentiellen Regulierung des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms oder Proteins.

Ein unterdrückter Energiemetabolismus in Kombination mit erhöhtem Sauerstofftransport deutet auf eine Metabolisierung von TBT hin. Vermutlich steht deshalb weniger Energie für Wachstum und Entwicklung zur Verfügung. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Expression der Gene, die am Zellwachstum und Zytoskelett sowie am Proteinmetabolismus beteiligt sind, unterdrückt sind. Die Effekte auf den ganzen Organismus würden sich durch kleinere Tiere und weniger Gelege äußern. Andererseits kann der Schadstoffstress auch dazu führen, dass die Tiere zur Erhaltung der Population den Schwerpunkt des Stoffwechsels auf die Reproduktion legen. Eine 1:1-Übertragung der Induktion oder Repression der Gene auf die reale Proteinsituation ist aber mit Vorsicht zu betrachten, da der Organismus gerade auf einen Abfall des entsprechend kodierten Proteins mit einer verstärkten Expression der mRNA reagiert (MENZEL, persönliche Mitteilung).

Zur Überprüfung der Eignung des ChiroChips als Instrument zur Vorhersage der organismischen Effekten bei hohen Schadstoffkonzentrationen wurden die Effekte bei anderen Organismen untersucht. Die vermuteten hemmenden Effekte von TBT auf Wachstum und Reproduktion sind für viele aquatische Organismen bekannt (DAY ET AL., 1998, CZECH ET AL., 2001, HAHN & SCHULZ, 2002, SATTELBERGER, 2002, RÜDEL ET AL., 2003, DUFT ET AL., 2003a, LEUNG ET AL., 2007, VOGT ET AL., 2007a). Die Beeinflussung des Energiemetabolismus durch

TBT hat Auswirkungen auf das Immunsystem (immununterdrückende Wirkung) und führt dadurch zu mehr Entzündungen in den Organismen (CZECH ET AL., 2001, HARFORD ET AL., 2007). Studien zu den chronischen Effekten von TBT auf Chironomiden zeigen eine Verzögerung der Emergenz und in den späteren Generationen durchaus auch größere Eigelege (VOGT ET AL., 2007a, b). Dies spricht einerseits für die Verschiebung des Energiemetabolismus auf die Schadstoffmetabolisierung, andererseits aber auch für die Förderung der Reproduktion aufgrund des Schadstoffstress.

Die unbekannt differenziell exprimierten Gene der vorliegenden Versuche, die zum Teil einen Großteil aller exprimierten Gene ausmachen, können durchaus Prozesse beeinflussen, die zur Zeit nicht bekannt sind. So sind dann möglicherweise Effekte im Organismus zu beobachten, die aufgrund der obigen beeinflussten Prozesse (und auch bei den nachfolgend diskutierten Schadstoffen) nicht zu erwarten wären.

4.2.3 Blei

Die Effekte einer Exposition gegenüber Blei sind sehr vielfältig. Blei verändert die Zellstruktur und Enzymfunktionen und führt zu einer veränderten Proteinsynthese durch die Interaktion mit den Nukleinsäuren und Proteinen (ŠKREB & HABAZIN-NOVAK, 1975). Im Organismus wirkt Blei als Konkurrent für endogene Kationen an Proteinbindungsstellen und ist insbesondere Substituent für Kalzium und Zink in vielen Proteinen (BOUTON ET AL., 2001). Durch die Bindung von Blei können die Proteinfunktion sowie die zellulären Stoffwechselwege verändert werden und damit zu einer abweichenden Genexpression führen. Blei hat durch die Störung der Hämoglobinsynthese negative Effekte auf die Blutbildung (EISLER, 1988). Durch die Induktion von zellulären Prozessen beeinflusst eine Schwermetallexposition die Abwehr mikrobieller Infektionen und schadstoffinduzierte Reaktion (MATTINGLY ET AL., 2001). Schwermetalle haben eine hohe Affinität für Mercaptogruppen enthaltende Peptide, Proteine und Enzyme des intermediären Metabolismus, der Häm synthese und können oxidativen Stress verursachen (KHAN ET AL., 2007).

Es gibt wenige Studien, die sich mit der Genexpression von Invertebraten nach einer Exposition gegenüber Blei beschäftigen. Die Untersuchung der Effekte von Blei (oder auch anderer Schwermetalle) auf die Genexpression von Fischen zeigt, dass mehrere Prozesse unterschiedlich beeinflusst werden. Übereinstimmend zeigen die Studien aus der Literatur, dass Blei einen Einfluss auf die Expression der am Stressmetabolismus beteiligten Gene hat (BOUTON ET AL., 2001, ROH ET AL., 2006, ZIRONG & SHIJUN, 2007), was in der vorliegenden Stu-

die mit *C. riparius* nicht der Fall war. Des Weiteren werden die Signaltransduktion und der Proteinmetabolismus beeinflusst (BOUTON ET AL., 2001, SARKAR ET AL., 2005).

Bei der Untersuchung der differentiell exprimierten Gene in den Studien mit Invertebraten gibt es nur selten eine Übereinstimmung mit den Proteinen, die im vorliegenden Versuch mit *C. riparius* nach einer Blei-Exposition differentiell exprimiert wurden. In der Studie von MICHAILOVA ET AL. (2001) wurden transkriptionelle und an der Signaltransduktion beteiligte Gene überexprimiert. Eine Studie von POYNTON ET AL. (2007) zur differentiellen Genexpression von *Daphnia magna* bei Metallexposition zeigt, dass die Mehrzahl der Gene reprimiert werden. Jedoch zeigten die Metalle (Kupfer, Cadmium und Zink) kein einheitliches Bild der Expression. Eine Studie mit Cadmium und *C. riparius* zeigte, dass die Energieproduktion, Nukleotidbiosynthese, Zellteilung, Transport und Bindung und der Signaltransduktion durch die Exposition beeinflusst wurden (LEE ET AL., 2006b). Es ist bekannt, dass Blei die Häm-synthese und den Eisenmetabolismus, und damit den Sauerstofftransport, negativ beeinflusst (HA & CHOI, 2008).

Die bei anderen Organismen durch Blei induzierte eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren (eIF-3 und eIF-2) spielen in der Signaltransduktion, vor allem aber in der Proteinsynthese eine Rolle (BOUTON ET AL., 2001, SARKAR ET AL., 2005). Aufgrund der regulatorischen Wirkung auf die Proteinsynthese haben die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren die Kontrolle über mehrere metabolische Prozesse (HORST ET AL., 2007). Im vorliegenden Versuch mit *C. riparius* wurde die Expression von eIF-2B durch die Exposition gegenüber Blei reprimiert. Die Unterdrückung der Expression der ribosomalen Gene führt zu einer Beeinträchtigung der funktionalen Aktivität des Nukleolus, einer wichtigen Organelle für das Überleben der Zelle, und letztendlich zu einem Abbau der Ribosomen (PLANELLÓ ET AL., 2007). Die Gene der ribosomalen Proteine gehören zur Klasse der sogenannten Haushaltsgene, die grundlegend exprimiert werden und essentiell für die zelluläre Entwicklung sind (GOVINDA ET AL., 2000).

Die Untersuchung der differentiellen Genexpression von *Caenorhabditis elegans* nach der Exposition gegenüber Schwermetallen zeigte, dass nach einer Blei-Exposition weniger ausgeprägte differentielle Expressionsunterschiede im Vergleich zur Cadmiumexposition auftraten (ROH ET AL., 2006). Eine Cadmiumexposition beeinflusste eine höhere Zahl von Genen als Blei. Wachstumsrate und Eizahl wurden durch Cadmium negativ beeinflusst, wohingegen Blei keinen Effekt auf die Eizahl hatte, aber das Wachstum induzierte (ROH ET AL., 2006). Die Korrelation der physiologischen Parameter mit den Expressionsmustern zeigte, dass bei Cadmium mehr Korrelationen (überwiegend negative) als bei Blei auftraten (hier

überwiegend positiv). Eine Aussage über eine Korrelation gibt noch keine weiteren Informationen über den Zusammenhang dieser Parameter (ROH ET AL., 2006). Umweltrelevante Cadmiumkonzentrationen induzierten aufgrund des oxidativen Stresses signifikante Veränderungen des Glutathionmetabolismus (ZIRONG & SHIJUN, 2007).

Eine Vorexposition von *Lumbricus terrestris* gegenüber Metallen führte bei erniedrigten Temperaturen nicht zu einer Beeinflussung der Respirationsrate und bei höheren Temperaturen zu einer Hemmung der Sauerstoffaufnahme, vermutlich durch die Hemmung eines Schlüsselenzyms der Hämsynthese (KHAN ET AL., 2007). Die durch höhere Temperaturen induzierten Hämoglobingehalte im Blut von *L. terrestris* werden durch Blei und andere Metalle verringert. Die erhöhten Expressionsraten der Globine bei *C. riparius* im vorliegenden Versuch nach einer Exposition gegenüber Blei entsprechen den Versuchen von LEE ET AL. (2006a), die schon nach 48 h deutliche Effekte in der Gesamtexpression von Globinen fanden. Eine Exposition der *Chironomus*-Larven gegenüber Cadmium führte dahingegen zu keinen eindeutigen Ergebnissen (LEE ET AL., 2006a).

Die 17 differentiell exprimierten Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 2,5 mg Pb/kg können in sechs verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist der Sauerstofftransport (53%), dann folgten Zellwachstum und Zytoskelett (11%). Alle Gene des Sauerstofftransports werden überexprimiert, die Gene, die am Zellwachstum beteiligte Proteine kodieren, zeigen ein uneindeutiges Bild. Bei der An- oder Abschaltung eines Stoffwechselweges sind nicht automatisch alle beteiligten Gene oder Proteine, wie z.B. hemmende Faktoren, einheitlich überexprimiert oder reprimiert (MENZEL, persönliche Mitteilung). Der negative Effekt einer Blei-Exposition auf die Globine führt vermutlich zu einer Abnahme des Sauerstoffgehalts. Die regulative Gegensteuerung des Organismus durch eine erhöhte Expression der Globin-mRNA (wie im Array zu messen ist) kann durchaus dazu führen, dass mehr Sauerstoff für den Organismus zur Verfügung steht. Wie viel im Endeffekt aktiv ankommt oder erhalten bleibt, ist alleine aufgrund der Array-Ergebnisse nicht feststellbar. Vermutlich wird weniger Energie für Wachstum und Reproduktion zur Verfügung stehen, so dass die Mücken kleiner sind und/oder weniger Gelege produzieren.

Die vermuteten wachstumsverzögernden Effekte, insbesondere einer verzögerten Häutung und Verpuppung, werden ebenso wie eine Verringerung der Überlebensrate bei hohen, jedoch ähnlichen Bleikonzentrationen wie in der vorliegenden Studie induziert (TIMMERMANS ET AL., 1992, COHN ET AL., 1992, VERMEULEN ET AL., 2000, GROSELL ET AL., 2006). Bei hohen Metallkonzentrationen ist der Reproduktionserfolg der Chironomiden verringert (POSTMA ET AL.,

1995, JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1998). Blei hat deutlich negative Effekte auf den Metabolismus mit verringerten Populationswachstumsraten aufgrund einer generell erniedrigten Fitness (POSTMA ET AL., 1995, MICHAILOVA ET AL., 2001, RABITTO ET AL., 2005).

4.2.4 Carbamazepin

Carbamazepin (CBZ) wirkt hemmend auf bestimmte Stoffwechselprozesse ein, die für die Metamorphose der Insekten wichtig sind, wie z.B. die Ecdysteroidsynthese oder der Juvenilhormonmetabolismus (NENTWIG ET AL., 2004). Der Wirkmechanismus von CBZ ist eine polare Narkose, wodurch wichtige Signale für die Metamorphose fehlen (AMBRÓSIO ET AL., 2002, DUSSAULT ET AL., 2008).

Die meisten Studien, die die Genexpression nach einer Exposition gegenüber CBZ untersuchten, wurden in Konzentrationen von 4 – 50 mg/kg an Nagetieren durchgeführt. Die Untersuchung der Genexpression bei verschiedenen Organismen zeigt ein relativ uneinheitliches Bild. An der Signaltransduktion beteiligte Gene werden je nach Organismus überexprimiert oder unterdrückt (ERTEL & COHEN, 1994, LEE ET AL., 2005, LI ET AL., 2007). Die transkriptionellen Gene und die am Zellwachstum und Zytoskelett beteiligten Gene werden reprimiert (HUA ET AL., 2001, BEUTLER ET AL., 2005). Eine Exposition gegenüber CBZ führte bei anderen Organismen zu der Expression von Genen, die am Stressmetabolismus beteiligt sind (QUINN ET AL., 2004).

Eine Exposition gegenüber CBZ führte bei *Chironomus riparius* zu der Überexpression von Genen, die im Proteinmetabolismus eine Rolle spielen, so auch von ribosomalen Proteinen. Ribosomale Proteine sind essentiell für die zelluläre Entwicklung und bilden mit den vier rRNAs (28S, 18S, 5,8S und 5S) die ribosomale „Maschinerie“ für die Proteinbiosynthese (MARTÍNEZ-GUITARTE ET AL., 2007). Ribosomale Gene gehören zu den Haushaltsgenen und erlauben bei bestimmten Substanzen und Versuchsbedingungen die relative Quantifizierung der differentiellen Expression anderer Gene unter Schadstoffstress (MARTÍNEZ-GUITARTE ET AL., 2007, FILBY & TYLER, 2007).

Eine Exposition gegenüber CBZ führt bei *C. riparius* zu einer Überexpression der am Energiemetabolismus beteiligten Gene, wie zum Beispiel Cytochrome und die Natrium-/Kalium-ATPase. Cytochrome spielen eine Rolle bei der Zellatmung und beim Elektronentransport. Sie wirken unter anderem auch als Oxidoreduktasen. Bei Beschädigungen der Mitochondrien wird Cytochrom c ins Zytosol abgegeben und löst über mehrere Reaktionskaskaden

die Apoptose aus. Die Tatsache, dass Cytochrom b und Cytochrom c mehrmals differenziell exprimiert wurden, deutet ebenso wie die Expression weiterer Oxidoreduktasen darauf hin, dass CBZ schon bei geringen Konzentration starke zytotoxische Effekte in den Chironomiden haben kann. Eine Störung der Natrium-/Kalium-ATPase führt zur Rückhaltung des intrazellulären Natriums und des extrazellulären Kaliums und begünstigt ischämische Schäden (MURAKAMI & FURUI, 1994). CBZ blockiert spannungsempfindliche Natriumkanäle, und durch die Störung der Membranstruktur kommt es zu einer Basistoxizität in Form der nicht-polaren Narkose (ERTEL & COHEN, 1994, CLEUVERS, 2003, CRANE ET AL., 2006).

Alpha-Tubulin, Aktin, Tetraspanin und BM 40 sind Gene, die eine Rolle im Zellwachstum und Zytoskelett spielen. Die Expression von BM 40, auch bekannt als Osteonectin, und Alpha-Tubulin hängt vermutlich zusammen mit ähnlichen Effekten auf das Zytoskelett (HUYNH ET AL., 2004, HOOK ET AL., 2007). BM 40 ist ein kalziumbindendes Glycoprotein und spielt eine Rolle in der Wundheilung sowie Gefäßneubildung und hat sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen (HUYNH ET AL., 2004). Aktinfilamente sind in submembranen Gegenden konzentrierte Stressfasern und geben der Zelloberfläche mechanische Resistenz (CIMA & BALLARIN, 2000). Bei einer Exposition gegenüber verschiedenen Schwermetallen und 20-Hydroxyecdysen war die Expression von Alpha-Tubulin und Aktin bei *C. tentans* deutlich erhöht (FRETZ & SPINDLER, 2001, MATTINGLY ET AL., 2001). Vermutlich hat das Häutungshormon einen kontrollierenden Einfluss auf Aktin und Tubulin; eine Beeinflussung der RNA-Stabilität wird jedoch nicht ausgeschlossen (FRETZ & SPINDLER, 2001). Die Rolle des Tubulins für das Überleben aquatischer Arthropoden ist noch unklar, es wird vermutet, dass eine veränderte Tubulinexpression die Resistenz gegenüber äußeren Schadfaktoren beeinflusst (MATTINGLY ET AL., 2001). Die Regulierung des Aktin-Zytosketts spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Morphogenese und in der synaptischen Plastizität (CARBONI ET AL., 2006).

Die gemeinsame Expression von Alpha-Tubulin und Aktin ist auch für Fische nach einer Exposition gegenüber Östrogenen beschrieben, was möglicherweise ein Hinweis auf einen ähnlichen Wirkmechanismus von CBZ ist (LARKIN ET AL., 2007). Da Tubulin und Aktin häufig nach einer Exposition gegenüber Stressoren exprimiert werden [bei TBT und CBZ in der vorliegenden Arbeit und bei Antidepressiva und Östrogenen in anderen Studien (VAN DER VEN ET AL., 2006b, LARKIN ET AL., 2007)], sind die beiden Proteine möglicherweise als allgemeine Biomarker für Chemikalienstress geeignet. Bei Chironomiden beeinflusst Aktin die Chromatinstruktur durch eine Verstärkung histonmodifizierender Enzyme, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen (PERCIPALLE & VISA, 2006). Dadurch moduliert Aktin die generelle transkriptionelle Aktivität der Zelle als Reaktion auf extrazelluläre Signale (PERCIPALLE & VISA, 2006).

Die 49 differentiell exprimierte Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 0,63 mg CBZ/kg können in sechs verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist Zellwachstum und Zytoskelett (27%), dann folgen Sauerstofftransport (25%), Protein- (17%) und Energiemetabolismus (11%). Die Gene in den jeweiligen Prozessen werden überwiegend überexprimiert. Der Sauerstofftransport ist aktiviert, was möglicherweise zu einer erhöhten Respiration und damit verbundenem erhöhten Energiebedarf führt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Überexpression der am Energiemetabolismus beteiligten Gene. Der erhöhte Energiebedarf wird vermutlich für den Metabolismus von CBZ benötigt, so dass weniger Energie für Wachstum und Entwicklung zur Verfügung steht. Demnach könnte man vermuten, dass exponierte Chironomiden mehr Zeit für ihre Entwicklung benötigen, kleiner sind und weniger Eigelege produzieren. Die Gene, die am Zellwachstum beteiligt sind, sind ebenfalls überexprimiert. Demzufolge sind Effekte auf die Zelldifferenzierung möglich und damit verbunden auch auf das Wachstum der Tiere.

Wachstumsverzögernde Effekte (speziell auf die Metamorphose) die aufgrund des vorliegenden Versuches vermutet werden, wurden durch Versuche an aquatischen Organismen bestätigt (AMBRÓSIO ET AL., 2002, CLEUVERS, 2003, NENTWIG ET AL., 2004, OETKEN ET AL., 2005). CBZ zeigte negative Effekte auf den Energiehaushalt (verringerte Aktivität) von aquatischen Invertebraten und führte bei Pflanzen- und Säugerzellen zu einer Abnahme der Zellteilung (CLEUVERS, 2003, DE LANGE ET AL., 2006).

4.2.5 Fluoxetin

Die Wirkungen von Fluoxetin sind je nach Organismus unterschiedlich. Fluoxetin beeinflusst das reproduktive Verhalten und kann die Zellteilung beschleunigen (NENTWIG, 2007). Fluoxetin hat wie Carbamazepin einen hemmenden Effekt auf zelluläre Austauschpumpen und auf die Gene des Stressmetabolismus (MUNOZ-BELLIDO ET AL., 2000, THIBAUT ET AL., 2006, DORNE ET AL., 2007). Fluoxetin wird hauptsächlich durch das CYP450-System in der Leber zu Norfluoxetin, das ebenfalls die Serotoninaufnahme hemmt, metabolisiert (KWON & ARMBRUST, 2006). Neben den zytotoxischen Effekten verändert Fluoxetin die CYP1A-Konzentrationen, was letztendlich die Metabolisierung und Toxizität der Fremdstoffe beeinflussen kann (THIBAUT & PORTE, 2008). Bei *Chaenorhabditis elegans* beeinflusst Fluoxetin die Membranproteine und erhöht die Serotoningehalten in den neuromuskulären Synapsen durch eine antagonistische Wirkung auf die Serotonintransporter (MATTHEWS & KOPCZYNSKI, 2001).

Die meisten Studien zur differentiellen Genexpression nach einer Exposition gegenüber Antidepressiva wurden an Nagetieren durchgeführt. Einige Studien untersuchten aber auch die Effekte auf die Genexpression bei Fischen. Beeinflusste Prozesse sind der Fettstoffwechsel, Energiemetabolismus, Transkription/Translation, Zellwachstum und neuroendokrine Prozesse (SEMSAR ET AL., 2004, VAN DER VEN ET AL., 2005, 2006a, b). Beim Vergleich der bei *C. riparius* differentiell exprimierten Gene mit Expressionsstudien zu Antidepressiva in der Literatur ist auffällig, dass kaum übereinstimmende Gene beeinflusst sind. Die einzigen durchgehend differentiell exprimierten Gene sind ribosomale Proteine (VAN DER VEN ET AL., 2005, 2006a). Vereinzelt Übereinstimmungen der differentiell exprimierten Gene betreffen Globine, ein proteasomähnliches Protein und ein chromatinbeeinflussendes Gen (VAN DER VEN ET AL., 2005, 2006a, b).

Eine Exposition gegenüber Fluoxetin führte bei *C. riparius* unter anderem zu einer Überexpression von Juvenilhormonsäure-Methyltransferase (JHMT), ein Gen, das bei der Entwicklung des Organismus eine Rolle spielt (SHINODA & ITOYAMA, 2003). JHMT wird insbesondere im vorletzten Larvenstadium exprimiert. Im letzten Larvenstadium wird JHMT schnell abgebaut und ist bis zur Verpuppung nicht mehr nachweisbar. Es wird vermutet, dass die Unterdrückung von JHMT für die Beendigung der Juvenilhormon-Biosynthese, einer Voraussetzung für die Metamorphose, wichtig ist (SHINODA & ITOYAMA, 2003). Eine im letzten Larvenstadium fortgesetzte Expression von JHMT würde somit die Metamorphose und damit letztendlich den Schlupf der adulten *C. riparius* beeinträchtigen.

Die 29 differentiell exprimierten Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 1,09 mg/kg Fluoxetin können in sieben verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist der Energiemetabolismus (21%), dann folgen Transkription (16%), Proteinmetabolismus (16%) und Sauerstofftransport (11%). Die Gene in den jeweiligen Prozessen werden überexprimiert, mit Ausnahme der Gene, die am Sauerstofftransport beteiligte Proteine kodieren. Aufgrund der Aktivierung des Energiemetabolismus könnte man vermuten, dass die Mücken schneller wachsen, jedoch ist es durchaus möglich, dass die Entwicklung gehemmt ist, weil die Energie für die Metabolisierung von Fluoxetin benötigt wird. Die Inaktivierung der Globine bedeutet, dass weniger Sauerstoff zur Verfügung steht und somit zu der generellen Entwicklungsverzögerung beitragen könnte.

Bei einigen Organismen führt eine Fluoxetinexposition aufgrund der manifestierten Effekte auf das aktive Verhalten zu einem verringerten Energiemetabolismus (DAUGHTON & TERNES, 1999, FORAN ET AL., 2004, DE LANGE ET AL., 2006). Im Gegensatz zu den oben vermuteten

wachstumsfördernden Effekten zeigen andere Organismen wachstumsverzögernde Effekte (BROOKS ET AL., 2003a, b). Die Reproduktion wird je nach Organismus und Fluoxetinkonzentration positiv oder negativ beeinflusst (FONG, 1998, BROOKS ET AL., 2003b, HENRY ET AL., 2004, NENTWIG, 2007, CHRISTENSEN ET AL., 2007). Eine Studie mit Mollusken bestätigte aber die vermutete erhöhte Metamorphoserate (COUPER & LEISE, 1996).

4.2.6 17 α -Methyltestosteron

17 α -Methyltestosteron (MET) ist ein Agonist des Androgenrezeptors und führt zur transkriptionellen Aktivierung verschiedener Zielgene (CRANE ET AL., 2006). Durch die Bindung am Androgenrezeptor hemmt MET die Aromatase-Aktivität, die Substanz kann jedoch auch durch den Östrogenrezeptor wirken (PAPACONSTANTINO ET AL., 2002). Die bekannten Effekte von Methyltestosteron bei Fischen beruhen entweder auf klassischen rezeptorbindenden Mechanismen und Signaltransduktionswegen oder auf Veränderungen und Störungen der Steroidbildung, des endogenen Hormontransports oder im Hormonmetabolismus (SHARPE ET AL., 2004). Am wahrscheinlichsten ist ein direkter Effekt auf die Steroidentstehung. Cytochrom P450-Enzyme metabolisieren endogene Steroide und werden ihrerseits durch die endogenen Steroidkonzentrationen reguliert (SHARPE ET AL., 2004). Durch die Wirkung als Antagonist des Glucocorticoidrezeptors können östrogene Effekte durch Androgene verstärkt werden (RAAKA ET AL., 1989).

Fast alle Studien zur differentiellen Genexpression nach einer Exposition gegenüber MET und anderen Androgenen in Konzentrationen von 0,01 ng/L bis 1 mg/L wurden an Fischen durchgeführt. Die Untersuchung der Effekte zeigt, dass die Gene des Fett-/Hormonstoffwechsels in ihrer Expression unterdrückt werden (LAZIER ET AL., 1996, BLUM ET AL., 2004, SHARPE ET AL., 2004, KORTNER & ARUKWE, 2007). Ein uneinheitliches Bild zeigen die Gene des Zellwachstums und des Energiemetabolismus, die je nach Organismus reprimiert oder auch überexprimiert werden (KITANO ET AL., 2000, TRANT ET AL., 2001, LEE ET AL., 2007, KORTNER & ARUKWE, 2007). Mehrere Studien nennen aber eine Repression der am Energiemetabolismus beteiligten Gene (KITANO ET AL., 2000, BHANDARI ET AL., 2006). Die Expression der transkriptionellen Gene wird reprimiert (SCHOLZ ET AL., 2003, BLUM ET AL., 2004).

Globine wurden in der vorliegenden Arbeit bei einer Exposition gegenüber MET sehr häufig differentiell exprimiert und auch in allen Fällen reprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression der Hämoglobine von Chironomiden nach einer Exposition gegenüber Schadstoffen (z.B. Blei und Bisphenol A) oft erhöht (HA & CHOI, 2008). Die Anwesenheit von hochaktiven

Atmungspigmenten (Globine) deutet darauf hin, dass Chironomiden effiziente antioxidative Enzymsysteme besitzen und auch an extreme Umweltbedingungen voradaptiert sind (HA & CHOI, 2008). Die Regulierung der Globinexpression auf mRNA- und Proteinebene gibt dem Organismus eine hohe Toleranz gegenüber Schadstoffen, da bei einer Exposition kaum Effekte auf physiologischer Ebene (z.B. Körpergewicht) festzustellen sind (HA & CHOI, 2008). Eine reduzierte Expression der *Chironomus*-Globine führt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Diese erhöhte Respiration löst vermutlich als Anpassung an einen schadstoffinduzierten Sauerstoffmangel Gegenmaßnahmen auf der transkriptionellen Ebene aus (ANDERSON ET AL., 2008). Im Widerspruch zu dieser These steht, dass bei *C. riparius* die Expression von Cytochrom P450 als Vertreter des Stressmetabolismus unterdrückt ist, und kaum andere Proteine/Prozesse genregulatorisch beeinflusst sind. Zur Zeit gibt es keine Studien, die eine Beeinflussung der CYP450-Expression nach einer Exposition gegenüber MET zeigen, jedoch induzierten Östrogene dessen Expression bei Fischen (SKILLMAN ET AL., 2006, LARKIN ET AL., 2007).

HORST ET AL. (2007) untersuchten in einem Akuttest die Wirkung von Methopren auf die Expression der Gene vom Amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*). Dabei stellten sie fest, dass die Expression der verschiedenen Atmungspigmente unterdrückt wurde. Da die Hummer mehrere Wochen ohne erneute Hämocyaninsynthese auskommen können, vermuten die Autoren, dass das Hauptaugenmerk auf die Synthese von anderen Molekülen verschoben wurde, um mit dem Stress zurecht zu kommen. Die Atmungsproteine spielen vermutlich auch eine Rolle im Verteidigungsmechanismus durch die Metabolisierung von Fremdstoffen (HORST ET AL., 2007, ANDERSON ET AL., 2008, HA & CHOI, 2008).

Die neun differentiell exprimierten Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 9 µg MET/kg können in drei verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist der Sauerstofftransport (84%), dann folgen Stress- und Energiemetabolismus (jeweils 8%). Alle Gene in den jeweiligen Prozessen werden reprimiert. Wenn hohe Konzentrationen einer Substanz zu einer Unterdrückung der Expression vieler Gene führen, kann dies eine allgemeine Toxizität widerspiegeln. Geänderte Genexpressionen in niedrigen Konzentrationen deuten vermutlich auf adaptive Prozesse oder (bei Arzneimitteln wie Carbamazepin oder Fluoxetin) therapeutische Wirkungen hin. Durch die Unterdrückung der an den oben genannten Prozessen beteiligten Gene kann man vermuten, dass bei hohen MET-Konzentrationen das Wachstum und die Reproduktion gehemmt werden. HOOK ET AL. (2007) postulierten die These, dass eine gesteigerte Expression des Vitellogenins die Viskosität des Bluts erhöht und dass durch eine negative Rückkopplung die Expression der Globine unterdrückt wird. Dadurch werden die Tiere vermehrt anfällig für

Verletzungen und/oder Krankheiten. Obwohl die Untersuchung der Gen-expression in der vorliegenden Arbeit keine differentielle Expression des Vitellogenins zeigte, kann der oben genannte Zusammenhang mit der Globinexpression und die damit verbundene Anfälligkeit des Organismus durchaus zutreffen.

Die wachstumsbezogenen Effekte bei anderen Organismen sind sehr widersprüchlich. In den Invertebraten-Studien zeigten sich nur bei Daphnien hemmende Effekte von MET (MU & LEBLANC, 2002). Bei Fischen kommt es sowohl zu verlangsamten Entwicklungen als auch zu einer Wachstumsförderung, mit geschlechtsspezifischen Unterschieden (VICK & HAYTON, 2001, PARROTT & WOOD, 2002, LEÓN ET AL., 2007). Generell zeigten die durchgeführten Studien negative Effekte auf die Fekundität der Weibchen sowie auf die Eizahlen und die Embryoproduktion (KIRKBRIDE-SMITH ET AL., 2001, MU & LEBLANC, 2002, SCHULTE-OEHLMANN ET AL., 2004).

4.2.7 17 α -Ethinylöstradiol

Östrogene können bei umweltrelevanten Konzentrationen die Expression einer Reihe von Genen induzieren, die Schlüsselrollen für die generelle Zellfunktion und -erhaltung spielen (FILBY & TYLER, 2007). Östrogene Substanzen zeigen komplexe Effekte mit verschiedenen Funktionen in unterschiedlichen Geweben und beeinflussen unterschiedliche Funktionen in Männchen und Weibchen. Sie stören Zytoskelettbestandteile *in vitro* und unterdrücken die Expression von mehreren Haushaltsgenen (FILBY & TYLER, 2007). 17 α -Ethinylöstradiol (EE₂) ist ein Rezeptoragonist; die Konkurrenz um den Rezeptor führt zu der östrogenen Wirkung (ESCHER ET AL., 2005). EE₂ beeinflusst die Signaltransduktion, die Transkription sowie verschiedene zelluläre Prozesse (MARTYNIUK ET AL., 2006).

Obwohl viele Studien die Effekte von Ethinylöstradiol und anderen östrogenen Substanzen in Konzentrationen von 0,001 μ g/L bis 9 mg/L auf Chironomiden untersuchten, wurde die differentielle Genexpression nicht berücksichtigt. Die meisten Genexpressionsstudien mit Östrogenen wurden an Fischen durchgeführt. Ein Vergleich dieser Studien zeigt, dass bei Östrogenkonzentrationen von 0,5 – 296 ng/L kaum übereinstimmende Gene differentiell exprimiert wurden (HOFFMANN ET AL., 2006, SKILLMAN ET AL., 2006, FILBY & TYLER, 2007, LARKIN ET AL., 2007). Die Gene der Transkription werden in ihrer Expression durch Ethinylöstradiol unterdrückt (MORTENSEN & ARUKWE, 2007b, SCHULZ ET AL., 2007), ebenso wie die Gene des (Protein-)metabolismus, des Eisenionentransports und des Immunantwortes (MOENS ET AL., 2007). Der Lipidmetabolismus ist hauptsächlich durch die differentielle Regulierung der

Vitellogeninsynthese negativ beeinflusst (MOENS ET AL., 2006). Dagegen werden die an der Signaltransduktion und an der Entwicklung und Reproduktion beteiligten Gene überexprimiert (MOENS ET AL., 2007). Synthetische Östrogene hemmen die Expression der am Stressmetabolismus beteiligten Gene, was zu potentiellen negativen Effekten und einer verringerten Entgiftungskapazität führt (LYSSIMACHOU ET AL., 2006, LARKIN ET AL., 2007, DORNE ET AL., 2007).

HOFFMANN ET AL. (2006) exponierten Zebraquärlinge gegenüber EE₂ und untersuchten die Genexpression in den Leberzellen. Zeit- und dosisabhängig wurden 448 – 1 622 Gene beeinflusst. Von diesen 1 622 Genen waren aber nur 48% identifizierbar. Diese Gene spielen unter anderem im Fett-, Vitamin- und Hormonmetabolismus sowie bei der Wachstumsregulierung eine Rolle und wirken als Monooxygenasen, Steroiddehydrogenasen, cyclinabhängige Kinasen, haben steroidbindende Wirkungen oder Ligaseaktivitäten (HOFFMANN ET AL., 2006). Die hepatische Genexpression bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach der Exposition gegenüber EE₂ zeigte, dass einige der bekannten östrogenempfindlichen Gene nicht reagierten und dass im Gegensatz dazu viele Gene mit keiner bekannten östrogenen Funktion oder Verbindung zur Toxizität von EE₂ signifikante Expressionsänderungen zeigten (SKILLMAN ET AL., 2006). Die meisten dieser Gene wurden reprimiert (140 im Vergleich zu 49). Die differentielle Expression von Genen mit keiner bekannten östrogenen Funktion scheint auch in der vorliegenden Arbeit mit *C. riparius* der Fall zu sein.

Obwohl Hitzeschockproteine generelle Stressmarker für unspezifische Stressoren sind, können sie unter bestimmten Bedingungen eine wichtige Rolle in der Steroidhormon-Signalgebung spielen (SCHIRLING ET AL., 2006, PLANELLÓ ET AL., 2008). Das hsp70-interagierende Protein wird in der vorliegenden Studie durch EE₂ reprimiert. Andere Studien zeigen dahingegen eine Überexpression verschiedener Hitzeschockproteine nach der Exposition gegenüber Östrogenen (LEE ET AL., 2006a, PLANELLÓ ET AL., 2008). Die unterschiedlichen Expressionsmuster sind möglicherweise bedingt durch Unterschiede in Versuchsdauer und -bedingungen.

Die 20 differentiell exprimierten Gene von *C. riparius* nach einer Exposition gegenüber 9 µg EE₂/kg können in sechs verschiedene Prozessklassen eingeteilt werden. Der am häufigsten beeinflusste Prozess ist der Proteinmetabolismus (32%), dann folgen Sauerstofftransport (25%) und Energiemetabolismus (19%). Die Gene in den jeweiligen Prozessen werden überwiegend reprimiert. Die Effekte auf den Organismus werden vermutlich wie bei einer Exposition gegenüber Methyltestosteron hemmend auf Wachstum und Reproduktion

tion einwirken, da die Gene der beeinflussten Prozesse bei EE₂ ebenfalls reprimiert wurden.

Entsprechend den Vermutungen überwiegen in den Studien mit Chironomiden die entwicklungs- und wachstumshemmenden Effekte bei hohen EE₂-Konzentrationen (SEGNER ET AL., 2003, WATTS ET AL., 2003, LEE & CHOI, 2007). Andere *Chironomus*-Studien zeigen im Gegensatz hierzu auch fördernde Effekte des Östrogens (WATTS ET AL., 2001, LEE & CHOI, 2007). In Zusammenhang mit den hemmenden Effekten auf Entwicklung und Wachstum können negative Effekte auf die Reproduktion vermutet werden, was durch einige Studien bestätigt wird (KRISTENSEN ET AL., 2005, PARROTT & BLUNT, 2005). Die Tatsache, dass Bisphenol A (eine Chemikalie mit östrogenen Wirkung) bei *C. riparius* die mRNA-Expression des Ecdysonrezeptors signifikant erhöhte, ist ein Hinweis darauf, dass östrogene Substanzen direkt auf das endokrine System der Insekten einwirken (PLANELLÓ ET AL., 2008).

4.2.8 Zusammenfassung

Ein Problem bei der Annotation der differentiell exprimierten Gene ist die Tatsache, dass die gesuchte Sequenz mit mehreren Sequenzen in den Datenbanken Übereinstimmungen zeigen kann und dass viele der dort eingetragenen Gene immer noch in Bezug auf ihre molekulare Funktion schlecht definiert sind (DENSLOW ET AL., 2007). Die Annotation wird zusätzlich durch Fehler in den Datenbanken erschwert. Auch die Gene Ontology-Datenbanken, die Gene nach bekannten biochemischen Stoffwechselwege katalogisieren, sind nicht immer akkurat. Erstens sind die Datenbanken unvollständig, da nur ein bestimmter Teil der Gene annotiert ist und einige Forschungsergebnisse nicht berücksichtigt sind. Zweitens sind einige der Klassifizierungen falsch bzw. ungenau und drittens werden unbekannte Funktionen nicht aufgezeichnet (KHATRI & DRÄGHICI, 2005). Einige Gene spielen in mehreren biologischen Prozessen eine Rolle, und welcher Prozess für eine spezifische Fragestellung der relevantere ist, wird durch die Datenbanken nicht aufgezeigt. Die Tatsache, dass einige Aspekte der Forschung (z.B. Apoptose) intensiver untersucht werden, führt zu einer größeren Datenmenge und somit auch zu mehr verfügbaren Informationen (KHATRI & DRÄGHICI, 2005).

Die Datenbankrecherche ergab bei allen Substanzen zwar differentiell regulierte, jedoch unbekannte Gene, die keine Übereinstimmung mit den in den Datenbanken hinterlegten Proteinen zeigten oder bei denen die Übereinstimmung vermutlich auf einem Zufall beruhte. Der Anteil dieser Gene an allen differentiell exprimierten Genen reichte von 20,0% (bei

einer Exposition gegenüber Ethinylöstradiol) bis zu 40,6% (Fluoxetin). Nach einer Exposition gegenüber Carbamazepin erhöhte sich die Zahl der nicht identifizierten Gene; diese machten aber nur 44,4% aller Gene aus. Diese Gene dürfen nicht vernachlässigt werden, da sie möglicherweise die interessantesten Gene sind und zeigen, dass hier noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

Die im Mikroarray nachgewiesenen differentiell regulierten Gene repräsentieren einen Schnappschuss der transkriptionellen Genantworten zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe bzw. Entwicklungsstadium. Die Aufklärung des Einflusses der Genexpression auf integrierende Effekte (z.B. Wachstum, Überlebensrate und Reproduktion) im ganzen Organismus ist schwierig, da eine veränderte Genexpression sowohl durch eine durch andere Faktoren geänderte Toxizität der Substanz als auch durch eine Anpassung an den Schadstoff bzw. die Belastungen herbeigeführt werden kann. Phäno- und genotypische Variablen sowie Umweltbedingungen beeinflussen die Genexpression und können die Schadstoffeffekte maskieren (NEUMANN & GALVEZ, 2002, LETTIERI, 2006, DENSLOW ET AL., 2007). Eine eindeutige Verknüpfung der veränderten Genexpression mit den sichtbaren Effekten in den Lebenszyklustests kann nur durch funktionelle Genanalysen (z.B. „Knock-out“-Experimente) erfolgen. Die Ableitung der biologischen Relevanz der Daten ist stark von der statistischen Stärke abhängig. Bei der Implementierung von Mikroarrays in der Ökotoxikologie muss auch die „normale“ Expression in den Kontrollen definiert werden. Durch das Poolen vieler RNA-Proben, speziell für die Kontrolle, kann die Variabilität reduziert und eine mittlere Genexpression festgestellt werden (LETTIERI, 2006).

4.3 Ökotoxikologie und Mikroarrays: Bewertung und Ausblick

Die Entwicklung von stressorspezifischen Genexpressionsprofilen wird einen sehr großen Einfluss auf die Ökotoxikologie haben (LETTIERI, 2006), jedoch steckt die Anwendung von Mikroarrays in der Ökotoxikologie aufgrund der Komplexität und der Zahl der technischen und biologischen Variablen, die berücksichtigt werden müssen, zur Zeit noch in den Kinderschuhen. Ein Nachteil der Anwendung von Mikroarrays in der Öko(toxiko-)logie ist die Tatsache, dass ein Mindestmaß an genetischer Information (Sequenz, Identität, molekulare Funktion, biologische Rolle, usw.) bekannt sein sollte.

Ein großes Manko für die sofortige Anwendung und die Etablierung des ChiroChips als effektives Screeninginstrument ist, dass kaum Informationen über die Funktion der beeinflussten Proteine vorhanden sind, und dass wenige Proteine oder auch Genabschnitte sequenziert

und in einer Datenbank hinterlegt sind. Zum jetzigen Stadium fehlt auch die Validierung der differentiell exprimierten Gene mittels quantitativer Real Time-PCR. Die Datenauswertung und auch die Verknüpfung der Effekte auf molekularer und organischer Ebene ist durch die fehlenden Informationen erschwert.

Das Genom der meisten in der aquatischen Ökotoxikologie verwendeten Organismen ist zudem noch unbekannt. Viele Forscher konstruieren deshalb ihre Arrays selbst. Diese basieren entweder auf cDNA-Bibliotheken für bestimmte Gewebe oder auf Bibliotheken, die mittels SSH (suppressive subtraction hybridization) oder DD-PCR (Differential Display-PCR) mit differentiell regulierten Genen angereichert sind (DENSLOW ET AL., 2007). Eine weitere Strategie bei der Arbeit mit genomisch unbekanntem Organismen liegt in der Verwendung von Arrays nah verwandter Arten (CALZOLAI ET AL., 2007). Obwohl diese Strategie bei Fischen und Säugetieren sehr gute Ergebnisse zeigte (JU ET AL., 2007), ist die Verwendung des verfügbaren *Anopheles*-Array für zukünftige Untersuchungen mit Chironomiden nicht möglich, da die hohe phylogenetische Distanz der beiden Arten und die sehr großen Unterschiede der Nukleotidsequenzen effiziente Hybridisierungen verhindern.

Zu berücksichtigen ist auch die Tatsache, dass bei den ökotoxikologischen Untersuchungen fünf verschiedene Konzentrationen über den ganzen Lebenszyklus der Mücken getestet wurden. Die Daten der molekularbiologischen Untersuchungen stammen von Larven, die über 14 Tage gegenüber den Substanzen exponiert wurden und von denen bislang nur eine Konzentration genauer untersucht wurde. So ist der Erkenntnisgewinn aus den Hybridisierungsexperimenten noch gering. Um Abhilfe zu schaffen, müssen nicht nur die Larven der anderen Konzentrationen, sondern auch die adulten Mücken hinsichtlich ihrer veränderten Genexpression unter den getesteten Expositionsbedingungen untersucht werden. Kurzfristig erreichbare Ziele bei der Anwendung von Mikroarrays in der Ökotoxikologie sind die Identifizierung der konservierten Gene, die durch Schadstoffe differentiell reguliert werden, die Beschreibung des Nutzens dieser Profile für Stressdiagnose und die Bestimmung der informativsten Gene (SNELL ET AL., 2003).

Die Tatsache, dass bei den vorliegenden Ergebnissen der ökotoxikologischen Lebenszyklustests kaum signifikante Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgezeigt werden konnten, lässt die Vermutung zu, dass *C. riparius* über effektive biochemische Verteidigungsmechanismen verfügt und somit tolerant gegenüber vielen Schadstoffen ist (LEE & CHOI, 2007). Diese Mechanismen können möglicherweise auch der Grund dafür sein, dass im Vergleich zu anderen Studien relativ wenige Gene differentiell exprimiert wurden. Jedoch ist letzteres möglicherweise auch dadurch bedingt, dass aufgrund der mangelnden Sequenzkenntnis-

se die Auswahl der Klone, die auf dem Chip gespottet wurden, willkürlich erfolgte. Die geringe Anzahl der empfindlichen Gene kann auch daran liegen, dass die Gesamt-RNA aus Homogenaten von mehreren Larven extrahiert wurde. Proteine werden jedoch auch gewebespezifisch exprimiert. Die Extraktion von RNA aus Homogenaten wurde aus arbeitsökonomischen Gründen angewendet und ist in der wissenschaftlichen Gemeinschaft durchaus üblich (MARTÍNEZ-GUITARTE ET AL., 2007, PLANELLÓ ET AL., 2007, OSMAN & VAN NOORT, 2007).

Die oft postulierte Zeit- und Kostenersparnis der Mikroarrays ist nicht unbedingt realistisch. Die Expositionsdauer verkürzt sich zwar auf zwei Wochen, die informative und statistische Auswertung wie auch die korrekte Interpretation der Daten sind jedoch sehr arbeitsintensiv. Obwohl die Zahl der benötigten Versuchsorganismen für die Anwendung der Mikroarrays verringert werden kann, muss dennoch eine Exposition erfolgen. Demnach ist eine Anwendung des Mikroarrays als Screeningverfahren durchaus sinnvoll. Jedoch sollte man anschließend zu schnelleren Methoden, wie z.B. die quantitative RT-PCR, wechseln.

Zeitliche Muster der Genexpression zeigen ein wichtiges Bild der genetischen Regulierung als Antwort auf eine Exposition. Die korrekte Interpretation der Mikroarray-Daten setzt voraus, dass Daten aus Experimenten zu Zeit- und Konzentrationsreihen zur Verfügung stehen (NEUMANN & GALVEZ, 2002). Des Weiteren müssen noch Untersuchungen hinsichtlich der konzentrationsabhängigen Genexpression erfolgen. Damit wurde bei GENTERprise Genomics schon für Fluoxetin (FX) begonnen, die Auswertung steht aber noch am Anfang. Im Vergleich zur Genexpression nach einer Exposition der Larven gegenüber 0,2 mg FX/kg werden bei einer Exposition gegenüber 0,9 mg/kg sehr viele Gene differentiell exprimiert (siehe Abbildungen im Anhang). In diesem Stadium der Auswertung muss jedoch damit gerechnet werden, dass unter diesen Genen viele falsch positive Ergebnisse zu finden sind. Die Genexpression nach einer Exposition gegenüber 5,9 mg FX/kg zeigt im Vergleich zu 0,9 mg/kg nur wenige Unterschiede. Der geringe Unterschied der differentiell exprimierten Gene in der höchsten Konzentration beruht vermutlich darauf, dass die *Chironomus*-Larven sich an den Schadstoff angepasst haben (übereinstimmend mit einer geringeren Mortalität im Vergleich zur Kontrolle, siehe Kapitel 3.1.2). 0,9 mg FX/kg scheint dagegen die kritische Konzentration für *Chironomus riparius* zu sein, was sich auch in einer signifikant erhöhten Mortalität bemerkbar machte. Bei 0,9 mg FX/kg sind auch die meisten ökotoxikologischen Effekte zu verzeichnen (siehe Kapitel 3.1.2).

Weiterhin ist es wichtig, die Genexpression in unbelasteten Chironomiden abhängig vom Lebenszyklusstadium zu untersuchen. So mag man vielleicht immer noch nicht wissen, welches Gen exprimiert wird, hätte aber Informationen über das Stadium (Larval- oder Pup-

penstadium, Imaginalphase), in dem dieses Gen eine Rolle spielt. Mit diesem Wissen können dann die Leitgene identifiziert werden, die als Biomarker für eine Chemikalienbewertung oder im Gewässermonitoring verwendet werden können.

5 Zusammenfassung

Die Effekte abiotischer Stressoren und Substanzen verschiedener Schadstoffklassen auf *Chironomus riparius* wurden sowohl im Lebenszyklustest als auch auf genomischer Ebene mit dem Ziel untersucht, ein auf einem DNA-Mikroarray („ChiroChip“) basierendes Screeningverfahren zu entwickeln. Der ChiroChip ist der erste uns bekannte Mikroarray mit *Chironomus*-cDNA.

Die empfindlichsten Endpunkte der Lebenszyklustests für alle Substanzen mit signifikanten Unterschieden zu den Kontrollen waren die Mortalität, der Anteil fruchtbarer Eigelege, der mittlere Schlupfzeitpunkt der Weibchen sowie das Gewicht der Männchen. Temperaturveränderungen um $\pm 6^\circ\text{C}$ gegenüber einer normalen Hälterungstemperatur von 20°C führten in allen Endpunkten zu hochsignifikanten Effekten. Eine LC_{10} konnte nur für die Salinität berechnet werden (0,66‰, KI: 0,26 – 1,68‰). Aufgrund der nicht-linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnte nur für den mittleren Schlupfzeitpunkt der Weibchen nach einer Exposition gegenüber Cadmium eine EC_{50} (0,53 mg/kg, KI: 0,29 – 0,97 mg/kg) bestimmt werden. Obwohl die Substanzen in den untersuchten Konzentrationen nicht unmittelbar toxisch wirkten, sind Effekte auf Entwicklung und Fortpflanzung der Population nicht auszuschließen.

In den Versuchen mit Methyltestosteron, Ethinylöstradiol, Carbamazepin, Fluoxetin, Blei und Tributylzinn (mit denen auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt wurden) waren die empfindlichsten Endpunkte mit signifikanten Unterschieden zur Kontrolle die Mortalität, der Anteil fruchtbarer Eigelege, der mittlere Schlupfzeitpunkt der Weibchen sowie die Populationswachstumsrate. Carbamazepin (CBZ) wirkte schlupfverzögernd bei den Weibchen. 10 mg CBZ/kg führte zu einer höheren Mortalität, weniger Eigelegen, die auch vermehrt unfruchtbar waren, sowie zu einer geringeren Populationswachstumsrate. Fluoxetin (FX) wirkte bei beiden Geschlechtern schlupfverzögernd. 0,9 mg FX/kg führte zu einer erhöhten Mortalität, weniger und vermehrt unfruchtbaren Eigelegen und einer geringeren Populationswachstumsrate. In der höchsten Konzentration (5,9 mg/kg) waren die Weibchen leichter als die Kontrolltiere.

Tributylzinn (in $\mu\text{g Sn/kg}$ angegeben) bewirkte eine höhere Mortalität und geringere Populationswachstumsrate bei $100 \mu\text{g Sn/kg}$ und führte zu einer Verzögerung im Schlupfverlauf bei den Weibchen. Bei $160 \mu\text{g Sn/kg}$ gab es weniger Eigelege, die auch vermehrt unfruchtbar waren. Die Männchen, die gegenüber Konzentrationen von 120 und $160 \mu\text{g Sn/kg}$ exponiert wurden, waren leichter als die Kontrolle. Expositionen gegenüber Blei (Pb) in Kon-

zentrationen von 0,65 – 65 mg/kg führten bei 6,5 mg Pb/kg zu einer erhöhten Mortalität und zu mehr unfruchtbaren Gelegen. Bei 0,65 mg Pb/kg waren die Männchen leichter und bei 6,5 mg Pb/kg schwerer. Die Anzahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen war bei 3,25 und 6,5 mg Pb/kg geringer als in der Kontrolle.

Die gegenüber 17 α -Methyltestosteron (MET) exponierten Mücken hatten geringere Mortalitäten als in der Kontrolle und zeigten auch einen verfrühten Schlupf beider Geschlechter. Ab 27 μ g MET/kg gab es weniger unfruchtbare Gelege, leichtere Männchen sowie erhöhte Populationswachstumsraten. 17 α -Ethinylöstradiol (EE₂) führte ebenfalls zu einem verfrühten Schlupf bei beiden Geschlechtern sowie zu erhöhten Populationswachstumsraten. Bei 9 μ g EE₂/kg gab es weniger unfruchtbare Gelege.

Die Exposition von *Chironomus*-Larven gegenüber Methyltestosteron, Ethinylöstradiol, Fluoxetin, Carbamazepin, Tributylzinn und Blei führte zur differentiellen Expression von neun (Methyltestosteron) bis 49 (Carbamazepin) Genen. Bei der Untersuchung der exprimierten Proteine fällt auf, dass kaum bekannte Stressproteine (z.B. Glutathion-S-Transferase oder Cytochrom P450) differentiell reguliert wurden. Bei der Exposition wurden verschiedene Prozesse durch eine veränderte Genexpression beeinflusst. Eine Exposition gegenüber Methyltestosteron führte nur zu einer Beeinträchtigung von drei identifizierten biologischen Prozessen, während bei den anderen Substanzen sieben bis acht Prozesse beeinflusst waren. Die am häufigsten beeinflussten Prozesse waren der Protein- und der Energiemetabolismus. Der Sauerstofftransport ist ein Prozess, der bei allen Substanzen beeinflusst wurde, jedoch mit unterschiedlichen Anteilen. Bei einer Exposition gegenüber Methyltestosteron war der Anteil des Sauerstofftransports an den beteiligten Prozessen mit 84,6% am größten und mit 10,5% bei Fluoxetin am geringsten. Die veränderte Genexpression der Globine kann möglicherweise aufgrund der schadstoffspezifischen Veränderungen als Biomarker für das Monitoring von Freilandgewässern angewendet werden. Da Tubulin und Aktin häufig nach einer Exposition gegenüber Stressoren differentiell exprimiert wird (bei Tributylzinn und CBZ in der vorliegenden Arbeit und bei Antidepressiva und Östrogenen in anderen Studien) wären die beiden Proteine möglicherweise ebenfalls als Biomarker für Chemikalienstress geeignet.

Vor der Verwendung des ChiroChips als Screeninginstrument für die Chemikalienuntersuchung und das Biomonitoring müssen noch Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Genexpression und zur Expression in unbehandelten Larven und weiteren Lebensstadien erfolgen. Des Weiteren müssen die vorliegenden Daten verifiziert und die Funktion der differentiell regulierten Gene vertieft untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- ABC Laboratories (1995). Toxicity of nonylphenol to the midge *Chironomus tentans*. Report 41570. Chemical Manufacturers Association, Washington, DC, USA.
- Afshari AC, Nuwaysir EF & Barrett JC (1999). Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology and drug safety evaluation. *Cancer Res.* 59(19): 4759–4760.
- Ahel M & Giger W (1993). Partitioning of alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26(88): 1471–1478.
- Ahel M, Giger W & Koch M (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment: I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28(55): 1131–1142.
- Airas S, Leppänen M & Kukkonen JVK (2008). Effects of temperature and oxygen concentration in sediment toxicity testing. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86(2): 148–156.
- Åkerblom N & Goedkoop W (2003). Stable isotopes and fatty acids reveal that *Chironomus riparius* feeds selectively on added food in standardized toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(7): 1473–1480.
- Al-Ghais SM & Ali B (1999). Inhibition of glutathione S-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62(2): 207–213.
- Allanou R, Hansen BG & van der Bilt Y (1999). Public availability of data on EU high production volume chemicals. JRC report EUR 18996 EN, 21 Seiten, Ispra, Italien: Europäische Kommission, Joint Research Centre.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389–3402.
- Ambrósio AF, Soares-Da Silva P, Carvalho CM & Carvalho AP (2002). Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem. Res.* 27(1-2): 121–130.
- AnabolicWeb (2007). Methyltestosterone. (www.anabolicweb.com/methyltestosterone.html).
- Andersen HR, Wollenberger L, Halling-Sørensen B & Kusk KO (2001). Development of copepod nauplii to copepodites – A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(12): 2821–2829.
- Anderson RL, Walbridge CT & Fiandt JT (1980). Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9(3): 329–335.
- Anderson TD, Jin-Clark Y, Begum K, Starkey SR & Zhu KY (2008). Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. *Aquat. Toxicol.* 86(2): 148–156.

- Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC & Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(6): 1350–1360.
- Ankley GT, Daston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, Miracle AL, Perkins EJ, Snape J, Tillitt DE, Tyler CR & Versteeg D (2006). Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 40(13): 4055–4065.
- Arambarri I, Garcia R & Millan E (2003). Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere* 51(8): 643–649.
- Armitage PD, Cranston PS & Pinder LCV (1995). *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, London, Großbritannien.
- Arukwe A, Förlin L & Goksøyr A (1997). Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(12): 2576–2583.
- ASP (1999). *Arzneistoffprofile – Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe*. Dinnendahl VV & Fricke U (Hrsg.). Loseblattsammlung der Arbeitsgemeinschaft Pharmazeutische Information (API), GOVI Verlag, Pharmazeutischer Verlag, Frankfurt/Main.
- Atkinson D (1994). Temperature and organism size: A biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25: 1–58.
- Azmitia EC (1999). Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacol.* 21(2): S33–S45.
- Azumi K, Fujie M, Usami T, Miki Y & Satoh N (2004). A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians. *Mar. Environ. Res.* 58(2-5): 543–546.
- Bailey PC & James KR (2000). *Riverine and wetland salinity – Assessment of R & D needs*. Land and Water Resources Research and Development Corporation. Occasional paper No. 25/99.
- Baken KA, Arkusz J, Pennings JL, Vandebriel RJ & van Loveren H (2007). In vitro immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) studied by toxicogenomics. *Toxicology* 237(1): 35–48.
- Barjaktarovic L & Bendell-Young LI (2001). Accumulation of ¹⁰⁹Cd by second-generation Chironomidae propagated from wild populations sampled from low-, mid-, and high-saline environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40(3): 339–344.
- Baronti C, Curini R, D’Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A & Saperi R (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 34(24): 5059–5066.
- Bat L & Akbulut M (2001). Studies on sediment toxicity bioassays using *Chironomus thummi* K, 1911 larvae. *Turk. J. Zool.* 25: 87–93.
- Bechmann RK (1999). Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci. Total Environ.* 233(1–3): 33–46.
- Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB, Peart TE & Maguire RJ (1997). Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St Lawrence River. *Sci. Total Environ.* 193(3): 263–275.

- Benoit DA, Sibley PK, Juenemann JL & Ankley GT (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(6): 1165–1176.
- Berezina NA (2003). Tolerance of freshwater invertebrates to changes in water salinity. *Russ. J. Ecol.* 34(4): 261–266.
- Bervoets L & Blust R (2000). Effects of pH on cadmium and zinc uptake by the midge larvae *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 49(1–2): 145–157.
- Bervoets L, Panis LI & Verheyen R (1994). Trace metal levels in water, sediments and *Chironomus gr thummi*, from different water courses in Flanders (Belgium). *Chemosphere* 29(8): 1591–1601.
- Bervoets L, Blust R & Verheyen R (1995). The uptake of cadmium by the midge larvae *Chironomus riparius* as a function of salinity. *Aquat. Toxicol.* 33(3–4): 227–243.
- Bervoets L, Blust R & Verheyen R (1996a). Uptake of zinc by the midge larvae *Chironomus riparius* at different salinities: Role of speciation, acclimation, and calcium. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(8): 1423–1428.
- Bervoets L, Blust R & Verheyen R (1996b). Effect of temperature on cadmium and zinc uptake by the midge larvae *Chironomus riparius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31(4): 502–511.
- Bervoets L, Wils C & Verheyen R (1996c). Tolerance of *Chironomus riparius* larvae (Diptera: Chironomidae) to salinity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57(5): 829–835.
- Bervoets L, Meregalli G, De Cooman W, Goddeeris B & Blust R (2004). Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(2): 443–454.
- Bettin C, Oehlmann J & Stroben E (1996). TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoland Mar. Res.* 50(3): 299–317.
- Bettinetti R & Provini A (2002). Toxicity of 4-nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-day whole-sediment tests. *Ecotox. Environ. Saf.* 53(1): 113–121.
- Bettinetti R, Cuccato D, Galassi S & Provini A (2002). Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 46(2): 201–207.
- Beutler AS, Li A, Nicol R & Walsh MJ (2005). Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci.* 76(26): 3107–3115.
- Bhandari RK, Nakamura M, Kobayashi T & Nagahama Y (2006). Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrin.* 145(1): 20–24.
- Bhosle NB, Garg A, Jadhav S, Harjee R, Sawant SS, Venkat K & Anil AC (2004). Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. *Chemosphere* 57(8): 897–907.
- Bliefert C (2002). *Umweltchemie*. 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Blum JL, Knoebl I, Larkin P, Kroll KJ & Denslow ND (2004). Use of suppressive subtractive hybridization and cDNA arrays to discover patterns of altered gene expression in the liver of dihydrotestosterone and 11-ketotestosterone exposed adult male largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Mar. Environ. Res.* 58(2–5): 565–569.

- Bound JP & Voulvoulis N (2004). Pharmaceuticals in the aquatic environment – a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 56(11): 1143–1155.
- Bouton C, Hossain MA, Frelin LP, Laterra J & Pevsner J (2001). Microarray analysis of differential gene expression in lead-exposed astrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176(1): 34–53.
- Brodersen KP & Anderson NJ (2000). Subfossil insect remains (Chironomidae) and lake-water temperature inference in the Sisimiut-Kangerlussuaq region, southern West Greenland. *Geology of Greenland Survey Bulletin* 186: 78–82.
- Brodersen KP & Anderson NJ (2002). Distribution of chironomids (Diptera) in low arctic West Greenland lakes: trophic conditions, temperature and environmental reconstruction. *Freshwater Biol.* 47(6): 1137–1157.
- Brooke LT (1993). Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. USEPA contract no. 68-C1-0034, S. 1-36, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, USA.
- Brooks BW, Foran CM, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, Solomon KR, Slattery M & La Point TW (2003a). Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142(3): 169–183.
- Brooks BW, Turner PK, Stanley JK, Weston JJ, Glidewell EA, Foran CM, Slattery M, La Point TW & Huggett DB (2003b). Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52(1): 135–142.
- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD & Lewis RJ (2005). Determination of select antidepressants in fish from an effluent dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(2): 464–469.
- Brown RJ, Conradi M & Depledge MH (1999). Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). *Sci. Total Environ.* 233(1–3): 77–88.
- Bruchhausen FV, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E & Holzgrabe U (1993). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Bd. 8. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Brun GL, Bernier M, Losier R, Doe K, Jackman P & Lee HB (2006). Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(8): 2163–2176.
- Bruner KA & Fisher SW (1993). The effects of temperature, pH, and sediment on the fate and toxicity of 1-naphthol to the midge larvae *Chironomus riparius*. *J. Environ. Sci. Health Part A* 28(6): 1341–1360.
- Brüschweiler BJ, Wurgler FE & Fent K (1996). Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(5): 728–735.
- BUA (1988). Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid). Stoffbericht 36 des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA). VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.
- BUA (1991). Nonylphenol. Stoffbericht 13 des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA). VCH, Weinheim, Deutschland.

- BUA (2003). Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid). Stoffbericht 238 (Ergänzungsberichte IX) des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland.
- Burton ED, Phillips IR & Hawker DW (2005). In-situ partitioning of butyltin compounds in estuarine sediments. *Chemosphere* 59(5): 585–592.
- Calzolari L, Ansorge W, Calabrese E, Denslow N, Part P & Lettieri T (2007). Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genom. Proteomics* 2(3): 245–249.
- Campiche S, Becker-Van Slooten K, Ridreau C & Tarradellas J (2006). Effects of insect growth regulators on the nontarget soil arthropod *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63(2): 216–225.
- Carballa M, Omil F, Lema JM, Llompart M, Garcia-Jares C, Rodriguez I, Gomez M & Ternes T (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38(12): 2918–2926.
- Carboni L, Righini M, Piubelli C, Castelletti L, Milli A & Domenica E (2006). Proteomic analysis of rat hippocampus and frontal cortex after chronic treatment with fluoxetine or putative novel antidepressants: CRF1 and NK1 receptor antagonists. *Eur. Neuropsychopharm.* 16(7): 521–537.
- Carlsson C, Johansson AK, Alvan G, Bergmann K & Kuhler T (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364(1–3): 67–87.
- Castro LF, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, Nakanishi T, Reis-Henriques MA & Santos MM (2007). Imposex induction is mediated through the retinoid x receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat. Toxicol.* 85(1): 57–66.
- Cespedes R, La Corte S, Ginebreda A & Barcelo D (2006). Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Anal. Bioanal. Chem.* 385(6): 992–1000.
- Chapin RE, Stevens JT, Hughes CL, Kelce WR, Hess RA & Daston GP (1996). Endocrine modulation of reproduction. *Fundam. App. Toxicol.* 29(1): 1–17.
- Choi J & Roche H (2004). Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: Potential biomarker of environmental monitoring. *Environ. Monit. Assess.* 92(1–3): 229–239.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156–159.
- Christensen AM, Faaborg-Andersen S, Ingerslev F & Baun A (2007). Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(1): 85–91.
- Cima F & Ballarin L (2000). Tributyltin induces cytoskeletal alterations in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* phagocytes via interaction with calmodulin. *Aquat. Toxicol.* 48(4): 419–429.

- Ciutat A & Boudou A (2003). Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(7): 1574–1581.
- Cleuvers M (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142(3): 185–194.
- Clark TM, Flis BJ & Remold SK (2004). Differences in the effects of salinity on larval growth and developmental programs of a freshwater and an euryhaline mosquito species (Insecta: Diptera, Culicidae). *J. Exp. Biol.* 207(13): 2289–2295.
- Cleveland WS (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Am. Stat. Ass.* 74(368): 829–836.
- Coats JR (1994). Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 489–515.
- Cohn J, Widzowski DV & Coryslechta DA (1992). Lead retards development of *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 102(1): 45–49.
- Couper JM & Leise EM (1996). Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biol. Bull.* 191(2): 178–186.
- Crane M, Watts C & Boucard T (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 367(1): 23–41.
- Croce V, De Angelis S, Patrolecco L, Polesello S & Valsecchi S (2005). Uptake and accumulation of sediment-associated 4-nonylphenol in a benthic invertebrate (*Lumbriculus variegatus*, freshwater Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 24(5): 1165–1171.
- Csondes A (2004). Environmental fate of methoprene. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulations, Sacramento, CA, USA.
- Czech P, Weber K & Dietrich DR (2001). Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat. Toxicol.* 53(2): 103–114.
- Daughton CG & Ternes TA (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107(Suppl. 6): 907–938.
- Day K, Maguire RJ, Milani D & Batchelor SP (1998). Toxicity of tributyltin to four species of freshwater benthic invertebrates using spiked sediment bioassays. *Water Qual. Res. J. Canada* 33(1): 111–132.
- De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lurling M & Peeters ETHM (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 78(3): 209–216.
- De Mora SJ, Stewart C & Phillips D (1995). Sources and rate of degradation of tri(N-butyl)tin in marine sediments near Auckland, New-Zealand. *Mar. Pollut. Bull.* 30(1): 50–57.
- Delmotte S, Meysman FJR, Ciutat A, Boudou A, Sauvage S & Gerino M (2007). Cadmium transport in sediments by tubificid bioturbation: An assessment of model complexity. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71(4): 844–862.
- Denslow DN, Garcia-Reyero N & Barber DS (2007). Fish 'n' chips: The use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol. Biosyst.* 3(3): 172–177.
- Dhadialla TS, Carlson GR & Le DP (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 545–569.

- DIN (1996). DIN 38406 E29. Bestimmung von 61 Elementen durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN (2003). DIN 19744. Identifizierung und Quantifizierung von Organozinnverbindungen in Feststoffen (Böden, Sedimente, Abfälle). Beuth Verlag, Berlin.
- Dinan L, Bourne P, Whiting P, Dhadialla TS & Hutchinson TH (2001). Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B-II cell in vitro assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(9): 2038–2046.
- Dorne J, Skinner L, Frampton GK, Spurgeon DJ & Ragas AMJ (2007). Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: Differences, similarities, lessons from toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.* 387(4): 1259–1268.
- Drăghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z (2006). Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* 22(2): 101–109.
- Dubey SK, Tokashiki T & Suzuki S (2006). Microarray-mediated transcriptome analysis of the tributyltin (TBT)-resistant bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 25W in the presence of TBT. *J. Microbiol.* 44(2): 200–205.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B & Oehlmann J (2003a). Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(1): 145–152.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M & Oehlmann J (2003b). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquat. Toxicol.* 64(4): 437–449.
- Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U & Oehlmann J (2007). Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 16(1): 169–182.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen YD, Meltzer P & Trent JM (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(Suppl. 1): 10–14.
- Dunlop J, McGregor G & Horrigan N (2005). Potential impacts of salinity and turbidity in riverine ecosystems. National action plan for salinity and water quality. WQ06 Technical report.
- Dunlop JA, Horrigan N, McGregor G, Kefford BJ, Choy S & Prasad R (2008). Effect of spatial variation on salinity tolerance of macroinvertebrates in Eastern Australia and implications for ecosystem protection trigger values. *Environ. Pollut.* 151(3): 621–630.
- Durhan EJ, Lambright C, Wilson V, Butterworth BC, Kuehl DW, Orlando EF, Guillette Jr LJ, Gray LE & Ankley GT (2002). Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(9): 1973–1976.
- Dussault ÈB, Balakrishnan VK, Sverko E, Solomon KR & Sibley PK (2008). Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(2): 425–432.
- Eisler R (1988). Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. US Fish and Wildlife Service. Biological report 85 (1.14).

- Ekelund R, Granmo Å, Magnusson K, Berggren M & Bergman Å (1993). Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. Poll.* 79(1): 59–61.
- Ellis-Tabanor M & Hystop E (2005). Effect of sublethal concentrations of endosulfan on growth and fecundity of two species of snails. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74(6): 1173–1178.
- EMBL-EBI (2007). InterPro: Databases. (www.ebi.ac.uk/interpro/).
- England DC & Bussard JB (1993). Toxicity of nonylphenol to the midge *Chironomus tentans*, Analytical Bio-Chemistry Laboratories, Inc., Report No. 40597, Chemical Manufacturers Association, Washington, DC, USA.
- Environment Agency (2004). Pollution inventory data report: Trends and analysis 1998-2001. Environment Agency, Bristol, Großbritannien.
- Ertel EA & Cohen CJ (1994). Voltage-dependent interactions: The influence and significance of membrane-potential on drug-receptor interactions. *Drug Dev. Res.* 33(3): 203–213.
- Escher BI, Bramaz N, Eggen RIL & Richter M (2005). In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environ. Sci. Technol.* 39(9): 3090–3100.
- Fang H, Tong WD, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W & Sheehan DM (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 16(10): 1338–1358.
- Fargašová A (1998). Comparison of tributyltin compound effects on the alga *Scenedesmus quadricauda* and the benthic organisms *Tubifex tubifex* and *Chironomus plumosus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41(3): 222–230.
- Faria MS, Nogueira AJA & Soares AMVM (2007). The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(2): 218–226.
- FDA (2003). Sales and use of fluoxetine in children, adolescents and women of child-bearing age. Food and Drug Administration Division of Surveillance, Research and Communication Support, Office of Drug Safety. Rockville, MD, USA.
- Feng L, Miao W & Wu Y (2007). Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. *Aquat. Toxicol.* 81(1): 99–105.
- Fent K & Bucheli TD (1994). Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in-vitro in fresh-water fish. *Aquat. Toxicol.* 28(1-2): 107–126.
- Fent K & Stegeman JJ (1991). Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquat. Toxicol.* 20(3): 159–168.
- Fent K, Weston AA & Caminada D (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76(2): 122–159.
- Fernández-Casalderrey A, Ferrando MD & Andreu-Moliner E (1993). Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 106(2): 437–441.
- Ferrari B, Paxeus N, Lo Giudice R, Pollio A & Garric J (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55(3): 359–370.

- Feuchtmayr H, McKee D, Harvey IF, Atkinson D & Moss B (2007). Response of macroinvertebrates to warming, nutrient addition and predation in large-scale mesocosm tanks. *Hydrobiologia* 584(1): 425–432.
- Ficke AD, Myrick CA & Hansen EJ (2007). Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 17(4): 581–613.
- Filby AL & Tyler CR (2007). Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol. Biol.* 8: 10.
- Fong PP (1998). Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* 194(2): 143–149.
- Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW & Huggett DB (2004). Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(4): 511–517.
- Forbes VE & Cold A (2005). Effects of the pyrethroid esfenvalerate on life cycle traits and population dynamics of *Chironomus riparius* – importance of exposure scenario. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(1): 78–86.
- Fox JE, Starcevic M, Jones PE, Burow ME & McLachlan JA (2004). Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 112(6): 672–677.
- Fretz A & Spindler KD (2001). Hormonal regulation of actin and tubulin in an epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46(1–2): 11–18.
- Frouz J, Ali A & Lobinske RJ (2002). Influence of temperature on developmental rate, wing length, and larval head capsule size of pestiferous midge *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae). *J. Econ. Entomol.* 95(4): 699–705.
- García-Reyero N, Raldúa D, Quirós L, Llaveria G, Cerdà J, Barceló D, Grimalt JO & Piña B (2004). Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal. Bioanal. Chem.* 378(3): 670–675.
- Garg RC & Donahue WA (1989). Pharmacologic profile of methoprene, an insect growth regulator, in cattle, dogs, and cats. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 194(3): 410–412.
- Gauss JD, Woods PE, Winner RW & Skillings JH (1985). Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness-alkalinity. *Environ. Poll. Ser. A* 37(2): 149–157.
- Gene Ontology (2007). GO Annotation guide. (www.geneontology.org/GO.annotation.shtml).
- Ghekiere A, Verslycke T & Janssen C (2006a). Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *Gen. Comp. Endocrin.* 147(2): 190–195.
- Ghekiere A, Verslycke T, Fockedeij N & Janssen CR (2006b). Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 332(2): 226–234.
- Giesy JP, Pierens SL, Snyder EM, Miles-Richardson S, Kramer VJ, Snyder SA, Nichols KM & Villeneuve DA (2000). Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19(5): 1368–1377.

- Gildemeister T (2007). Comparative toxicity of eight model substances to the sediment dwelling invertebrates *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius*. Dissertation, Fachbereich Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften, TU Dresden, Deutschland.
- Gladyshev MI, Gribovskaya IV, Moskvicheva AV, Muchkina EY, Chuprov SM & Ivanova EA (2001). Content of metals in compartments of ecosystem of a Siberian pond. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41(2): 157–162.
- Glare TR & O’Callaghan M (1999). Environmental and health impacts of the insect juvenile hormone analogue, S-methoprene. Report for the Ministry of Health. Biocontrol and Biodiversity, Grasslands Division, AgResearch, Lincoln.
- Goetsch PA & Palmer CG (1997). Salinity tolerances of selected macroinvertebrates of the Sabie River, Kruger National Park, South Africa. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32(1): 32–41.
- Gordon DA, Toth GP, Graham DW, Lazorchak JA, Redd TV, Knapp CW, de Noyelles F, Campbell S & Lattier DL (2006). Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -ethynylestradiol in field mesocosms. Environ. Pollut. 142(3): 559–566.
- Govinda S, Kutlow T & Bentivegna CS (2000). Identification of a putative ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius* and its response to cadmium, heat shock, and actinomycin D. J. Biochem. Mol. Tox. 14(4): 195–203.
- Grosell M, Gerdes RM & Brix KV (2006). Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates – *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans* and *Lymnaea stagnalis*. Environ. Toxicol. Chem. 25(1): 97–104.
- Guan R & Wang WX (2006). Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 141(2): 343–352.
- Gülden M, Turan A & Seibert H (1997). Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltbundesamt Berlin (UBA-Texte 46/97).
- Gündel U, Benndorf D, von Bergen M, Altenburger R & Küster E (2007). Downstream von Genomics: I Proteomics in Zebrafisch-Embryonen. In: Stoffbewertung in einer sich wandelnden Umwelt, Abstractband der 12. Jahrestagung der SETAC-GLB in Leipzig, S. 57–58.
- Ha MH & Choi J (2008). Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. Chemosphere 71(10): 1928–1936.
- Habermehl G, Hammann PE & Krebs HC (2002). Naturstoffchemie, 2. bearbeitete Auflage. Springer Verlag, Berlin, Deutschland.
- Hahn T & Schulz R (2002). Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. Environ. Toxicol. Chem. 21(5): 1052–1057.
- Hahn T, Schenk K & Schulz R (2002). Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. Environ. Poll. 120(3): 525–528.
- Hall CJ & Burns CW (2002). Mortality and growth responses of *Daphnia carinata* to increases in temperature and salinity. Freshwater Biol. 47(3): 451–458.

- Han DH, Denison MS, Tachibana H & Yamada K (2002a). Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(7): 1479–1487.
- Han FXX, Banin A, Su Y, Monts DL, Plodinec MJ, WL Kingery & Triplett GE (2002b). Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften* 89(11): 497–504.
- Han GH, Hur HG & Kim SD (2006). Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: Occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(1): 265–271.
- Hansen FT, Forbes VE & Forbes TL (1999). Effects of 4-n-nonylphenol on life-history traits and population dynamics of a polychaete. *Ecol. Appl.* 9(2): 482–495.
- Hare L, Tessier A & Warren L (2001). Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(4): 880–889.
- Harford AJ, O'Hallaran K & Wright PFA (2007). Effect of in vitro and in vivo organotin exposures on the immune functions of murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Environ Toxicol. Chem.* 26(8): 1649–1656.
- Harrahy EA & Clements WH (1997). Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(2): 317–327.
- Harris CA, Santos EM, Janbakhsh A, Pottinger TG, Tyler CR & Sumpter JP (2001). Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 35(14): 2909–2916.
- Hart BT, Bailey P, Edwards R, Hortle K, James K, McMahon A, Meredith C, Swadling K (1991). A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia* 210(1–2): 105–144.
- Hartke K & Mutschler E (Hrsg.) (1993). *Deutsches Arzneibuch DAB 10 – Kommentar*, 10. Ausgabe, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart.
- Hassell KL, Kefford BJ & Nugegoda D (2006). Sub-lethal and chronic salinity tolerances of three freshwater insects: *Cloeon* sp and *Centroptilum* sp (Ephemeroptera: Baetidae) and *Chironomus* sp (Diptera: Chironomidae). *J. Exp. Biol.* 209(20): 4024–4032.
- Heberer T (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131(1–2): 5–17.
- Hecht SA, Gunnarsson JS, Boese BL & Lamberson JO (2004). Influences of sedimentary organic matter quality on the bioaccumulation of 4-nonylphenol by estuarine amphipods. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(4): 865–873.
- Henrick CA, Willy WE & Staal GB (1976). Insect juvenile hormone activity of alkyl(2e,4e)-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoates – variations in ester function and in carbon chain. *J. Agric. Food Chem.* 24(2): 207–218.
- Henry RA & Byington KH (1976). Inhibition of glutathione-S-aryltransferase from rat liver by organo-germanium, lead and tin compounds. *Biochem. Pharmacol.* 25(20): 2291–2295.

- Henry TB, Kwon JW, Armbrust KL & Black MC (2004). Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(9): 2229–2233.
- Hense BA, Severin GF, Pfister G, Welzl, G, Jaser W & Schramm KW (2005). Effects of anthropogenic estrogens nonylphenol and 17 α -ethinylestradiol in aquatic model ecosystems. *Acta Hydroch. Hydrob.* 33(1): 27–37.
- Hernandez-Rauda R, Rozas G, Rey P, Otero J & Aldegunde M (1999). Changes in the pituitary metabolism of monoamines (dopamine, norepinephrine, and serotonin) in female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during gonadal recrudescence. *Physiol. Biochem. Zool.* 72(3): 352–359.
- Herrmann M (2003). Endosulfan preliminary dossier. Proceedings, 4th Meeting of the United Nations Economic Commission for Europe Expert Group on Persistent Organic Pollutants, Oslo, Norway, 17. –19. März, S. 59–61.
- Hershey AE, Shannon L, Axler R, Ernst C & Mickelsen P (1995). Effects of methoprene and Bti (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*) on nontarget insects. *Hydrobiologia* 308(3): 219–227.
- Hershey AE, Lima AR, Niemi GJ & Regal RR (1998). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) and methoprene on nontarget macroinvertebrates in Minnesota wetlands. *Ecol. Appl.* 8(1): 41–60.
- Hochachka PW & Somero GN (2002). Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, USA.
- Höfer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, Vogel R & Wettig K (2004). Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch. Toxicol.* 78(10): 549–564.
- Hoffmann JL, Torontali SP, Thomason RG, Lee DM, Brill JL, Price BB, Carr GJ & Versteeg DJ (2006). Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17 α -ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 79(3): 233–246.
- Hogan NS, Lean DRS & Trudeau VL (2006). Exposures to estradiol, ethinylestradiol and octylphenol affect survival and growth of *Rana pipiens* and *Rana sylvatica* tadpoles. *J. Toxicol. Environ. Health - Part A* 69(16): 1555–1569.
- Hogg ID & Williams DD (1996). Response of stream invertebrates to a global warming thermal regime: An ecosystem level manipulation. *Ecology* 77(2): 395–407.
- Hommen U (2005). Ableitung von Populationswachstumsraten aus Lebensdatenstudien mit *Chironomus riparius*. Fraunhofer IME, Schmallenberg, Deutschland.
- Hook SE, Skillman AD, Small JA & Schultz IR (2007). Temporal changes in gene expression in rainbow trout exposed to ethynyl estradiol. *Comp Biochem Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 145(1): 73–85.
- Horst MN, Walker AN, Bush P, Wilson T, Chang ES, Miller T & Larkin P (2007). Pesticide induced alterations in gene expression in the lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genom. Proteomics* 2(1): 44–52.

- Hoyt PR, Doktycz MJ, Beattie KL & Greeley MS (2003). DNA microarrays detect 4-nonylphenol-induced alterations in gene expression during zebrafish early development. *Ecotoxicology* 12(6): 469–474.
- Hua LV, Green M, Wong A, Warsh JJ & Li PP (2001). Tetraspan protein CD181: a common target of mood stabilizing drugs?. *Neuropsychopharmacol.* 25(5): 729–736.
- Hua WY, Bennett ER, Maio XS, Metcalfe CD & Letcher RJ (2006). Seasonality effects on pharmaceuticals and s-triazine herbicides in wastewater effluent and surface water from the Canadian side of the upper Detroit River. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(9): 2356–2365.
- Huber R, Orzeszyna M, Pokorny N & Kravitz EA (1997). Biogenic amines and aggression: Experimental approaches in crustaceans. *Brain Behav. Evolut.* 50(Suppl. 1): 60–68.
- Humpesch UH (1978). Preliminary notes on the effect of temperature and light conditions on the time of hatching in some Heptageniidae (Ephemeroptera). *Verh. Int. Ver. Limnol.* 20(4): 2605–2611.
- Hunziker RW, Escher BI & Schwarzenbach RP (2002). Acute toxicity of triorganotin compounds: Different specific effects on the energy metabolism and role of pH. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6): 1191–1197.
- Huynh MH, Sodek K, Lee H & Ringuette M (2004). Interaction between SPARC and tubulin in *Xenopus*. *Cell Tissue Res.* 317(3): 313–317.
- Hwang H, Fisher SW & Landrum PF (2001). Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle test effects in the midge, *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 52(3–4): 251–267.
- Hwang H, Fisher SW, Kim K & Landrum PF (2004). Comparison of toxicity using body residues of DDE and select PCB congeners to the midge, *Chironomus riparius*, in partial life-cycle tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(1): 32–42.
- Iguchi T, Watanabe H & Katsu Y (2007). Toxicogenomics and ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology. *Gen. Comp. Endocrin.* 153(1–3): 25–29.
- IMO – International Maritime Organisation (2002). Anti-fouling systems. Focus on IMO, 31 Seiten.
- Ingersoll CG, Hutchinson T, Crane M, Dodson S, de Witt T, Gies A, Huet MC, McKenny Jr. CL, Oberdörster E, Pascoe D, Versteeg DJ & Warwick O (1999). Laboratory toxicity tests for evaluating potential effects of endocrine-disrupting compounds. In: DeFur PL, Crane M, Ingersoll C & Tattersfield L (Hrsg.): *Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment*. SETAC technical publication, Brüssel, Belgien, S. 107–197.
- Inoue S, Oshima Y, Abe S, Wu RSS, Kai N & Honjo T (2007). Effects of tributyltin on the energy metabolism of pen shell (*Atrina pectinata japonica*). *Chemosphere* 66(7): 1226–1229.
- Ise R, Han DH, Takahashi Y, Teresaka S, Inoue A, Tanji M & Kiyama R (2005). Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Letters* 579(7): 173–1740.
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A & Parrella A (2006). Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols. *Chemosphere* 64(1): 135–143.
- Jacobs W & Renner M (1988). *Biologie und Ökologie der Insekten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Jacobson JA (2000). Organotin compounds in the Danish marine environment: Analysis & fate studies. Dissertation, Institut für Biologie und Chemie, Universität Roskilde.
- James KR, Cant B & Ryan T (2003). Responses of freshwater biota to rising salinity levels and implications for saline water management: A review. *Aust. J. Bot.* 51(6): 703–713.
- Janer G, LeBlanc GA & Porte C (2005). A comparative study on androgen metabolism in three invertebrate species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143(3): 211–221.
- Janssens de Bisthoven L, Vermeulen A & Ollevier F (1998). Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* larvae by chronic exposure to copper and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35(2): 249–256.
- Jenkins R, Angus RA, McNatt H, Howell WM, Kempainen JA, Kirk M & Wilson EM (2001). Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(6): 1325–1331.
- Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD & Ankley GT (2006). Effects of the feedlot contaminant 17 α -trenbolone on reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Sci. Technol.* 40(9): 3112–3117.
- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C & Schulz R (2004). Run-off related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(3): 345–352.
- Jeyasingham K & Ling N (2000). Acute toxicity of arsenic to three species of New Zealand chironomids: *Chironomus zealandicus*, *Chironomus* sp. a and *Polypedilum pavidus* (Diptera: Chironomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64(5): 708–715.
- Jjemba PK (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63(1): 113–130.
- Jobling S & Sumpter JP (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27(3–4): 361–372.
- Johnson AW, Snook ME & Wiseman BR (2002). Green leaf chemistry of various turfgrasses: Differentiation and resistance to fall armyworm. *Crop Sci.* 42(6): 2004–2010.
- Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Bestari KT & Solomon KR (2005). Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regul. Toxicol. Pharm.* 42(3): 313–323.
- Jos A, Repetto G, Rios JC, Hazen N, Molero ML, del Peso M, Salguero M, Fernández-Freire P, Pérez-Martín PM & Cameán A (2003). Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicol. In Vitro* 17(5–6): 525–532.
- Ju Z, Wells MC & Walter RB (2007). DNA microarray technology in toxicogenomics of aquatic models: Methods and applications. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 145(1): 5–14.
- Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JJJ, Hetheridge M & Williams RJ (2002). The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(3): 480–488.
- Kahl MD, Makynen EA, Kosian PA & Ankley GT (1997). Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38(2): 155–160.

- Kalbfus W, Zellner A, Frey S & Stanner E (1991). Gewässergefährdung durch organozinnhaltige Antifoulinganstriche. Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft – Institut für Wasserforschung. Forschungsbericht des Projekts 126 05 010, Umweltbundesamt, Berlin.
- Kefford BJ & Nugegoda D (2005). No evidence for a critical salinity threshold for growth and reproduction in the freshwater snail *Physa acuta*. *Environ. Pollut.* 134(3): 377–383.
- Kefford BJ, Papas PJ & Nugegoda D (2003). Relative salinity tolerance of macroinvertebrates from the Barwon River, Victoria, Australia. *Mar. Freshwater Res.* 54(6): 755–765.
- Kefford BJ, Dalton A, Palmer CG & Nugegoda D (2004). The salinity tolerance of eggs and hatchlings of selected aquatic macroinvertebrates in south-east Australia and South Africa. *Hydrobiologia* 517(1–3): 179–192.
- Khan MAQ, Ahmed SA, Salazar A, Gurumendi J, Khan A, Vargas M & von Catalin B (2007). Effect of temperature on heavy metal toxicity to earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida: Oligochaeta). *Environ. Toxicol.* 22(5): 487–494.
- Khargarot BS & Ray PK (1989). Sensitivity of midge larvae of *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) to heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42(3): 325–330.
- Khatri P & Drăghici S (2005). Ontological analysis of gene expression data: Current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* 21(18): 3587–3595.
- Kim SD, Cho J, Kim IS, Vanderford BJ & Snyder SA (2007a). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* 41(5): 1013–1021.
- Kim Y, Choi K, Jung J, Park S, Kim PG & Park J (2007b). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ. Int.* 33(3): 370–375.
- Kirkbride-Smith AE, Bell HA & Edwards JP (2001). Effects of three vertebrate hormones on the growth, development and reproduction of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 20(8): 1838–1845.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y & Abe SI (2000). Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 56(1): 1–5.
- Kolodziej EP, Harter T & Sedlak DL (2004). Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 38(23): 6377–6384.
- Kortner TM & Arukwe A (2007). Effects of 17 α -methyltestosterone exposure on steroidogenesis and cyclin-B mRNA expression in previtellogenic oocytes of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 146(4): 569–580.
- Krantzberg G & Stokes PM (1989). Metal regulation, tolerance, and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46(3): 389–398.
- Kristensen T, Baatrup E & Bayley M (2005). 17 α -ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy (*Poecilia reticulata*). *Biol. Reprod.* 72(1): 150–156.

- Krogh KA, Halling-Sørensen B, Mogensen BB & Vejrup KV (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: A review. *Chemosphere* 50(7): 871–901.
- Kuballa J, Hempel M, Jantzen E, Hintelmann H, Steffen D (1995). Methylquecksilber- und Organozinn-Spezies in Sedimenten niedersächsischer Flüsse. *Vom Wasser* 85: 35–45.
- Kuster M, Lopez MJ, de Alda MJL & Barcelo D (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TRAC – Trends Anal. Chem.* 23(10–11): 790–798.
- Kwon JW & Armbrust KL (2006). Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10): 2561–2568.
- Lai KM, Scrimshaw MD & Lester JN (2002). Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Sci. Total Environ.* 289(1–3): 159–168.
- Länge R (1996). Monitoring of current levels of TBT in the US and European seawater and evaluation of risk in the context of recent ecotoxicity data. In: The present status of TBT-copolymere antifouling paints. Proceedings International one day symposium on antifouling paints for ocean-going vessels. 21.02.1996, Den Haag, Niederlande.
- Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP & Siegmund F (2001). Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20(6): 1216–1227.
- Larkin P, Sabo-Attwood T, Kelso J & Denslow ND (2002). Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p,p'-DDE. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 133(4): 543–557.
- Larkin P, Villeneuve DL, Knoebl I, Miracle AL, Carter BJ, Liu L, Denslow ND & Ankley GT (2007). Development and validation of a 2,000-gene microarray for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26(7): 1497–1506.
- Lauer GJ (1969). Osmotic regulation of *Tanytus nubifer*, *Chironomus plumosus* and *Enalagma clausum* in various concentrations of saline lake water. *Physiol. Zool.* 42: 381–387.
- Laufer H, Vafopouloumandalos X & Deak P (1986). Ecdysteroid titers in *Chironomus* and their relation to hemoglobins and vitellogenins. *Insect Biochem.* 16(1): 281–285.
- Lazier CB, Langley S, Ramsey NB & Weight JM (1996). Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104(3): 321–329.
- Lee SB & Choi J (2006). Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 25(11): 3006–3014.
- Lee SB & Choi J (2007). Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68(1): 84–90.
- Lee G, Huang Y, Washington JM, Briggs NW & Zuo Z (2005). Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol-3-kinase. *Epilepsy Res.* 66(1–3): 145–153.

- Lee SM, Lee SB, Park CH & Choi J (2006a). Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65(6): 1074–1081.
- Lee SE, Yoo DH, Son J & Cho K (2006b). Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics* 6(3): 945–957.
- Lee SJ, Ju CC, Clu SL, Chien MS, Chan TH & Liao WL (2007). Molecular cloning, expression phylogenetic analysis of parvalbumin in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Zool. A.* 307(1): 51–61.
- Leight AK & Van Dolah RF (1999). Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.* 18(5): 958–964.
- Lencioni S, Pellerito A, Fiore T, Giuliani AM, Pellerito L, Cambria MT & Mansueto C (1999). Organometallic complexes with biological molecules. X: Dialkyltin(IV) and Trialkyltin(IV) orotates: Spectroscopic and in vivo investigations. *Appl. Organomet. Chem.* 13(3): 145–157.
- León A, Teh SJ, Hall LC & Teh FC (2007). Androgen disruption of early development in Qurt strain medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 82(3): 195–203.
- Leonard AW, Hyne RV, Lim RP, Leigh KA, Le J & Beckett R (2001). Fate and toxicity of endosulfan in Namoi River water and bottom sediment. *J. Environ. Qual.* 30(3): 750–759.
- Leppänen MT, Postma JF, Groenendijk D, Kukkonen JVK & Buckert-de Jong MC (1998). Feeding activity of midge larvae (*Chironomus riparius* Meigen) in metal-polluted river sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41(3): 251–257.
- Lepper P (2002). Towards the derivation of quality standards for priority substances in the context of the water framework directive, Final report of the study, Contract No. B4-3040/2000/30637/MAR/E1. Identification of quality standards for priority substances in the field of water policy, Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology.
- Lettieri T (2006). Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 114(1): 4–9.
- Leung KMY, Grist EPM, Morley NJ, Morrill D & Crane M (2007). Chronic toxicity of tributyltin to development and reproduction of the European freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Chemosphere* 66(7): 1358–1366.
- Li B, Gu L, Zhang H, Huang J, Chen Y, Hertz L & Peng L (2007). Up-regulation of cPLA(2) gene expression in astrocytes by all three conventional anti-bipolar drugs is drug-specific and enzyme-specific. *Psychopharmacology* 194(3): 333–345.
- Liber K, Call DJ, Dawson TD, Whiteman FW & Dillon TM (1996). Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: Implications for interpreting freshwater sediment bioassays. *Hydrobiologia* 323(3): 155–167.
- Liber K, Knuth ML & Stay FS (1999). An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experimental littoral ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(3): 357–362.
- Liebig M (2005). Untersuchungen zu Umweltrisikoaabschätzungen von Humanpharmaka und Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten vor dem Hintergrund europäischer Bewertungskonzepte. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.

- Liebig M, Egeler P, Oehlmann J & Knacker T (2005). Bioaccumulation of ^{14}C -17 α -ethinylestradiol by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* in spiked artificial sediment. *Chemosphere* 59(2): 271–280.
- Lin AYC & Reinhard M (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(6): 1303–1309.
- Lin AYC, Plumlee MH & Reinhard M (2006). Natural attenuation of pharmaceuticals and alkylphenol polyethoxylate metabolites during river transport: Photochemical and biological transformation. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(6): 1458–1464.
- Looser PW, Bertschi S & Fent K (1998). Bioconcentration and bioavailability of organotin compounds: Influence of pH and humic substances. *Appl. Organomet. Chem.* 12(8–9): 601–611.
- Looser PW, Fent K, Berg M, Goudsmit GH & Schwarzenbach RP (2000). Uptake and elimination of triorganotin compounds by larval midge *Chironomus riparius* in the absence and presence of Aldrich humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 34(24): 5165–5171.
- Lopes I, Baird DJ & Ribeiro R (2005). Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. *Chemosphere* 61(8): 1189–1197.
- Lutz I & Kloas W (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225(1–2): 49–57.
- Lydy MJ, Belden JB & Ternes MA (1999). Effects of temperature on the toxicity of M-parathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37(4): 542–547.
- Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, Cooper DW & Jones DM (1999). Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments and waters from the UK Tyne and Tees Estuaries. *Environ. Sci. Technol.* 33(7): 1009–1014.
- Lyssimachou A, Jenssen BM & Arukwe A (2006). Brain cytochrome P450 aromatase gene isoforms and activity levels in atlantic salmon after waterborne exposure to nominal environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol and antifoulant tributyltin. *Toxicol. Sci.* 91(1): 82–92.
- MacLean RS, Borgmann U & Dixon DG (1996). Bioaccumulation kinetics and toxicity of lead in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(10): 2212–2220.
- Mäenpää K & Kukkonen JVK (2006). Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Aquat. Toxicol.* 77(3): 329–338.
- Maier KJ, Kosalwat P & Knight AW (1990). Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the effect of temperature on its life history. *Environ. Entomol.* 19(6): 1681–1688.
- Martinez EA, Moore BC, Schaumlöffel J & Dasgupta N (2001). Induction of morphological deformities in *Chironomus tentans* exposed to zinc- and lead-spiked sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(11): 2475–2481.
- Martínez-Guitarte JL, Planelló R & Morcillo G (2007). Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and

- L13 in *Chironomus riparius*. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 147(4): 590–596.
- Martínez-Jerónimo F & Martínez-Jerónimo L (2007). Chronic effect of NaCl salinity on a freshwater strain of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): A demographic study. Ecotox. Environ. Saf. 67(3): 411–416.
- Martyniuk CJ, Xiang H, Crump K, Chiu S, Sardana R, Nadler A, Gerrie ER, Xia X & Trudeau VL (2006). Gene expression profiling in the neuroendocrine brain of male goldfish (*Carrassius auratus*) exposed to 17 α -ethynylestradiol. Physiol. Genomics 27(3): 328–336.
- Matthews DJ & Kopczyński J (2001). Using model-system genetics for drug-based target discovery. Drug Discov. Today 6(3): 141–149.
- Mattingly KS, Beaty BJ, Mackie RS, McGaw M, Carlson JO & Rayms-Keller A (2001). Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Chironomus tentans* alpha-tubulin cDNA. Aquat. Toxicol. 54(3–4): 249–260.
- McCormick SD, O’Dea MF, Moeckel AM, Lerner DT & Björnsson BT (2005). Endocrine disruption of Parr-Smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17 β -estradiol. Gen. Comp. Endocrinol. 142(3): 280–288.
- McKenney CL (2005). The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. Integr. Comp. Biol. 45(1): 97–105.
- McKenney CL & Celestial DM (1996). Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle. Aquat. Toxicol. 35(1): 11–20.
- McLeese DW, Zitko V, Sergeant DB, Burrige L & Metcalfe CD (1981). Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. Chemosphere 10(7): 723–730.
- Merck Schuchardt OHG (2007). Sicherheitsdatenblatt Tributylzinchlorid zur Synthese gemäß EG-Richtlinie 91/155/EWG.
- Meregalli G & Ollevier F (2001). Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. Sci. Total Environ. 269(1–3): 157–161.
- Meregalli G, Pluymers L & Ollevier F (2001). Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. Environ. Poll. 111(2): 241–246.
- Mersmann P (2003). Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und -ungesättigten Zone. Dissertation, Technische Universität Berlin.
- Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG & Struger J (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environ. Toxicol. Chem. 22(12): 2881–2889.
- Michailova P, Ilkova J, Petrova N & White K (2001). Rearrangements in the salivary gland chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) following exposure to lead. Caryologia 54(4): 349–363.
- Milani D, Reynoldson TB, Borgmann U & Kolasa J (2003). The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. Environ. Toxicol. Chem. 22(4): 845–854.

- Moens LN, van der Ven K, van Remortel P, Del-Favero J & De Coen WM (2006). Expression profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicol. Sci.* 93(2): 298–310.
- Moens LN, van der Ven K, van Remortel P, Del-Favero J & De Coen WM (2007). Gene expression analysis of estrogenic compounds in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) using a custom cDNA array. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21(5): 299–311.
- Möhle E, Kempter C, Kern A & Metzger JW (1999). Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in kommunalen Kläranlagen mit HPLC-Elektrospray-Massenspektrometrie. *Acta Hydrochim. Hydrob.* 27(6): 430–436.
- Morcillo Y, Janer G, O'Hara SCM, Livingstone DR & Porte C (2004). Interaction of tributyltin with hepatic cytochrome P450 and uridine diphosphate-glucuronosyl transferase systems of fish: In vitro studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(4): 990–996.
- Mortensen AS & Arukwe A (2007a). Modulation of xenobiotic transformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 145(3): 431–441.
- Mortensen AS & Arukwe A (2007b). Effects of 17 α -ethinylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 85(2): 113–123.
- Mu XY & LeBlanc GA (2002). Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *Gen. Comp. Endocrin.* 129(2): 127–133.
- Mu XY & LeBlanc GA (2004). Cross communication between signalling pathways: Juvenoid hormones modulate ecdysteroid activity in a crustacean. *J. Exp. Zool. A* 301(6): 793–801.
- Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S & García-Rodríguez JA (2000). Antimicrobial activity of psychotropic drugs – selective serotonin reuptake inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 14(3): 177–180.
- Murakami A & Furui T (1994). Effects of the conventional anticonvulsants phenytoin, carbamazepine and valproic acid on sodium-potassium-adenosine triphosphatase in acute ischemic brain. *Neurosurgery* 34(6): 1047–1051.
- Mutschler E (1991). *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Mutschler E & Schäfer-Korting M (1997). *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Nagy P, Fekete J & Sharma CK (2005). Octylphenol and nonylphenol in surface water of Rackevei-Soroksai Danube Branch, Hungary. *J. Environ. Sci. Health Part A:* 40(9): 1679–1688.
- Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K & Takada H (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 40(17): 3297–3303.
- Naqvi SM & Vaishnavi C (1993). Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to nontarget animals. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrin.* 105(3): 347–361.
- Navio JA, Marchena FJ, Cerrillos C & Pablos F (1993). UV photolytic degradation of butyltin chlorides in water. *J. Photochem. Photobiol. A* 71(1): 97–102.

- Nebeker AV (1971). Effect of high winter water temperatures on adult emergence of aquatic insects. *Water Res.* 5(9): 777–778.
- Nentwig G (2006). Arzneimittel als Umweltrisiko? Ökotoxikologische Untersuchung und Risikobewertung für vier in der aquatischen Umwelt nachgewiesene Pharmaka. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.
- Nentwig G (2007). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52(2): 163–170.
- Nentwig G, Oetken M & Oehlmann J (2004). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates – the example of carbamazepine and clofibric acid. In: Kümmerer, K. (Hrsg.). *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* 2. Ausgabe, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 195–209.
- Neumann NF & Galvez F (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnol. Adv.* 20(5–6): 391–419.
- Nice HE, Thorndyke MC, Morritt D, Steele S & Crane M (2000). Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Mar. Poll. Bull.* 40(6): 491–496.
- Nice HE, Morritt D, Crane M & Thorndyke M (2003). Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 256: 293–300.
- Norberg-King TJ, Sibley PK, Burton GA, Ingersoll CG, Kemble NE, Ireland S, Mount DR & Rowland CD (2006). Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10): 2662–2674.
- Noroozi M, Angerson WJ & Lean MEJ (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(6): 1210–1218.
- Nouguier J, Mostajir B, Le Floc’h E & Vidussi F (2007). An automatically operated system for simulating global change temperature and ultraviolet B radiation increases: Application to the study of aquatic ecosystem responses in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr.* 5: 269–279.
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent M, Barrett J & Afshari CA (1999). Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinogen.* 24(3): 153–159.
- OECD - Organisation for Economic Development and Cooperation (2004a). Guideline for testing of chemicals no 218. Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Original guideline 218, adopted 13th April 2004, Paris, Frankreich.
- OECD - Organisation for Economic Development and Cooperation (2004b). Guideline for testing of chemicals no 219. Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water. Original guideline 219, adopted 13th April 2004, Paris, Frankreich.
- Oehlmann J (2004). Biological effects of contaminants: Use of intersex in the periwinkle (*Littorina littorea*) as a biomarker of tributyltin pollution. *ICES TIMES* 37, 22 Seiten.
- Oehlmann J & Markert B (1997). *Humantoxikologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Oehlmann J & Schulte-Oehlmann U (2003). Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 75(11–12): 2207–2218.

- Oetken M, Nentwig G, Löffler D, Ternes T & Oehlmann J (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49(3): 353–361.
- Ogendi GM, Brumbaugh WG, Hannigan RE & Farris JL (2007). Effects of acid-volatile sulfide on metal bioavailability and toxicity to midge (*Chironomus tentans*) larvae in black shale sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(2): 325–334.
- Oladimeji AA & Offem BO (1989). Toxicity of lead to *Clarias lazera*, *Oreochromis niloticus*, *Chironomus tentans* and *Benacus* sp. *Water Air Soil Poll.* 44(3–4): 191–201.
- Olfson M, Marcus SC, Pinchus HA, Zito JM, Thompson JW & Zarin DA (1998). Antidepressant prescribing practices of outpatient psychiatrists. *Arch. Gen. Psych.* 55(4): 310–316.
- Oliver MA (1997). Soil and human health: A review. *Eur. J. Soil Sci.* 48(4): 573–592.
- Olmstead AW & LeBlanc GL (2000). Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(8): 2107–2113.
- Olmstead AW & LeBlanc GL (2001a). Low exposure concentration effects of methoprene on endocrine-regulated processes in the crustacean *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 62(2): 268–273.
- Olmstead AW & LeBlanc GL (2001b). Temporal and quantitative changes in sexual reproductive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a juvenile hormone analog. *J. Exp. Zool.* 290(2): 148–155.
- Osada S, Nishikawa J, Nakanishi Z, Tanaka K & Nishihara T (2005). Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. *Toxicol. Lett.* 153(2): 329–335.
- Osman AM & van Noort PCM (2007). Comparison of key enzymes in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, the earthworm *Allolobophora chlorotica* and *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(2): 212–217.
- Osmulski PA & Leyko W (1986). Structure, function and physiological role of *Chironomus* hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 85(4): 701–722.
- OSPAR (2003). OSPAR Background document on octylphenol. Hazardous Substances Series, 2006 Update. OSPAR Commission.
- Padrós J, Pelletier E, Reader S & Denizeau F (2000). Mutual in vivo interactions between benzo(a)pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19(4): 1019–1027.
- Padrós J, Pelletier E & Ribeiro CO (2003). Metabolic interactions between low doses of benzo(a)pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): A long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192(1): 45–55.
- Papaconstantinou A, Umbreit TH, Goering PL & Brown KM (2002). Effects of 17 α -methyltestosterone on uterine morphology and heat shock protein expression are mediated through estrogen and androgen receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82(4–5): 305–314.
- Parrott JL & Blunt BR (2005). Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ. Toxicol.* 20(2): 131–141.
- Parrott JL & Wood CS (2002). Fathead minnow lifecycle tests for detection of endocrine-disrupting substances in effluents. *Water Qual. Res. J. Canada* 37(3): 651–667.

- Pascoe D, Williams KA & Green DWJ (1989). Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen – effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia* 175(2): 109–115.
- Pedersen SN, Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B & Bjerregaard P (1999). In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 233(1–3): 89–96.
- Pedina A (2001). Vergleichende Sensitivitätsuntersuchungen mit ausgewählten organischen und anorganischen Kontaminanten im Sedimentbiotest (Dosis-Wirkungsbeziehung). Diplomarbeit, Fachhochschule Zittau-Görlitz.
- Percipalle P & Visa N (2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J. Cell. Biol.* 172(7): 967–971.
- Péry ARR & Garric J (2006). Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius*: An energy-based modelling approach. *Hydrobiologia* 553(1): 59–66.
- Péry AR, Geffard A & Garric J (2006). Mechanistic models to perform population risk assessment with the midge *Chironomus riparius*: Application to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 40(19): 6026–6031.
- Pettersson I & Berg C (2007). Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(5): 1005–1009.
- Pinder LCV (1986). Biology of freshwater Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* 31: 1–23.
- Piol MN, López AG, Miño LA, Dos Santos Afonso M & Verrengia Guerriero NR (2006). The impact of particle-bound cadmium on bioavailability and bioaccumulation: A pragmatic approach. *Environ. Sci. Technol.* 40(20): 6341–6347.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL & Morcillo G (2007). Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373(1): 113–121.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL & Morcillo G (2008). The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71(10): 1870–1876.
- Postma JF & Davids C (1995). Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotox. Environ. Saf.* 30(2): 195–202.
- Postma JF, Buckert-de Jong MC, Staats N & Davids C (1994). Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26(2): 143–148.
- Postma JF, van Kleunen A & Admiraal W (1995). Alterations in life history traits of *Chironomus riparius* (Diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29(4): 469–475.
- Powlesland C & George J (1986). Acute and chronic toxicity of nickel to larvae of *Chironomus riparius* (Meigen). *Environ. Poll. Ser. A* 42(1): 47–64.

- Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Cavigliolo G, Chan S, Holman PS, Loguinov AV, Bauer DJ, Komachi K, Theil EC, Perkins LJ, Hughes O & Vulpe CD (2007). *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41(3): 1044–1050.
- Price LC & Depledge MH (1998). Effects of the xenoestrogen nonylphenol on the polychaete *Dinophilus gyrociliatus* (Abstract). Abstracts of the 8th Annual Meeting of SETAC Europe, 3h/P008.
- Quackenbush J (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32(Suppl.): 496–501.
- Quednow K & Püttmann W (2008). Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environ. Poll.* 152(2): 478–483.
- Quinn B, Gagne F & Blaise C (2004). Oxidative metabolism activity in *Hydra attenuata* exposed to carbamazepine. *Fresenius Environ. Bull.* 13(8): 783–788.
- Quistad GB, Staiger LE & Schooley DA (1975). Environmental degradation of the insect growth regulator methoprene (isopropyl (2*E*,4*E*)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate). III. Photodecomposition. *J. Agric. Food Chem.* 23(2): 299–303.
- Raaka BM, Finnerty M & Samuels HH (1989). The glucocorticoid antagonist 17 α -methyltestosterone binds to the 10 S glucocorticoid receptor and blocks agonist-mediated dissociation of the 10 S oligomer to the 4 S deoxyribonucleic acid-binding subunit. *Mol. Endocrinol.* 3(2): 332–341.
- Rabitto IS, Alves Costa JRM, Silva de Assis HC, Pelletier E, Akoishi FM, Anjos A, Ranid MAF & Oliveira Ribeiro CA (2005). Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotox. Environ. Saf.* 60(2): 147–156.
- Rempel RS & Carter JCH (1987). Temperature influences on adult size, development, and reproductive potential of aquatic Diptera. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44(10): 1743–1752.
- Reynolds EF (1993). *Martindale: The extra pharmacopoeia*, Rittenhouse Book Distributors, 30. Auflage, London, Großbritannien.
- Riba I, Del Valls TA, Reynoldson TB & Dilani D (2006). Sediment quality in Rio Guadiamar (SW, Spain) after a tailing dam collapse: Contamination, toxicity and bioavailability. *Environ. Int.* 32(7): 891–900.
- Richards SM & Cole SE (2006). A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* 15(8): 647–656.
- Richards SM, Wilson CJ, Johnson DJ, Castle DM, Lam M, Mabury SA, Sibley PK & Solomon KR (2004). Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(4): 1035–1042.
- Ristola T, Pellinen J, Ruokolainen M, Kostamo A & Kukkonen JVK (1999). Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18(4): 756–764.
- Roberts AP, Oris JT, Burton GA & Clements WH (2005). Gene expression in caged fish as a first-tier indicator of contaminant exposure in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(12): 3092–3098.

- Robinson CD, Brown E, Craft JA, Davies IM & Moffat CF (2004). Effects of prolonged exposure to 4-tert-octylphenol on toxicity and indices of oestrogenic exposure in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Mar. Environ. Res.* 58(1): 19–38.
- Roche (1998). ROCHE Lexikon Medizin, 4 Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland.
- Rodgers-Gray TP, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A, Harries JE, Waldock MJ, Sumpter JP & Tyler CR (2000). Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.* 34(8): 1521–1528.
- Roesner A, Fuchs C, Hankeln T & Burmester T (2005). A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* 22(1): 12–20.
- Roh JY, Lee J & Choi J (2006). Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(11): 2946–2956.
- Roller H, Dahm KH, Sweeley CC & Trost BM (1967). The structure of the juvenile hormone. *Angew. Chem. Int. Ed.* 6(2): 179–180.
- Rönnefahrt I, Koschorreck J & Kolossa-Gehring M (2002). Arzneimittel in der Umwelt Teil 2 – Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte. *Mitteilungsblatt der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 8. Jahrgang, Nr. 4.
- Root TL, Price JT, Hall Kr, Schneider BH, Rosenzweig C & Ponds JA (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421(6918): 57–60.
- Rosenberg DW, Drummond GS, Cornish HC & Kappas A (1980). Prolonged induction of hepatic heme oxygenase and decreases in cytochrome-P-450 content by organotin compounds. *Biochem. J.* 190(2): 465–468.
- Ross DH Judy D, Jacobson B & Howell R (1994). Methoprene concentrations in freshwater microcosms treated with sustained release altosid® formulations. *J. Am. Mosquito Cont.* 10(22): 202–210.
- Rossaro B (1991). Chironomids and water temperature. *Aquat. Insect.* 13(2): 87–98.
- Routledge EJ & Sumpter JP (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degeneration products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(3): 241–248.
- Rüdel H, Lepper P & Steinhanses J (2003). Retrospective monitoring of organotin compounds in marine biota from 1985 to 1999: Results from the German Environmental Specimen Bank. *Environ. Sci. Technol.* 37(9): 1731–1738.
- Sacher F (2002). Vorkommen von Arzneimittelrückständen in Grund- und Oberflächenwässern in Baden-Württemberg. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 168: 59–69.
- Sacher F, Lochow E, Bethmann D & Brauch HJ (1998). Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern. *Vom Wasser* 90: 233–243.
- Saffarini DA, Trewitt PM, Luhm RA & Bergtrom G (1991). Differential regulation of insect globin and actin messenger RNAs during larval development in *Chironomus thummi*. *Gene* 101(2): 215–222.

- Sanderson H, Johnson DJ, Reitsma T, Brain RA, Wilson CJ & Solomon KR (2004). Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul. Toxicol. Pharm.* 39(2): 158–183.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463–5467.
- Santroni AM, Fedeli D, Gabbianelli R, Zolese G & Falcioni G (1997). Effect of organotin compounds on trout hemoglobins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238(2): 301–304.
- Sarkar A, Kulkarni A, Chattopadhyay S, Mogare D, Sharma KK, Singh K & Pal JK (2005). Lead-induced upregulation of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is compromised by hemin in human K562 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1732(1–3): 15–22.
- Sattelberger R (2002). Organozinnverbindungen in der aquatischen Umwelt. BE-214, Umweltbundesamt, Wien, Österreich.
- Schaefer CH & Dupras EF (1973). Insect development inhibitors. 4. Persistence of ZR-515 405 in water. *J. Econ. Entomol.* 66(4): 923–925.
- Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235): 467–470.
- Schindler W & Blattner H (1961). Über Derivate des Iminodibenzyls Iminostilben-Derivate. *Helv. Chim. Acta* 44(3): 753–762.
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Nagel R, Köhler HR & Triebkorn R (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 15(2): 143–156.
- Schmude KL, Liber K, Corry TD & Stay FS (1999). Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emergence in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(3): 386–393.
- Schmutz M (1985). Carbamazepine. In: Frey HH & Janz D (Hrsg.). *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 74: Antiepileptic drugs, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schoff PK & Ankley GT (2004). Effects of methoprene, its metabolites, and breakdown products on retinoid-activated pathways in transfected cell lines. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5): 1305–1310.
- Scholz S & Gutzeit HO (2000). 17 α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 50(4): 363–373.
- Scholz S, Röster S, Schäffer M, Hornung U, Scharl M & Gutzeit HO (2003). Hormonal induction and stability of monosex populations in the medaka (*Oryzias latipes*): Expression of sex-specific marker genes. *Biol. Reprod.* 69(2): 673–678.
- Schooley DA, Bergot BJ, Dunham LL & Siddall JB (1975). Environmental degradation of the insect growth regulator methoprene (isopropyl (2 *E,4E*)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate). II. Metabolism by aquatic microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 23(2): 293–298.
- Schröder P & Schmidt W (2003). Abschlussbericht. Qualitative Einschätzung und quantitative Ermittlung von Emissionen ausgewählter Stoffe relevanter Umweltrichtlinien aus kommunalen Abwasseranlagen im Freistaat Sachsen, Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, Außenstelle Dresden.

- Schroth W, Ender A & Schierwater B (2005). Molecular biomarkers and adaptation to environmental stress in moon jelly (*Aurelia* spp.). *Mar. Biotechnol.* 7(5): 449–461.
- Schulte-Oehlmann U, Oetken M, Bachmann J & Oehlmann J (2004). Effects of ethinylestradiol and methyltestosterone in prosobranch snails. In: Kümmerer K (Hrsg.) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 233-247.
- Schultz IR, Skillman A, Nicolas JM, Cyr DG & Nagler JJ (2003). Short-term exposure to 17 α -ethynyl-estradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22(6):1272–1280.
- Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC & Tyler CR (2007). Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 41(17): 6305–6310.
- Schwabe U & Paffrath D (2004). *Arzneiverordnungs-Report 2003: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schwabe U & Paffrath D (2006). *Arzneiverordnungs-Report 2005: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Scippo ML, Argiris C, Van de Weerd C, Muller M, Willemsen P, Martial J & Maghuin-Rogister G (2004). Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 378(3): 664–669.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M & Wenzel A (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54(3): 302–314.
- Selzsam B, Grote K, Gericke C, Niemann L, Witfoht W & Chahoud I (2005). Effects of methyltestosterone on reproduction in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environ. Res.* 99(3): 327–334.
- Semsar K, Perreault HA & Godwin J (2004): Fluoxetine-treated male wrasses exhibit low AVT expression. *Brain Res.* 1029(2): 141–147.
- Sharpe RL, MacLatchy DL, Courtenay SC & Van der Kraak GJ (2004). Effects of a model androgen (methyltestosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay. *Aquat. Toxicol.* 67(3): 203–215.
- Shinoda T & Itoyama K (2003). Juvenile hormone acid methyltransferase: A key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100(21): 11986–11991.
- Shurin JB & Dodson SI (1997). Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(6): 1269–1276.
- Sibley PK, Benoit DA & Ankley GT (1997a). The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity test: Relationship to reproduction and demographic endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(2): 336–345.

- Sibley PK, Monson PD & Ankley GT (1997b). The effect of gut contents on dry weight estimates of *Chironomus tentans* larvae: Implications for interpreting toxicity in freshwater sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(8): 1721–1726.
- Siemering G (2004). Aquatic pesticide monitoring program. Phase 2 (2003) monitoring project report. SFEI Contribution 108.
- Skillman AD, Nagler JJ, Hook SE, Small JA & Schultz IR (2006). Dynamics of 17 α -ethynylestradiol exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Absorption, tissue distribution and hepatic gene expression pattern. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(11): 2997–3005.
- Škreb Y & Habazain-Novak V (1975). Reversible inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in human cells by lead chloride. *Toxicology* 5(2): 167–174.
- Snape JR, Maund SJ, Pickford DB & Hutchinson TH (2004). Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67(2): 143–154.
- Snell TW, Brogdon SE & Morgan MB (2003). Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 12(6): 475–483.
- Soares S, Cativa I, Moreira-Santos M, Soares AMVM & Ribeiro R (2005). A short-term sublethal in situ sediment assay with *Chironomus riparius* based on postexposure feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49(2): 163–172.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3): 503–517.
- Spengler P, Körner W & Metzger JW (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in south-western Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(10): 2133–2141.
- Spengler P, Scholz-Muramatsu H, Gaiser S & Metzger J (2003). Verbleib ausgewählter Xenööstrogene in der Kläranlage. *Gas- und Wasserfach, Wasser, Abwasser* 144(4): 284–291.
- SRC – Syracuse Research Corporation (2007). Online unter: www.syrres.com/esc/physdemo.htm. Abgerufen am 25.04.07.
- Stark JD, Tanigoshi L, Bounfour M & Antonelli A (1997). Reproductive potential: Its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37(3): 273–279.
- Stoeppler M (1991). Cadmium. In: Merian E (Hrsg.). *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance*, VCH, Weinheim, S. 804–851.
- Suedel BC, Rodgers Jr. JH & Deaver E (1997). Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33(2): 188–193.
- Sun J, Chen Y, Deng L, Wu F & Deng NS (2006). Photodegradation of environmental endocrine disruptors in water in the presence of Fe(III)-carboxylate complexes. *Fresenius Environ. Bull.* 15(2): 113–117.
- Swissprot (2007). Swiss-Prot Protein Knowledgebase. (<http://expasy.org/sprot/>).
- Taenzler V, Bruns E, Dorgerloh M, Pfeifle V & Weltje L (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology* 16(1): 221–230.

- Tatarazako N, Oda S, Watanabe H, Morito M & Iguchi T (2003). Juvenile hormone agonist affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* 53(8): 827–833.
- Taylor SR & McLennan SM (1985). *The continental crust: Its composition and evolution*. Blackwell, Oxford, Großbritannien.
- Taylor EJ, Blockwell SJ, Maund SJ & Pascoe D (1993). Effects of lindane on the life-cycle of a freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24(2): 145–150.
- Ternes TA (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32(11): 3245–3260.
- Ternes TA (2000a). Rückstände von Arzneimitteln, Diagnostika und Antiseptika in Abwasser, Flüssen und Grundwasser - Eine neue Herausforderung für die Wasserwirtschaft. Habilitationsschrift, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.
- Ternes TA (2000b). Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment - an overview. In: Keith LH, Needham LL & Jones-Lepp TL (Hrsg.): *Issues in the analysis of environmental endocrine disruptors*. Proceedings Volume ACS Symposium 40(1): 98–100.
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD & Servos M (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225(1–2): 81–90.
- Ternes TA, Andersen H, Gilberg D & Bonerz M (2002). Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.* 74(14): 3498–3504.
- Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B & Andersen HR (2007). Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere* 66(5): 894–904.
- Tibaut R & Porte C (2008). Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicol. In Vitro* doi:10.1016/j.tiv.2008.02.020.
- Tibaut R, Schnell S & Porte C (2006). The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: An in-vitro study. *Environ. Sci. Technol.* 40(16): 5154–5160.
- Thomas MA & Klaper R (2004). Genomics for the ecological toolbox. *Trends Ecol. Evol.* 19(8): 439–445.
- Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, McHugh M, Smith A & Waldock MJ (2002). An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(7): 1456–1461.
- Tillmann M, Schulte-Oehlmann U, Duft M, Markert B & Oehlmann J (2001). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10(6): 373–388.
- Timmermans KR, Peeters W & Tonkes M (1992). Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera: Chironomidae) - uptake and effects. *Hydrobiologia* 241(2): 119–134.

- Tixier C, Singer HP, Oellers S & Muller SR (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37(6): 1061–1068.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC & Place AR (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 290(5): 475–483.
- UBA (2004): Endosulfan. Draft dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the UN-ECE LRTAP protocol on persistent organic pollutants. Umweltbundesamt, Berlin.
- US-EPA (2001). US Environmental Protection Agency. Pesticide fact sheet. Methoprene.
- Van den Hoek TH & Verdonschot PFM (2001). De invloed van veranderingen in temperatuur op beek-macrofauna. Alterra rapport 228. Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, Nederlande.
- Van der Jagt K, Munn S, Tørsløv J & Bruijn J (2004). Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Addendum to the report “Assessment of additional testing needs under REACH. Effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives”. JRC Report EUR 21405 EN, 25 Seiten, Ispra, Italien: Europäische Kommission, Joint Research Centre.
- Van der Ven K, De Wit M, Keil D, Moens L, van Leemput K, Naudts B & de Coen W (2005). Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuroactive pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 141(4): 408–417.
- Van der Ven K, Keil D, Moens LN, van Leemput K, van Remortel P & de Coen W (2006a). Neuropharmaceuticals in the environment: Mianserin-induced neuroendocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) using cDNA microarrays. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10): 2645–2652.
- Van der Ven K, Keil D, Moens LN, van Hummelen P, van Remortel P, Maras M & de Coen W (2006b). Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere* 65(10): 1836–1845.
- Van Griethuysen C, van Baren J, Peeters E & Koelmans AA (2004). Trace metal availability and effects on benthic community structure in floodplain lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3): 668–681.
- Vannote RL & Sweeney BW (1980). Geographic analysis of thermal equilibria: A conceptual model for evaluating the effect of natural and modified thermal regime on aquatic insects. *Am. Nat.* 115(5): 667–695.
- Vasskog T, Berger U, Samuelsen PJ, Kallenborn R & Jensen E (2006). Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *J. Chromatogr. A* 1115(1–2): 187–195.
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF & Viana MT (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 4(1): 1–25.
- Verma DC & Flickinger RA (1971). Effect of methyltestosterone and 17 β -estradiol on DNA synthesis of mesonephric blastemata of frog larvae. *Experientia* 27(10): 1201.

- Vermeulen AC, Liberloo G, Dumont P, Ollevier F & Goddeeris B (2000). Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and beta-sitosterol: Effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere* 41(10): 1581–1591.
- Verrengia Guerrero NR, Taylor MG, Davies NA, Lawrence MAM, Edwards PA, Simkiss K & Wider EA (2002). Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. *Environ. Poll.* 117(3): 523–530.
- Verslycke T, Poelmans S, De Wasch K, De Brabander HF & Janssen CR (2004). Testosterone and energy metabolism of *Neomysis integer* following exposure to endocrine disruptors. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5): 1289–1296.
- Vetillard A & Bailhache T (2005). Cadmium: An endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biol. Reprod.* 72(1): 119–126.
- Vetpharm (2007). Online unter www.vetpharm.ulzh.ch/WIR/00005491/0893_F.htm. Abgerufen am 25.4.07.
- Vick AM & Hayton WL (2001). Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 52(3-4): 177–188.
- Vieno N, Tuhkanen T & Kronberg L (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41(5): 1001–1012.
- Vogt, C (2007). Schadstoffeffekte auf Entwicklung, Reproduktion und genetische Variabilität – Multigenerationsstudien mit *Chironomus riparius* und Tributylzinn. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.
- Vogt C, Belz D, Galluba S, Nowak C, Oetken M & Oehlmann J (2007a). Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies. *J. Environ. Sci. Health Part A* 42(1): 1–9.
- Vogt C, Nowak C, Diogo JB, Oetken M, Schwenk K & Oehlmann J (2007b). Multi-generation studies with *Chironomus riparius* – Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere* 67(11): 2192–2200.
- Von Ballmoos C, Brunner J & Dimroth P (2004). The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(31): 11239–11244.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B & Beyermann D (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192(2–3): 95–117.
- Wall SB, Isely JJ & La Point TW (1996). Fish bioturbation of cadmium-contaminated sediments: Factors affecting Cd availability to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(3): 294–298.
- Walthall WK & Stark JD (1997). A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37(1): 45–52.
- Wan MT, Kuo JN, Buday C, Schroeder G, Van Aggelen G & Pasternak J (2005). Toxicity of α -, β -, (α plus β)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, and biological implications in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(5): 1146–1154.
- Wang HY, Olmstead AW, Li H & LeBlanc GA (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 74(3): 193–204.

- Warchałowska-Śliwa E, Niklińska M, Görlich A, Michailova P & Pyza E (2005). Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae: Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Poll.* 133(2): 373–381.
- Ward JV (1985). Thermal characteristics of running waters. *Hydrobiologia* 125(1): 31–46.
- Ward TJ & Robinson WE (2005). Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(9): 2341–2349.
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M & Tsyganskaya M (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genom.* 2(3): 143–147.
- Watanabe N, Sakai S & Takatsuki H (1992). Examination for degradation paths of butyltin compounds in natural waters. *Water Sci. Technol.* 25(11): 117–124.
- Watts MW & Pascoe D (1998). Selection of an appropriate life-cycle stage of *Chironomus riparius* Meigen for use in chronic sediment toxicity testing. *Chemosphere* 36(6): 1408–1413.
- Watts MM & Pascoe D (2000a). A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39(3): 299–306.
- Watts MM & Pascoe D (2000b). Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(7): 1885–1892.
- Watts MM, Pascoe D & Carroll K (2001). Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A – effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55(1–2): 113–124.
- Watts MM, Pascoe D & Carroll K (2003). Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A – effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54(2): 207–215.
- Watzl B & Rechkemmer G (2001). Flavonoide. *Ernährungsumschau* 48(12): 498–502.
- Wegener G, Persin J, Karrenbrock F, Rörden O & Hübner I (1999). Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugate in der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser* 92: 347–360.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP & Parker MG (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135(1): 175–182.
- Whitehead SA & Rice S (2006). Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract. Res. Cl. En.* 20(1): 45–61.
- WHO (2005). ATC/DDD Index 2004.
- Wichard W, Arens W & Eisenbeis G (1995). *Atlas zur Biologie der Wasserinsekten*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Widarto TH, Krogh PH & Forbes VE (2007). Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate (λ) of *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(3): 369–377.
- Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Reincke H, Schmidt R, Stachel B, von Tumpling W & Wanke A (2004). Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57(2): 107–126.

- Williams WD (1987). Salinization of rivers and streams: an important environmental hazard. *AMBIO*. Stockholm 16(4): 180–185.
- Williams KA, Green DWJ, Pascoe D & Gower DE (1986). The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* 70(3): 362–366.
- Williams KA, Green DWJ, Pascoe D & Gower DE (1987). Effect of cadmium on oviposition and egg viability in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(1): 86–90.
- Wong DT, Bymaster FP & Engleman EA (1995). Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 57(5): 411–441.
- Xi YL, Chu ZX & Xu XP (2007). Effects of four organochlorine pesticides on the reproduction of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(8): 1695–1699.
- Yasuno M & Satake K (1990). Effects of diflubenzuron and methoprene on the emergence of insects and their density in an outdoor experimental stream. *Chemosphere* 21(10–11): 1321–1335.
- You J, Schuler LJ & Lydy MJ (2004). Acute toxicity of sediment-sorbed endrin, methoxychlor, and endosulfan to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73(3): 457–464.
- Zellner A & Kalbfus W (1997). Belastung Bayrischer Gewässer durch Nonylphenole. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung (Hrsg.): Stoffe mit endokriner Wirkung. Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie, Band 5, München, S. 55–64.
- Zha JM, Wang ZJ, Wang N & Ingersoll C (2007). Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere* 66(3): 488–495.
- Zhou JL (2006). Sorption and remobilization behavior of 4-tert-octylphenol in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 40(7): 2225–2234.
- Zirong X & Shijun B (2007). Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(1): 89–94.
- Zolese G, Gabbianelli R, Caulini GC, Bertoli E & Falcioni G (1999). Steady-state fluorescence and circular dichroism of trout hemoglobins I and IV interacting with tributyltin. *Proteins* 34(4): 443–452.
- Zou E & Fingerman M (1997). Synthetic estrogen agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit moulting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38(3): 281–285.
- Zuccato E, Castiglioni S & Fanelli R (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122(3): 205–209.
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Reitano G, Bagnati R, Chiabrando C, Pomati F, Rossetti C & Calamari D (2006). Pharmaceuticals in the environment in Italy: Causes, occurrence, effects and control. *Environ. Sci. Poll. Res.* 13(1): 15–21.

Zühlke S (2004). Verhalten von Phenazonderivaten, Carbamazepin und estrogenen Steroiden während verschiedener Verfahren der Wasseraufbereitung. Dissertation, Technische Universität Berlin.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt

- Prof. Dr. Jörg Oehlmann (Universität Frankfurt),
- Prof. Dr. Thomas Hankeln (GENTERprise Genomics),
- Prof. Dr. Bruno Streit (Universität Frankfurt),
- Prof. Dr. Erwin R. Schmidt (GENTERprise Genomics),
- Dr. Matthias Oetken (Universität Frankfurt) und
- dem Bundesministerium für Bildung und Forschung

Weiterhin bedanke ich mich bei

- den Mitarbeitern der Firma GENTERprise Genomics, insbesondere Oliver Bitz, Britta Burger und Matthias Linke,
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie, insbesondere Olaf Dittberner für seine Hilfe mit der HPLC,
- Dr. Lennart Weltje (BASF SE),
- Prof. Dr. Jochen Klein (Universität Frankfurt) und
- Dr. Ralph Menzel (Humboldt-Universität zu Berlin)

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir in den letzten Jahren eine große Stütze war und mir auch den nötigen Rückhalt gab. Ihr widme ich diese Arbeit.

Verzeichnis der Publikationen

Publikationen

- Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2007). The detection of genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) by means of the comet assay and micronucleus test. *Mutation Research* 628: 19-30.
- Wirzinger G, Vogt C, Bachmann J, Hasenbank M, Liers C, Stark C, Ziebart S & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. *Cahiers des Biologie Marines* 48: 85-94.
- Wirzinger G, Vogt C, Pupp A, Baumann J, Jagodzinski LS & Oehlmann J (2008). Effects of different salinities and temperatures on *Chironomus riparius* in a life cycle test. In Vorbereitung.

Abstracts

- Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2004). Genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Tagungsband Internationales Symposium "Genotoxicity and Immunotoxicity – Unwelcome effects in water systems" in Koblenz, Seite P7.
- Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2005). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Basel, Seite 177.
- Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2006). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Landau, Seite 119.
- Vogt C, Schmitt C, Wirzinger G, Scheider J & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. Abstractband, 16. Weltkongreß der Malakologischen Gesellschaft in Antwerpen, Seite 234.
- Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Leipzig, Seite 58-59.
- Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). Chiro-Chip, a DNA-microarray-based screening method for the assessment of chemical-induced ef-

fects in *Chironomus riparius*. Abstractband, 3. NORMAN Workshop, Amsterdam, Seite 29.

Poster

- Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2004). Genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Internationales Symposium "Genotoxicity and Immunotoxicity – Unwelcome effects in water systems" in Koblenz.
- Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2005). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. SETAC-GLB-Tagung in Basel.
- Vogt C, Schmitt C, Wirzinger G, Scheider J & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. 16. Weltkongreß der Malakologischen Gesellschaft in Antwerpen.
- Wirzinger G, Bitz O, Burger B, Linke M, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). Pollutant-induced life cycle effects and gene expression of *Chironomus riparius*. 3. NORMAN Workshop, Amsterdam

Vorträge

- Wirzinger G (2005): Einsatz des Comet Assay und Mikrokernstest zum Nachweis genotoxischer Schäden beim Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.), gehalten beim Abwasserzweckverband Schwerin.
- Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2006). ChiroChip: Projektvorstellung und erste Ergebnisse. SETAC-GLB-Tagung in Landau.
- Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). Schadstoffinduzierte Genexpression bei *Chironomus riparius*. SETAC-GLB-Tagung in Leipzig.

Lebenslauf

Name: Gertraud Wirzinger
Geburtsdatum: 8. November 1977
Geburtsort: Johannesburg (Südafrika)
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher Werdegang

2004 – 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Projekt ChiroChip bei Genterprise Genomics GmbH, Mainz
2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Zoologischen Institut, Abteilung Ökologie und Evolution, Aquatische Ökotoxikologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
2003 – 2004 Angestellte beim Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen
2001 Praxissemester im Naturpark Dahme-Heideseen. Projekt: Erstellung eines Pflege- und Entwicklungskonzeptes für ein Naturschutzgebiet

Ausbildung

2004 – 2008 Promotion im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
1998 – 2002 Studium an der Hochschule Zittau/Görlitz (FH), Fach Ökologie und Umweltschutz. Diplomarbeit: Einsatz des Comet Assay und Mikrokerntest zum Nachweis genotoxischer Schäden beim Dreistacheligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.) (Prof. Ramm und Prof. Sordyl). *Abschluß*: Dipl.-Ing. für Ökologie und Umweltschutz (FH)
1997 – 1998 Freiwilliges Ökologisches Jahr
1994 – 1997 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Heidenheim a.d. Brenz (Abitur)
1993-1994 Robert-Bosch-Realschule, Giengen a.d. Brenz
1993 Senefelder Gesamtschule, Treuchtlingen
1991 – 1992 Hoërskool Die Fakkkel, Johannesburg, (Südafrika)
1984 – 1990 Laerskool W.H. Coetzer, Johannesburg (Südafrika)

Anhang

Die Rohdaten der ökotoxikologischen Experimente, die physikalisch-chemischen Parameter und ein Teil der Rohdaten der molekularbiologischen Experimente befinden sich auf der beigefügten CD-Rom.