

**Schadstoffeffekte auf Entwicklung,
Reproduktion und genetische Variabilität –
Multigenerationsstudien mit *Chironomus riparius*
und Tributylzinn**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Christian Vogt
aus Jonsdorf (Sachsen)

Frankfurt am Main 2007
(D 30)

Vom Fachbereich..... der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Präambel

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines vom Land Baden-Württemberg geförderten Projektes (Projektnummer: BWR 22018) im Arbeitskreis „Aquatische Ökotoxikologie“ von Herrn Prof. Oehlmann und im Arbeitskreis „Evolution und Ökologie“ von Herrn Prof. Streit am Institut für Ökologie, Evolution und Diversität, der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Der praktische Bearbeitungszeitraum des dreijährigen Forschungs- und Entwicklungsprojektes mit dem Arbeitstitel „Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen – Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung“ erstreckte sich vom 01.09.2003 bis zum 31.08.2006. Im Projekt wurden die folgenden Diplomarbeiten erfolgreich angefertigt:

- Annika Pupp (2005) Genetische Diversität beim Testorganismus *Chironomus riparius* (Meigen 1804) unter Temperaturstress und Exposition mit Tributylzinn (TBT).
- Christoph Kley (2005) Artenzusammensetzung innerhalb der Gattung *Chironomus* in unterschiedlich belasteten Freilandsedimenten.
- Maren Heß (2005) Genetische und ökotoxikologische Charakterisierung von TBT-vorexponierten Zuckmücken (*Chironomus riparius*) unter dem Einfluss des chemischen Stressors Cadmium.
- Daniel Jost (2006) Einfluss genetischer Diversität auf die Fitness von *Chironomus riparius* unter Cadmium-Stress.
- Andreas Czeikowitz (2006) Einfluss von genetischer Diversität und Differenzierung auf die Schadstoffsensitivität von *Chironomus riparius*-Zuchten.

Neben dieser Arbeit wurde eine weitere Dissertation im Rahmen des BW-Plus-Projektes von Carsten Nowak verfasst. Da sich die Ergebnisse der einzelnen Studien teilweise aufeinander beziehen bzw. aufbauen und unter dem integrativen Charakter des Projektes zusammengefasst wurden, werden Ergebnisse aus den Einzelarbeiten mit in dieser Arbeit aufgeführt und diskutiert. In solchen Fällen sind die Ergebnisse als Resultate dritter Personen gekennzeichnet und nicht als eigene Leistung zu verstehen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Testsubstanzen	6
2.1.1 Tributylzinn	6
2.1.2 Cadmium.....	8
2.2 <i>Chironomus riparius</i> als Testorganismus	10
2.2.1 Biologische Charakterisierung	10
2.2.2 Eingesetzte Populationen und Zuchtbedingungen.....	12
2.3 Life-Cycle-Test zur Bestimmung der TBT- und Cd-Testkonzentrationen	14
2.4 Durchführung der Multigenerationsstudien.....	16
2.5 Anpassungsstudien	19
2.6 Cadmium als Zweitstressor.....	20
2.7 Analytische Bestimmung der Testparameter	21
2.8 Genetische Analysen.....	22
2.9 Datenauswertung.....	24
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Charakterisierung der Ausgangspopulationen.....	30
3.1.1 Genetische Diversität der Einzelpopulationen und der Mischpopulation	30
3.1.2 Kreuzungsexperimente	30
3.2 Life-Cycle-Test zur Bestimmung der TBT- und Cd-Testkonzentrationen	31
3.3 Multigenerationsstudien mit <i>Chironomus riparius</i>	41
3.3.1 Multigenerationsstudie mit 80 µg Sn/kg über elf Generationen (MGS I).....	41
3.3.2 Mehrgenerationenstudie mit 120 µg Sn/kg über zwei Generationen (MGS II).....	55
3.3.3 Multigenerationsstudie mit 160 µg Sn/kg über zwölf Generationen (MGS III)	58
3.4 Zweitstressorstudien mit Cadmium.....	68

4	Diskussion	74
4.1	Ausgangsbedingungen und Vorexperimente	74
4.2	Einfluss des Testdesigns in den Multigenerationsstudien.....	86
4.3	Effekte der TBT-Exposition in den Multigenerationsstudien	97
4.4	Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress	102
4.5	Zweitstressorstudien mit Cadmium.....	106
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	111
	Danksagung	125
	Verzeichnis der Publikationen	127
	Lebenslauf	132
	Anhang	133

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fließbildschema der Wechselwirkungen von umweltrelevantem Schadstoffstress und genetischer Diversität von Populationen.....	3
Abb. 2: Lebenszyklus der Zuckmücken	11
Abb. 3: Schema der Multigenerationsexperimente mit <i>Chironomus riparius</i>	18
Abb. 4: Genetische Diversität von <i>Chironomus riparius</i> , ausgedrückt als Shannon-Index von zwei Freiland-, neun Einzel- und der erstellten Mischpopulation.....	30
Abb. 5: Mittlere Mortalität von <i>Chironomus riparius</i> , exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B)	34
Abb. 6: Mittlerer Schlupfzeitpunkt von <i>Chironomus riparius</i> -Männchen und -Weibchen des Tributylzinn- (A) und Cadmium-Experimentes (B).....	36
Abb. 7: <i>Chironomus riparius</i> . Gezählte und geschätzte Eizahl pro Gelege	37
Abb. 8: Populationswachstumsrate von <i>Chironomus riparius</i> , exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B)	40
Abb. 9: <i>Chironomus riparius</i> . Mortalität der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 µg Sn/kg TG	42
Abb. 10: <i>Chironomus riparius</i> . Mittlerer Emergenzzeitpunkt der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 µg Sn/kg TG	44
Abb. 11: <i>Chironomus riparius</i> . Trockengewicht der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 µg Sn/kg TG.....	48
Abb. 12: <i>Chironomus riparius</i> . Populationswachstumsrate der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 µg Sn/kg TG	49
Abb. 13: <i>Chironomus riparius</i> . Erwartete Heterozygotie der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 µg Sn/kg TG	51
Abb. 14: <i>Chironomus riparius</i> . Populationswachstumsrate der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Konzentration von 6,69 µg Sn/kg TG	57

Abb. 15: <i>Chironomus riparius</i> . Mortalität der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG.....	59
Abb. 16: <i>Chironomus riparius</i> . Mittlerer Emergenzzeitpunkt der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG.....	61
Abb. 17: <i>Chironomus riparius</i> . Populationswachstumsrate der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG.....	64
Abb. 18: <i>Chironomus riparius</i> . Erwartete Heterozygotie der Mischpopulation (GEN+) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG.....	65
Abb. 19: <i>Chironomus riparius</i> . Mortalität in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (A) parallel zur MGS I und (B) parallel zur MGS III.....	69
Abb. 20: Mittlerer Emergenzzeitpunkt von <i>Chironomus riparius</i> in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (A) parallel zur MGS I und (B) parallel zur MGS III.....	70
Abb. 21: Populationswachstumsrate von <i>Chironomus riparius</i> in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (A) parallel zur MGS I und (B) parallel zur MGS III.....	73
Abb. 22: Erwartete Heterozygotie an 5 Mikrosatellitengenorten über 25 Generationen GEN+LMK.....	76
Abb. 23: Absolute Häufigkeit der mittleren Emergenzzeitpunkte in den drei Multigenerationsstudien mit <i>Chironomus riparius</i>	88
Abb. 24: Durchschnittliche Gelegegröße von <i>Chironomus riparius</i> in Abhängigkeit vom Ablagetag.....	90
Abb. 25: Populationswachstumsrate in der MGS III.....	91
Abb. 26: Gelegezahl, die für den Aufbau der nächsten Generation in der MGS III ausgewählt wurden.....	92
Abb. 27: Gaußsche Verteilungsfunktion der Eiablage der Weibchen und Auswahlzeitraum der Gelege für das Experiment.....	93
Abb. 28: <i>Chironomus riparius</i> . Mortalität (A) und mittlerer Emergenzzeitpunkt (B) der GEN+ und der GEN- über den Jahresgang.....	94
Abb. 29: Zusammenhang zwischen genetischer Diversität und Populationsgröße	105

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Physiko-chemische Eigenschaften von Tributylzinnchlorid.....	6
Tab. 2:	Physiko-chemische Eigenschaften von Cadmiumsulfathydrat.....	10
Tab. 3:	Herkunft der <i>Chironomus riparius</i> -Populationen sowie deren Ursprung und die entsprechende Abkürzung in den Experimenten.....	13
Tab. 4:	Experimentelle Parameter der Multigenerationsstudien (MGS) für GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation)	17
Tab. 5:	Durchgeführte Akut- und Life-Cycle-Experimente in bzw. nach den aus- gewählten Generationen der jeweiligen Behandlungsgruppen in den Multigenerationsstudien (MGS) I-III.....	20
Tab. 6:	Stressorwechsel in den verschiedenen Behandlungsgruppen der MGS I und III	21
Tab. 7:	Messgrößen, Standardisierung und Methoden der Rückstandsanalysen für die Experimente	22
Tab. 8:	Für die genetischen Analysen verwendete Mikrosatellitenmarker	23
Tab. 9:	Generationen und Anzahl an Organismen, die hinsichtlich der genetischen Diversität untersucht wurden	24
Tab. 10:	Kreuzungsschema und produzierte Gelege (gesamt bzw. fertil) der Einzelpopulationen vor der Erstellung der Mischpopulation.....	31
Tab. 11:	Zeitlich gewichtete mittlere Testkonzentrationen für das TBT- und Cd-Vorexperiment	32
Tab. 12:	Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), Eier pro Gelege und geschätzte Larvenanzahl der F1-Generation im TBT- und Cd-Vorexperiment.....	39
Tab. 13:	Ergebnisse der Rückstandsanalytik für den Quarzsand und die Organo- zinnverbindungen (Mono-, Di- und Tributylzinn) der TBT-Behandlungen nach einer Testdauer von 1, 72 und 336 h in der Multigenerationsstudie I....	41
Tab. 14:	Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung der jeweiligen Populationen in der Multigenerationsstudie I.....	46
Tab. 15:	<i>Chironomus riparius</i> . Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitengenorte für die Mischpopulation (GEN+) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT- Behandlung in der Multigenerationsstudie I	52

Tab. 16: <i>Chironomus riparius</i> . Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitengenorte für die Laborzuchtpopulation (GEN-) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie I	53
Tab. 17: Berechnete LC ₅₀ -Werte für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) für die Anpassungsexperimente der Multigenerationsstudie I	54
Tab. 18: <i>Chironomus riparius</i> . Endpunkte des Mehrgenerationenexperimentes II mit der Mischpopulation (GEN+) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 6,69 µg Sn/kg TG über zwei Generationen	56
Tab. 19: Ergebnisse der Rückstandsanalytik (Mono-, Di- und Tributylzinn) nach dem Spiken (inkl. EtOH abdampfen) der Sedimente und einer Testdauer von 1, 72 und 336 h in der Multigenerationsstudie III	58
Tab. 20: Fertile Gelege pro Weibchen für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung der jeweiligen Populationen (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation) in der Multigenerationsstudie III	62
Tab. 21: <i>Chironomus riparius</i> . Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitengenorte für die Mischpopulation (GEN+) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie III	66
Tab. 22: Berechnete LC ₅₀ -Werte für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) für die Anpassungsexperimente der MGS III	67
Tab. 23: Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertile) und Eier pro Gelege der Zweitstressorstudien mit Cadmium parallel zu den Multigenerationsstudien I & III	72
Tab. 24: Signifikante Zusammenhänge einzelner Life-Cycle-Parameter in den Kontrollgruppen der drei Multigenerationsstudien	96

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	einfache Varianzanalyse
Cd	Cadmium
DBT	Dibutylzinn
EmT ₅₀	mittlerer Schlupfzeitpunkt der Imagines
H _e	erwartete Heterozygotie (expected heterozygosity)
H _o	beobachtete Heterozygotie (observed heterozygosity)
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
EtOH	Ethanol
GEN+	Mischpopulation
GEN-	Laborzuchtpopulation
L1	erstes Larvalstadium
LC ₅₀	Konzentration bei der 50% aller Tiere tot sind
LMK	Lösemittelkontrolle
MBT	Monobutylzinn
MGS	Multigenerationsstudie
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Cooperation and Development)
OZV	Organozinnverbindung
PWR	Populationswachstumsrate
Sn	Zinn
TBT	Tributylzinn
TG	Trockengewicht
ZSS	Zweitstressorstudie

Abstract

While toxicological data are available from standard tests for numerous chemicals, little is known about effects of pollutants over several generations, or regarding chronic effects of chemicals on genetic diversity. Within the experiments, effects of the model pollutant tributyltin (TBT) were investigated over several generations at three sublethal TBT concentrations (4.46, 6.69 and 8.93 µg as Sn/kg sediment dw) on life-cycle parameters and genetic variability of *Chironomus riparius*. Moreover, the adaptation potential towards TBT was determined. This experimental design enables the identification of TBT effects on life-cycle parameters and the determination of a potential extinction risk caused by chronic exposure. Furthermore, effects on the genetic variability can be determined, which cannot solely be predicted on knowledge of the toxic mode of action of the chemical.

Genetic variability was determined via a newly developed microsatellite analysis for *C. riparius*, measuring individual differences in length of highly variable satellite DNA fragments. Furthermore, deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were determined. For the identification of changes in tolerances towards the stressor, acute and chronic toxicity experiments were conducted.

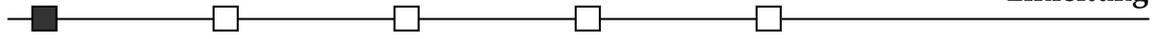
Within the studies, second stressor experiments with cadmium were performed regarding the question if there is a differing response of differently preexposed populations to another chemical stressor. Therefore, TBT preexposed animals of the multi-generation studies were exposed to an environmentally relevant cadmium concentration of 1.2 mg/kg sediment dw after various generations and concentrations of preexposure.

During the multi-generation study with the lowest TBT concentration, significant effects on development and reproduction were determined. For some generations, the emergence was significantly ($p < 0.05$, t test) delayed after TBT exposure. Reproduction seemed to be a sensitive parameter as well, whereby females of the genetic diverse population laid significantly larger egg masses ($p < 0.05$, t test). TBT did not affect the population growth rate nor the genetic variability, while clear deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium appeared. The study also provided strong evidence for the occurrence of a higher tolerance towards the stressor in TBT-exposed group of the genetic diverse population.

The highest TBT concentration led to significant effects on life-cycle parameters in the multi-generation study, whereby development and reproduction were significantly inhibited. Furthermore, significant effects on the genetic variability of the exposed population were observed. The heterozygosity decreased significantly during exposure. After four generations within the chronic exposure life-cycle scenario also evidences for an adaptation potential of *C. riparius* were determined.

In the second stressor experiments, the effect of different preexposure scenarios became evident. The TBT preexposed population of the multi-generation study with the higher TBT exposure (8.93 µg Sn/kg sediment dw) had a significantly increased sensitivity to cadmium stress.

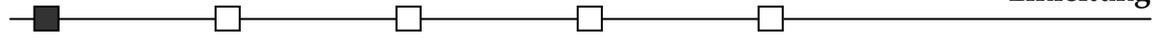
In the experiments, alterations of life-cycle parameters and genetic diversity of the aquatic insect *C. riparius* were shown. This work provides new essential views on the importance of multi-generation studies within the scope of chronic chemical risk assessment.



1 Einleitung

In den letzten 30 Jahren wurden die ökotoxikologischen Auswirkungen von Chemikalien auf fitnessrelevante Endpunkte von Standardorganismen intensiv untersucht. Dabei wurden vor allem Effektkonzentrationen einzelner Substanzen auf die Entwicklung und Reproduktion ausgewählter Arten aus verschiedenen trophischen Ebenen definiert (z.B. aquatische Trias, FENT, 1998). Nach der Ableitung von kritischen Effektkonzentrationen (z.B. LC₅₀/EC₅₀-Werte) wurden diese in Form der PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) in der Risikobewertung im Rahmen des TGD (*Technical Guidance Document*) berücksichtigt (EU, 2003). Viele der für die Bewertung von Substanzen ausgelegten Standardvorschriften wurden als Monosubstanzstudien über maximal eine Generation entwickelt und durchgeführt (z.B. OECD Guidelines 218/219, OECD 2004a, b). In den letzten Jahren wurde in der Ökotoxikologie zunehmend die Forderung gestellt, zusätzliche Aspekte in der Chemikaliertestung zu berücksichtigen. Dabei wurde festgestellt, dass mit Monosubstanztestungen über eine Generation viele Effekte von Schadstoffen in natürlichen Ökosystemen nicht abgedeckt werden können. Zumeist werden (I) Lebensgemeinschaften einer (II) komplexen Mischung von Einzelsubstanzen über (III) zahlreiche Generationen ausgesetzt. Diese Aussage verdeutlicht die drei wesentlichen Forschungsschwerpunkte denen sich die Ökotoxikologie in Zukunft stellen muss (FENT, 1998).

Da es nur wenige Studien gibt, in denen chronische Substanzeffekte über mehrere Generationen untersucht wurden, wird von zahlreichen Wissenschaftlern gefordert, die Skala von Einzelgenerations- hin zu Mehrgenerationsstudien zu erweitern (DE BISTHOVEN et al., 2001; RISTOLA et al., 2001). Derartige Ansätze sind essentiell für die Bewertung von populationsrelevanten Effekten, welche durch chronische Schadstoffexpositionen ausgelöst werden können. Vor allem persistente Schadstoffe liegen aufgrund der niedrigen Abbauraten über längere Zeiträume in der Umwelt vor und sind somit in der Lage, eine Population über viele Generationen hinweg zu beeinflussen (FENT, 1998). Die Multigenerationsstudie ist die Methode der Wahl um generationsübergreifende Effekte von Substanzen analysieren und bewerten zu können. In den letzten Jahren wurde dieser Ansatz bereits für ausgewählte aquatische Organismen wie Chironomiden und Daphnien angewendet (POSTMA & DAVIDS, 1995; MUYSSSEN & JANSSEN, 2004; TAENZLER et al., 2007).



Neben der klassischen Ökotoxikologie, die sich hauptsächlich mit den Auswirkungen von Substanzen auf die Entwicklung und Reproduktion von Organismen beschäftigt, hat sich in den letzten Jahren das Augenmerk verstärkt auf mögliche Auswirkungen von Chemikalien auf die Biodiversität verlagert (HEBERT & LUIKER, 1996; BICKHAM et al., 2000; BELFIORE & ANDERSON, 2001; VAN STRAALEN & TIMMERMANS, 2002). Biodiversität wird als die „Variabilität unter lebenden Organismen jeglicher Herkunft, darunter unter anderem Land-, Meeres- und sonstige aquatische Ökosysteme und die ökologischen Komplexe, zu denen sie gehören“ definiert (CBD, 1992). Die biologische Vielfalt ist essentiell für die Funktion natürlicher Kreisläufe und umfasst die Vielfalt innerhalb und zwischen den Arten, sowie die Vielfalt an Ökosystemen (FRANKHAM et al., 2002). Die biologische Vielfalt wird hierbei auch durch die genetische Vielfalt innerhalb von Populationen repräsentiert. Da gegenwärtig die biologische Vielfalt neben der anthropogenen Zerstörung und Zerschneidung von Habitaten, Beschleunigung von Stoffkreisläufen, Entnahme von Organismen ebenfalls durch Verschmutzung und Belastung negativ beeinflusst wird, hat sich ein fachübergreifender Forschungsansatz zwischen Populationsgenetik und Ökotoxikologie etabliert (HEBERT & LUIKER, 1996; BICKHAM et al., 2000; STATON et al., 2001; FRANKHAM et al., 2004). Dabei wurde das Aufgabenfeld auf einen Workshop des *National Institute of Health* (NIH) und *National Institute of Environmental Health and Science* (NIEHS) wie folgt definiert: „Genetische Ökotoxikologie untersucht chemikalien- und strahlungsinduzierte Veränderungen im genetischen Material natürlicher Biota. Dabei werden direkte Veränderungen von Genen und Genexpression sowie selektive Effekte von Schadstoffen auf die Genfrequenz untersucht“ (ANDERSON et al., 1994).

Die genetische Diversität von Populationen wird fortlaufend durch sich überlagernde natürliche Prozesse (z.B. Mutation, Migration, Selektion) und durch zufällige genetische Drift beeinflusst (HEBERT & LUIKER, 1996; BELFIORE & ANDERSON, 1998; STATON et al., 2001; WHITEHEAD et al., 2003). Aufgrund des komplexen Zusammenspiels dieser natürlichen Faktoren ist es relativ schwierig, eindeutige Schadstoffeffekte festzustellen (Abb. 1). Schadstoffe können durch verschiedene Mechanismen die genetische Diversität von Populationen beeinflussen (BICKHAM et al., 2000; VAN STRAALEN & TIMMERMANS, 2002).

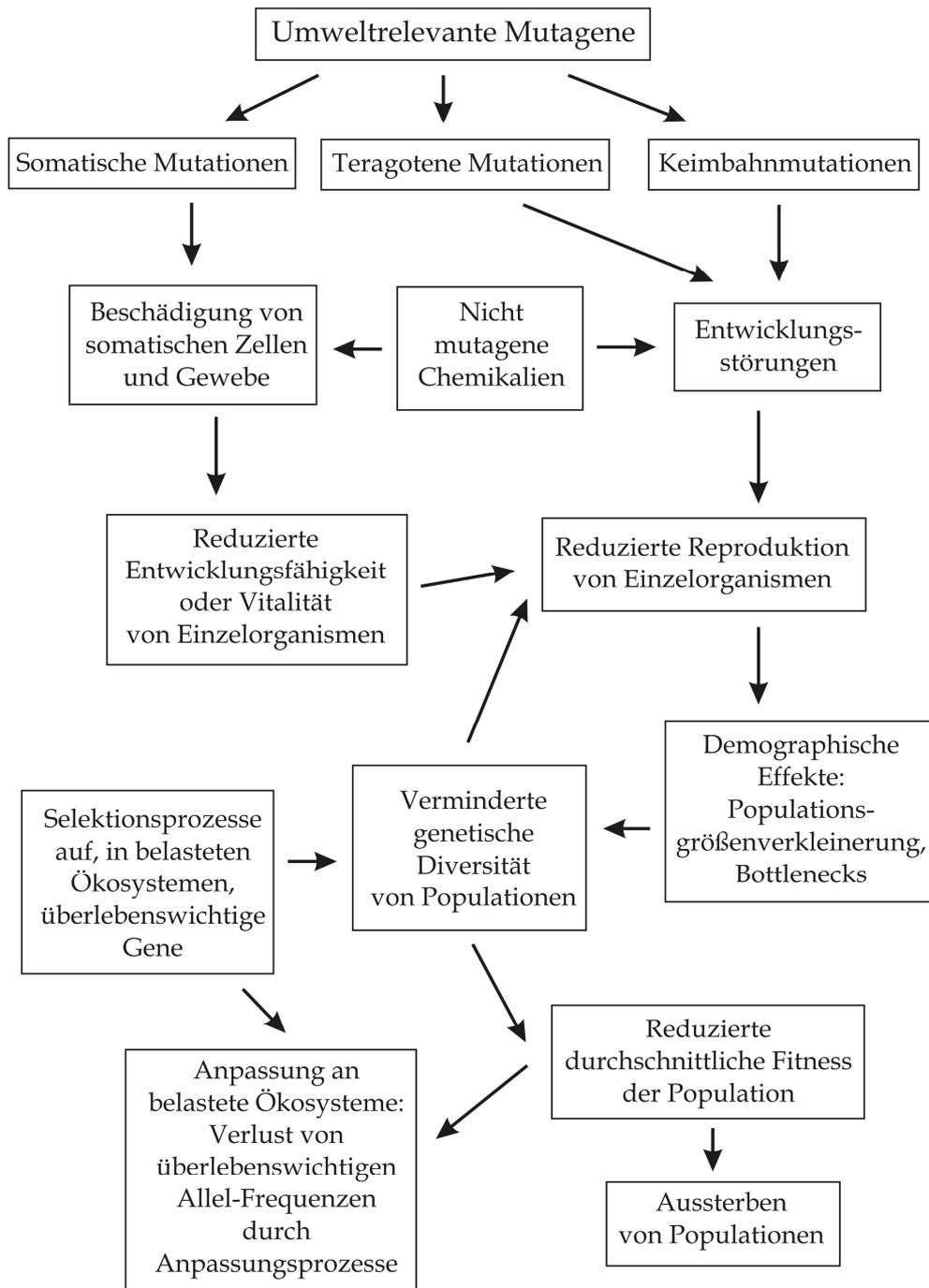
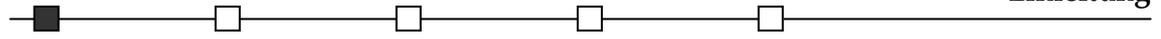


Abb. 1: Fließbildschema der Wechselwirkungen von umweltrelevantem Schadstoffstress und genetischer Diversität von Populationen (BICKHAM et al., 2000; VAN STRAALEN & TIMMERMANS, 2002).

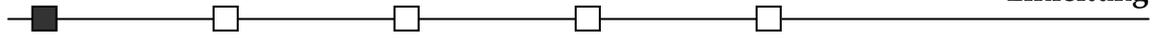
Zum Ersten gibt es Substanzen, welche durch ihr mutagenes Potential die genetische Variabilität direkt beeinflussen (BICKHAM et al., 2000). Dabei können Mutationen, soweit sie die Keimbahn betreffen, an zukünftige Generationen weiter vererbt werden oder über die Schädigung von somatischen Zellen und Geweben zu einer reduzierten



Fitness führen (KNIPPERS, 2001). In solchen Fällen erhöht sich die genetische Diversität in Populationen. Neben diesen direkten Effekten existieren indirekte Substanzeffekte auf die genetische Diversität, wie dies z.B. für endokrine Disruptoren der Fall sein kann. So ist bekannt, dass z.B. TBT oder Bisphenol A zum Imposéxphänomen bei Mollusken führt und weiblichen Tiere in Folge einer Exposition männliche Geschlechtsmerkmale ausbilden (BETTIN et al., 1996; OEHLMANN et al., 2006). Derartige Substanzen führen zu einer direkten Veränderung von primären Geschlechtsmerkmalen und zu einer reduzierten Vitalität bzw. zu einem verringerten Reproduktionserfolg von Einzelorganismen. So sind z.B. vermännlichte weibliche Schnecken nur noch eingeschränkt in der Lage, Eier zu produzieren (BETTIN et al., 1996; OEHLMANN et al., 2006). Die genannten mutagenen und gewebesverändernden Effekte können sich durch die Herabsetzung der Vitalität und der Reproduktionsleistung negativ auf die effektive Populationsgröße auswirken. Es nehmen weniger Organismen an der Weitergabe der Erbinformation auf die Folgegeneration teil, und es kommt zwangsläufig zu einer Verringerung der genetischen Diversität. Weiterhin können Substanzen zu unspezifischer Selektion oder zu Adaptionsprozessen führen, wobei einzelne Gene der Gesamtpopulation begünstigt und wiederum andere Gene ausgelesen werden. Die genetische Variabilität verringert sich in solchen Fällen ebenfalls (BICKHAM et al., 2000; VAN STRAALEN & TIMMERMANS, 2002; FRANKHAM et al., 2005a).

Während genotoxische Substanzeffekte, die zu Mutationen von somatischen oder von Keimzellen führen (JHA, 2004), relativ einfach und eindeutig analysiert werden können, ist die Bestimmung von indirekten Substanzeffekten, die z.B. durch Selektion ausgelöst werden können, deutlich schwieriger.

Eine verringerte genetische Variabilität innerhalb von Populationen ist immer als negativ anzusehen, da die genetische Diversität eine wichtige Ressource für das Anpassungsvermögen in zukünftigen Populationen darstellt (AMOS & BALMFORD, 2001; FRANKHAM et al., 2002, 2004; FRANKHAM, 2005b). Die Verringerung von genetischer Diversität durch Schadstoffe kann zu einer verringerten Anpassungsfähigkeit an sich verändernde Umweltbedingungen führen.



Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- (I) Welchen Einfluss hat eine chronische Schadstoffbelastung auf Entwicklung und Reproduktion von Testorganismen im Multigenerationsansatz?
- (II) Führt eine chronische Schadstoffexposition unter standardisierten Laborbedingungen zu einer Beeinflussung der genetischen Vielfalt auf Populationsebene?
- (III) Sind vorbelastete Populationen empfindlicher gegenüber einem weiteren Stressor?
- (IV) Gibt es Hinweise für Anpassungsprozesse?

Für die Bearbeitung der Fragestellung werden Multigenerationsexperimente und Zweitstressorstudien mit der ökotoxikologisch gut untersuchten Zuckmücke *Chironomus riparius* durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Testsubstanzen

Die für die Multigenerationsstudien verwendete Verbindung Tributylzinn (TBT) wurde für Effekte auf Entwicklung, Reproduktion und die genetische Diversität von *Chironomus riparius* als Modells substanz ausgewählt. Zusätzlich wurde das Schwermetall Cadmium (Cd) für Zweitstressorstudien eingesetzt. Im folgenden Abschnitt werden die Testsubstanzen näher charakterisiert.

2.1.1 Tributylzinn

TBT gehört zu den Organozinnverbindungen (OZV). Im Gegensatz zu anderen Elementen sind für Zinn zahlreiche organometallische Derivate bekannt. Beim TBT sind an das Zinn drei Butylgruppen gebunden. Aufgrund der freien Bindungsstelle kann sich ein weiterer anorganischer oder organischer Rest anlagern. Bei den meisten technischen Anwendungen kommt es zur Addition eines Sauerstoffatoms, so dass Tributylzinnoxid (TBT-O) entsteht (BUA, 2003). Für die Experimente wurde allerdings das leichter zu beziehende Tributylzinnchlorid (TBT-Cl, CAS-Nummer: 1461-22-9) ausgewählt. TBT-Cl ist eine farblose Flüssigkeit, welche einen schwach stechenden Geruch aufweist, brennbar ist, jedoch mit Luft keine explosiven Gemische bildet. Einige weitere physiko-chemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt.

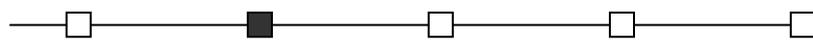
Tab. 1: Physiko-chemische Eigenschaften von Tributylzinnchlorid (MERCK SCHUCHARDT OHG, 2006a).

molare Masse:	325,49 g/mol
chemische Formel:	C ₁₂ H ₂₇ ClSn
Sn-Gehalt/Cl-Gehalt (Gew.%):	36,5%/10,9%
Reinheit:	zur Synthese (> 97%)
Dichte bei (20°C):	1,2 g/cm ³
Löslichkeit in Wasser:	0,017 g/L
Log Pow:	4,76
Dampfdruck (20°C):	< 0,01 hPa
Bezugsquelle:	Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Deutschland



TBT ist eine der toxischsten OZV und wird seit den 1960-er Jahren aufgrund der bioziden Eigenschaften vor allem in Antifoulinganstrichen für Schiffsrümpfe eingesetzt (BUA, 2003). Durch TBT kann der Aufwuchs mit Meeresorganismen, wie z.B. Seepocken, Algen und Muscheln verhindert und infolge dessen der Treibstoffverbrauch effektiv gesenkt werden. Weiterhin werden OZV auch in Pflanzen- und Holzschutzmitteln, als Stabilisatoren in Kunststoffen (PVC, Silikone und Polyurethane), für die biozide Ausrüstung von Textilien (Windeln, Sportbekleidung) und bei der Papierherstellung eingesetzt (SATTELBERGER, 2002). Seit den 1960-er Jahren stieg die Produktion an OZV stark an, und im Jahre 1986 wurden weltweit ca. 63.000 t produziert (SATTELBERGER, 2002). Die gegenwärtige weltweite Produktionsmenge beläuft sich auf ca. 30.000 bis 50.000 t/a (UBA, 2001).

Auch bei bestimmungsgemäßer Verwendung gelangt die Substanz entweder direkt, z.B. durch das Auswaschen von Antifoulinganstrichen oder Holzschutzmitteln, oder indirekt, z.B. über das Abwasser, in Oberflächengewässer. Anschließend adsorbiert TBT aufgrund der hydrophoben Eigenschaften zum größten Teil an Schwebstoffe, und ist nur in niedrigen Konzentrationen im $\mu\text{g/L}$ -Bereich im Wasser nachzuweisen (KALBFUS et al., 1991; LÄNGE, 1996). In Freilanduntersuchungen wurden TBT-Konzentrationen bis zu 1,13 mg/kg TG in Schwebstoffen der Elbe festgestellt (UBA, 2002). Da sich die belasteten Schwebstoffe schließlich in Sedimenten ablagern, wurden von KUBALLA et al. (1995) relativ hohe TBT-Konzentrationen von 6,8 mg/kg TG in Elbesedimenten nahe des Muldezufusses festgestellt. Besonders hohe Konzentrationen an TBT weisen Sedimente aus Hafenbecken auf (KALBFUS et al., 1991; ARAMBARRI et al., 2003; BHOSLE et al., 2004; BURTON et al., 2005). TBT wird durch Abbauprozesse über die Metaboliten Di- und Monobutylzinn zu elementarem Zinn abgebaut, wobei Prozesse wie Photolyse (NAVIO et al., 1993) und mikrobieller Abbau (BUA, 1988; WATANABE et al., 1992) eine wichtige Rolle spielen. Zusätzlich ist ein geringer hydrolytischer Abbau unter Umweltbedingungen möglich (BUA, 2003). Die Halbwertszeit in marinem Wasser wird zwischen 2,25 und 225 Tagen (STEWART & MORA, 1990; SARRADIN et al., 1995) und im Sediment zwischen 162 und > 200 Tagen angegeben (BUA, 1988). Die Abbauraten im Sediment sind stark vom Sauerstoffgehalt, Temperaturregime und von der Sedimentzusammensetzung abhängig. Unter anaeroben Bedingungen wird nur noch ein geringer Anteil des TBT abgebaut, und solche Sedimente bleiben oft über mehrere Jahre hinweg belastet.



TBT beeinflusst das Wachstum und kann Missbildungen bei aquatischen Organismen hervorrufen, wobei insbesondere Juvenilstadien von Fischen und Muscheln, Krebstiere und deren Larven bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen gefährdet sind (SATTEMBERGER, 2002). TBT besitzt weiterhin die Eigenschaft an Enzyme zu binden und sie zu hemmen. Es ist bekannt, dass TBT beispielsweise bei Neogastropoden die Aromatase, ein wichtiges Enzym für die Umwandlung von Androgenen in Östrogene hemmt. Aufgrund dieser Eigenschaft wird TBT zur Substanzgruppe der endokrinen Disruptoren gezählt (BETTIN et al., 1996).

Die aus der Verwendung der OZV resultierende Umweltproblematik wurde schon in den 1980-er Jahren deutlich, und während der letzten Jahre wurde die Anwendung in einigen Staaten eingeschränkt bzw. vollständig verboten. In der Europäischen Union wurde bereits im Jahre 1989 der Einsatz von OZV in Antifoulinganstrichen für Schiffe unter 25 m Länge reguliert. Die Internationale Maritime Organisation (IMO) verbot im Jahre 2003 die Anwendung von organozinnhaltigen Antifoulinganstrichen, und im Jahre 2008 läuft die Übergangsfrist für bereits lackierte Schiffe ab. Diese müssen bis zu diesem Zeitpunkt mit anderen Antifoulinganstrichen versehen werden (IMO, 2002).

TBT wurde aufgrund der sehr niedrigen Wirkkonzentrationen auf Invertebraten und der weiten Verbreitung in aquatischen Ökosystemen aus den ca. 100.000 Substanzen, welche auf dem europäischen Markt produziert und/oder vertrieben werden, als Modellschiff ausgewählt. Weiterhin zeigten Studien mit *C. riparius* und TBT bereits bei wenigen µg/L deutliche akute Toxizitäten (FARGASOVA, 1998; HAHN & SCHULZ, 2002; GILDEMEISTER, 2007). Aufgrund dieser Studien können für TBT bei den gemessenen Umweltkonzentrationen Effekte auf die Entwicklung und Reproduktion und dadurch auch auf die genetische Diversität vermutet werden.

2.1.2 Cadmium

Cadmium ist ein Schwermetall, welches zusammen mit den beiden anderen Übergangsmetallen Zink und Quecksilber die zweite Nebengruppe im Periodensystem bildet (MORTIMER, 1996). Cadmium ist ein natürlicher Bestandteil der Lithosphäre und kommt in weltweiten Konzentrationen von im Mittel 0,1 mg/kg vor (TAYLOR & MCLENNAN, 1985). Das Schwermetall wird in vielfältigen Anwendungen, wie z.B. als Farbpigment, in Lacken und Kunststoffen, eingesetzt. Des Weiteren kommt Cadmium als Korrosionsschutz, in NiCd-Akkumulatoren oder in Düngemitteln zur Anwendung. Im Zuge der steigenden Nachfrage wurde Cadmium ab den 1950-er Jahren industriell



in großem Umfang produziert. Von HAN et al. (2002) wurde eine weltweite kumulierte Cadmiumproduktion seit den Anfängen der Industrialisierung von ca. 1.100.000 t berechnet, was die große Bedeutung des Schwermetalls verdeutlicht. Cadmium wird beim Erzbergbau oder bei der Metallverhüttung in die Umwelt emittiert. Weitere Quellen sind Verbrennungsprozesse (u.a. von Müll und Klärschlamm), Reifenabrieb oder der Einsatz von cadmiumhaltigen Düngemitteln, wobei die Substanz meist direkt ausgebracht wird (OLIVER, 1997). Weltweit werden jährlich schätzungsweise ca. 8.000 t in terrestrische und aquatische Ökosysteme eingetragen (BLIEFERT, 2002).

Da Cadmium ein Element ist, kann es in der Natur nicht abgebaut werden. Es liegt unter verschiedenen Umweltbedingungen in unterschiedlichen Spezifikationen vor, wobei es teilweise als freies Ion oder komplexiert in anorganischen bzw. organischen Verbindungen auftritt. Diese schwerlöslichen Komplexe sind meist nicht in der freien Wasserphase suspendiert, sondern lagern sich in Sedimenten ab. In natürlichen, weitgehend unbelasteten Sedimenten variieren die Cadmiumkonzentrationen zwischen ca. 0,04 und 0,8 mg/kg. In belasteten Sedimenten wurden jedoch deutlich erhöhte Gehalte von 30-400 mg/kg gemessen. In extrem belasteten Sedimenten wurden sogar Konzentrationen bis 800 mg/kg und höher festgestellt (STOEPPLER, 1991). Durch die Spezifizierung sowie Komplexierung wird auch die Bioverfügbarkeit entscheidend beeinflusst, wobei freie Cadmiumionen am leichtesten durch Organismen aufgenommen werden. Cadmium wirkt in Organismen als Enzymgift, in dem es funktionelle Gruppen, insbesondere Sulfhydryl-Gruppen, angreift (OEHLMANN & MARKERT, 1997).

Für Cadmium gibt es zahlreiche Vergleichsstudien, die Effekte auf die Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius* zeigen (WATTS & PASCOE, 2000a; PEDINA, 2001; MILANI et al., 2003; VOGT et al., 2007a). Außerdem wurde mit Cadmium bereits eine Multigenerationsstudie über zehn Generationen durchgeführt und publiziert (POSTMA & DAVIDS, 1995; DE BISTHOVEN et al., 2001).

Das Schwermetall Cadmium wird in den Experimenten für die Zweitstressorstudien ausgewählt und in Form von Cadmiumsulfhydrat (CAS-Nummer: 7790-84-3) eingesetzt. Einige physiko-chemische Eigenschaften sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Physiko-chemische Eigenschaften von Cadmiumsulfathydrat (MERCK SCHUCHARDT OHG, 2006b).

molare Masse:	769,51 g/mol
chemische Formel:	$3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$
Reinheit:	Zur Analyse (> 98 %)
Dichte (20°C):	3,1 g/cm ³
Löslichkeit in Wasser (20°C):	1130 g/L
Bezugsquelle:	Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Deutschland

2.2 *Chironomus riparius* als Testorganismus

2.2.1 Biologische Charakterisierung

Chironomiden gehören zur Ordnung der Zweiflügler (Diptera) und zur Familie der Zuckmücken (Chironomidae). Die Familie der Chironomidae stellt eine der arten- und individuenreichsten Insektenfamilien dar, und bis heute sind ca. 10.000 verschiedene Arten beschrieben (ARMITAGE et al., 1995). Der Lebenszyklus von *C. riparius* ist komplex und besteht aus vier Entwicklungsphasen. Beginnend mit dem Eistadium durchlaufen die Tiere vier Larvalstadien, welche eng an Häutungen gekoppelt sind. Nach dem L4-Stadium verpuppen sich die Larven (OLIVER, 1971). Aus den Puppen schlüpfen nach ca. einem Tag die Imagines. Sie leben im Gegensatz zu den ersten drei aquatischen Entwicklungsstadien rein terrestrisch (Abb. 2). Nach der Paarung, der das Schwärmen der Adulten vorausgeht, legen die Weibchen spiralförmige Gelege, die aus bis zu 900 Eiern bestehen können (VOGT et al., 2007a), auf Steinen oder Wasserpflanzen direkt an der Wasseroberfläche ab. Nach ca. zwei Tagen entwickeln sich aus den Gelegen die ersten Larven, die sich in das Sediment eingraben.

C. riparius ist an unterschiedlichste aquatische Lebensräume angepasst und kommt sowohl bei niedrigen pH-Werten als auch bei erhöhten Salzgehalten vor (PARMA & KREBS, 1977; HAVAS & HUTCHINSON, 1982). Neben der Fähigkeit extreme Lebensräume zu besiedeln, kann *C. riparius* als opportunistische Art bezeichnet werden, welche in der Lage ist, neue Habitate schnell zu besiedeln (PINDER, 1986). *C. riparius* überwintert in natürlichen Ökosystemen während der letzten beiden Larvalstadien, wobei die Diapause durch kurze Tageslängen und niedrige Temperaturen induziert werden kann (GODDEERIS et al., 2001). Im Frühjahr liegen die verschiedenen Larvalstadien synchronisiert vor, und die Schwarmbildung wird durch eine parallel stattfindende Emergenz

begünstigt. Die Anzahl an Lebenszyklen pro Jahr ist von Habitat zu Habitat verschiedenen und stark von der Umgebungstemperatur abhängig. In der borealen Zone Kanadas z.B. wird von RASMUSSEN (1984) ein univoltiner Lebenszyklus in Teichen, welche höchstens sechs Monate eisfrei sind und in denen die Larven unter Nahrungsman- gel leiden, beschrieben. In den gemäßigten Zonen erreichen die Tiere allerdings bis zu fünf Lebenszyklen im Jahr (GOWER & BUCKLAND, 1978).

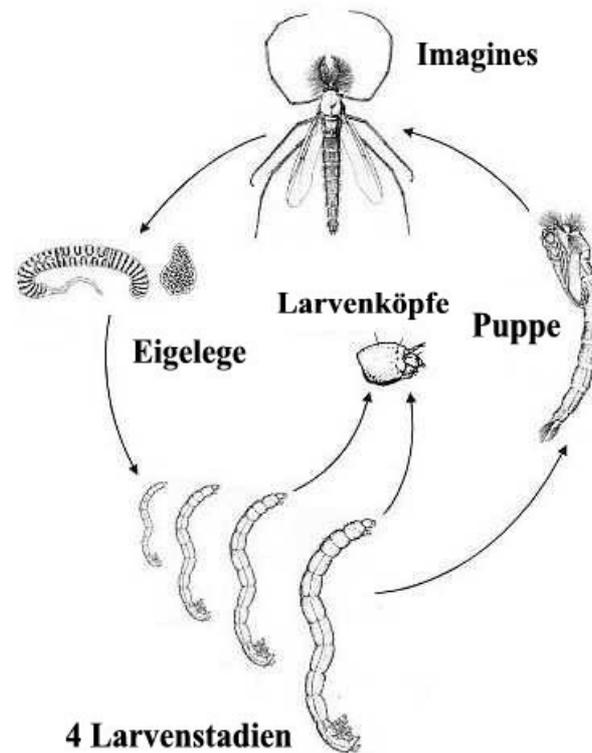


Abb. 2: Lebenszyklus der Zuckmücken (VOGT, 2003)

C. riparius wird als Modellorganismus ausgewählt, da diese Art zahlreiche Vorteile für die Multigenerationsstudien besitzt. Die Hauptvorteile von Chironomiden im Labor sind dabei vor allem (1) die billige und leichte Hälterung, (2) die sedimentassoziierte Lebensweise der Larvalstadien, (3) die Artenvielfalt und weite Verbreitung in aquatischen Ökosystemen (4) die Sensitivität gegenüber Schadstoffen, (5) der kurze Lebenszyklus und (6) die sexuelle Fortpflanzung (GERHARDT et al., 2006). Darüber hinaus führte die beachtliche Menge an publizierten Vergleichsdaten in den letzten Jahren dazu, dass Chironomiden immer häufiger als Testorganismen bei der Toxizitätsbewertung von Freilandsedimenten eingesetzt wurden (DE LANGE et al., 2005; TRIFFAULT-BOUCHET et al., 2005; OETKEN et al., 2005a). Außerdem wurden durch die OECD zwei



Standardprotokolle für die Chemikalienbewertung unter Laborbedingungen entwickelt, wobei die Larven entweder über die Wasserphase (OECD, 2004b) oder über das Sediment (US-EPA, 2000; OECD, 2004a) exponiert werden. Die Standardprotokolle sind bereits sehr gut in der ökotoxikologischen Praxis und Forschung etabliert, und zahlreiche Studien wurden bereits veröffentlicht (KAHL et al., 1997; HIRTHE et al., 2001; OETKEN et al., 2005b; BELDEN & LYDY, 2006).

2.2.2 Eingesetzte Populationen und Zuchtbedingungen

Eingesetzte Populationen

Zu Beginn der Experimente wurde eine genetisch möglichst diverse Population aus verschiedenen Laborstämmen erzeugt (NOWAK et al., 2007). Die Mischpopulation (GEN+) bestand aus elf verschiedenen Laborstämmen aus sieben Ländern (Tab. 3). Aus den einzelnen Populationen wurden jeweils 13 Männchen und 13 Weibchen entnommen und gekreuzt. Um sicher zu gehen, dass die jeweiligen Einzelpopulationen gut durchmischt in GEN+ vorlagen, wurden diese weiter bis zur F2-Generation unter Standardbedingungen gezüchtet. Weiterhin wurden statistisch zufällig ausgesuchte Einzelpopulationen miteinander gekreuzt, um die Möglichkeit einer erfolgreichen Reproduktion zu überprüfen. Im Vergleich zu einer so aufgebauten genetisch diverseren Population wurde auch die genetisch ärmere Laborzuchtpopulation (GEN-) der J. W. Goethe-Universität in die Multigenerationsstudien eingebracht. Dadurch wurde ein Vergleich zwischen zwei genetisch unterschiedlich diversen Populationen ermöglicht. Für den Vergleich der genetischen Diversitätsniveaus wurden weiterhin zwei Freilandpopulationen sowie die Laborstämme von *C. riparius* auf deren genetische Variabilität hin überprüft.

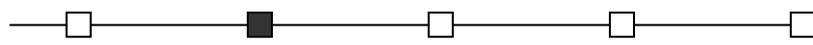
Tab. 3: Herkunft der *Chironomus riparius*-Populationen sowie deren Ursprung und die entsprechende Abkürzung in den Experimenten (k.A. = keine Angabe).

Herkunft der Population	Ursprung	Abkürzung
Universität Amsterdam, Niederlande	Freiland	AM
AquaSense BV, Amsterdam, Niederlande	Freiland	AQ
AstraZeneca, Brixham Environm. Lab., Großbritannien	k.A.	AS
Universität Cardiff, Großbritannien	Freiland	CA
J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland	Labor	GEN-
Universität Joensuu, Finnland	Labor	JO
Cemagref, Lyon, Frankreich	k.A.	LY
Ohio State Universität, Columbus, USA	Freiland	OH
Centre INRA de Rennes, Frankreich	Labor	RN
RIZA, Lelystad, Niederlande	Freiland	RI
Akademie der Wissenschaften, Sofia, Bulgarien	Freiland	SO
Freilandpopulationen		
Kläranlage bei Hanhofen (Woogbach), Deutschland	Freiland	KA
Bach in der Nähe von Sulzbach (Sulzbächle), Deutschland	Freiland	SB

Zuchtbedingungen

Die Zuckmücken wurden im Labor in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a) gezüchtet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum unter konstanten Bedingungen bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$, einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h und einer Lichtintensität von ca. 500 Lux gehalten. Die Luftfeuchtigkeit beträgt ca. 70%. Um eine vergleichbare stoffliche Zusammensetzung der aquatischen Umgebung zu gewährleisten, wurde in der Zucht und in allen Experimenten ein zubereitetes Wasser (rekonstituiertes Wasser, DUFT et al., 2003) eingesetzt. Dieses wurde aus entionisiertem Wasser hergestellt, welches durch Zugabe von Tropic Marin Meersalz (Dr. Biener GmbH, Warthenberg, Deutschland) auf eine Leitfähigkeit von $540 \mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt wurde. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mittels 40% NaOH-Lösung bzw. 20% HCl-Lösung zwischen 7,9 und 8,4 eingestellt (Multi 340i SET, WTW, Weilheim, Deutschland).

Die Aufzucht der Larven erfolgte in vier Polypropylenschalen (28x22x5 cm), angefüllt mit einer aus feinem Quarzsand bestehenden 1 cm hohen Sedimentschicht (Quick Mix Gruppe GmbH & Co KG Osnabrück, Deutschland, Korngröße 0,1-0,4 mm). Das Sediment wurde vollständig mit 3 cm rekonstituiertem Wasser überschichtet. Um die Reproduktion der geschlüpften Tiere während des Versuchszeitraumes gewährleisten zu

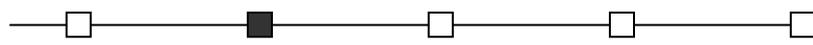


können, wurde um jede Schale ein gazebespannter Zuchtkäfig (60x60x50 cm, Maschenweite 0,75 mm) mit einem Luftvolumen von 0,18 m³ angebracht. Die Weibchen legten meist an den Rändern der Schalen ihre Gelege ab, aus welchen sich innerhalb von ca. drei Tagen die nächste Generation entwickelte.

Im Intervall von zwei Tagen wurden die Larven mit gemörsertem, in Aqua dest. suspendiertem Tetra-Min[®] (Tetra Fischerwerke Berlin, Deutschland) *ad libitum* gefüttert. Zusätzlich ernährten sich die Larven von bakteriellem Aufwuchs und Algen. Die Zucht wurde einmal wöchentlich gereinigt. Dabei wurden die Larven mit kaltem Leitungswasser (ca. 10°C) aus dem Sediment gespült und in einem Sieb aufgefangen (Maschenweite 0,5 mm). Anschließend wurde das Sediment komplett erneuert und die Schalen mit heißem Wasser gereinigt. Die Zuchtbecken wurden erneut mit Wasser, künstlichem Sediment sowie Futter ausgestattet und die Zuckmückenlarven eingebracht.

2.3 Life-Cycle-Test zur Bestimmung der TBT- und Cd-Testkonzentrationen

Vor der Durchführung der Multigenerationsstudien wurden Life-Cycle-Experimente in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a) zur Bestimmung geeigneter TBT- und Cd-Konzentrationen durchgeführt (VOGT et al., 2007a). Außerdem wurden in der Vorstudie zwei verschiedene Testgefäße mit unterschiedlichen Larvenanzahlen und Sediment:Wasser-Verhältnissen auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft. Zum Ersten wurden im TBT-Experiment jeweils 20 Tiere in 600 mL Bechergläsern (Simax, Tschechische Republik), welche mit 100 g Quarzsand und 400 mL rekonstituiertem Wasser befüllt wurden, exponiert. Zum Zweiten dienten 2 L-Kristallisierschalen (Schott, Mainz, Deutschland, Ø 19 cm), gefüllt mit 100 g Quarzsand und 1 L rekonstituiertem Wasser, als Testgefäße im Experiment mit Cd. In diesem Experiment wurden jeweils 50 Tiere pro Schale exponiert. In den Vorstudien wurden fünf (TBT) bzw. zwei (Cd) Replikate verwendet. Das Wasser in den Testgefäßen wurde mittels eines Kompressors durch eine Pasteurpipette mit ca. einer Blase pro Sekunde belüftet. Außerdem wurden die Testgefäße mit einer Gazeabdeckung (Maschenweite 0,75 mm) versehen. Für das Vorexperiment wurden mindestens zehn frische Gelege (Alter ≤ 24 h) aus GEN+ entnommen und in mit rekonstituiertem Wasser gefüllten Mikroskopiernäpfen zum Schlupf gebracht. Im Anschluss daran wurden die Larven der einzelnen Gelege in einer Petrischale durchmischt. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurden jeweils 20



bzw. 50 vitale Larven in eine Pasteurpipette gesaugt und in die jeweiligen Testgefäße eingesetzt. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 des Experimentes definiert. Damit sich die eingesetzten Larven in das Sediment eingraben konnten, wurde die Belüftung zu Beginn des Versuches für 24 h abgestellt. Die Chironomidenlarven wurden täglich bis zum 18. Versuchstag mit 0,5 mg/Larve/d gemahlener Tetra-Min[®]-Suspension gefüttert. Ab dem 19. Versuchstag wurde die Futtermenge, bedingt durch den Schlupf der Imagines, für die noch nicht geschlüpften Larven halbiert.

Als Nominalkonzentrationen wurden für TBT 50; 80; 100 und 200 µg Sn/kg TG und für Cd 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,8 und 2,1 mg Cd/kg TG ausgewählt. Vor Beginn des Experimentes wurden 500 g Quarzsand mindestens 5 min mit entionisiertem Wasser gewaschen und bei 150°C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde die Testsubstanz mittels Spiken auf das Testsediment aufgetragen. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von TBT wurde als Lösungsvermittler Ethanol (300 mL EtOH/kg TG, Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Deutschland, Reinheit > 99,5%) eingesetzt. Aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde EtOH auch im Cd-Experiment entsprechend eingesetzt. Nach dem Spiken wurde das Lösemittel vollständig abgedampft. So sollten EtOH-Effekte ausgeschlossen werden. Neben der Substanzexposition wurde deshalb auch eine Lösemittelkontrolle (LMK) berücksichtigt. Um eventuelle Effekte des Ethanols abschätzen zu können, erfolgte außerdem die Durchführung einer zusätzlichen Kontrolle mit rekonstituiertem Wasser im TBT-Experiment.

In Anlehnung an die OECD-Standardmethode wurden am Anfang und am Ende des Experimentes pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt und Temperatur gemessen. Störende äußere Einflüsse auf die Testorganismen, wie z.B. Temperaturunterschied innerhalb des Klimaraumes, sollten durch wöchentliche Veränderung des Standortes der Testgefäße über das gesamte Experiment gleich verteilt werden. Auftretende Verdunstungsverluste in den Testgefäßen wurden durch Zugabe von rekonstituiertem Wasser kompensiert.

Die Testgefäße wurden einmal täglich auf tote Larven sowie Puppen untersucht, und diese wurden entnommen. Da ab dem 12. Versuchstag der Schlupfzeitpunkt der Mücken allmählich erreicht wurde, erfolgte mindestens einmal täglich die Untersuchung der Bechergläser auf geschlüpfte Tiere. Dabei wurde das Geschlecht, der Schlupfzeitpunkt, die Anzahl der Schlupfunfälle und wenn möglich deren Geschlecht bestimmt.



Geschlüpfte Imagines wurden aus den Versuchsgefäßen der jeweiligen Replikate mit einem Exhauster abgesaugt und in ein mit Edelstahlgaze (Maschenweite 0,75 mm) abgedecktes Glasgefäß (30×20×20 cm) überführt, in welchem die Reproduktion der adulten Tiere stattfinden konnte. Dazu wurde für die Eiablage der Weibchen ein mit ca. 300 mL rekonstituiertem Wasser gefüllter Behälter (12×12×3,5 cm) aufgestellt. Die produzierten Gelege wurden einmal täglich gezählt und aus dem Wasserbehälter entfernt. Für die Ermittlung der Anzahl an Eiern pro Gelege wurde die Methode nach BENOIT et al. (1997) für *Chironomus tentans* modifiziert und die Anzahl an Spiralen mit der Eianzahl in der mittleren Spirale multipliziert. Vor dem Experiment wurde die Anwendbarkeit der Methode mittels einer Kalibrierungskurve auf deren Anwendbarkeit und mögliche Fehler überprüft. Dafür wurde die Anzahl an Eiern pro Gelege von 76 Gelegen erst geschätzt und anschließend durch das Auflösen der Gallerte mit 40% Schwefelsäure die Eier separiert und gezählt. Die Anzahl an Eiern von Gelegen mit einer unregelmäßigen Form konnte mit dieser Methode nicht bestimmt werden, und die Gelegegröße wurde in solchen Fällen nicht determiniert. Außerdem wurde in einem weiteren Vorexperiment unter Kontrollbedingungen überprüft, ob in Gelegen, die als fertil deklariert wurden, auch tatsächlich aus allen Eiern Larven schlüpften. Dafür wurden von 30 fertilen Gelegen die Anzahlen an geschlüpften L1-Larven über mehrere Tage bestimmt und mit der Gesamtanzahl an Eiern abgeglichen. Am Ende des TBT-Experimentes, nach ca. 40 Tagen, wurden die toten Imagines bis zur Gewichtskonstanz bei 34°C im Wärmeschrank getrocknet (ca. 72 h) und deren Trockengewicht mit einer Analysenwaage (Sartorius 4401, Göttingen, Deutschland) auf mg genau bestimmt.

Als Versuchsendpunkte dienten Larvalmortalität, Weibchenanteil und mittlere Emergenzzeit der beiden Geschlechter. Weiterhin wurden die Anzahl an Gelegen pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), Gelegegröße und deren Fertilität als Endpunkte im Hinblick auf die Fortpflanzung definiert. Die Bestimmung der Populationswachstumsrate (PWR) diente als integrierter Versuchsendpunkt.

2.4 Durchführung der Multigenerationsstudien

Bei den Multigenerationsstudien (MGS) wurden die Life-Cycle-Experimente ähnlich wie im Vorexperiment mit Cd ausgeführt (VOGT et al., 2007b). Insgesamt wurden drei MGS durchgeführt, wobei unterschiedliche TBT-Nominalkonzentrationen sowie leicht modifizierte Testdesigns eingesetzt wurden (Abb. 3, Tab. 4).

Tab. 4: Experimentelle Parameter der Multigenerationsstudien (MGS) für GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation); ¹ Abweichungen der Kristallisierschalenanzahl in der zweiten Generation für GEN-LMK (9 Schalen) und in der dritten bzw. vierten Generation für GEN-TBT (6 bzw. 8 Schalen); ² Anzahl an Aquarien, in denen die Larven für die genetische Analysen gezüchtet wurden; ³ Gelegeperiode, aus der die Gelege für die nächste Generation ausgewählt wurden.

Experimentelle Parameter	Multigenerationsstudie		
	MGS I	MGS II	MGS III
Nominalkonzentration	80 (µg Sn/kg TG)	120 (µg Sn/kg TG)	160 (µg Sn/kg TG)
Gelege für den Start des Experimentes	31 GEN+	56 GEN+	64 GEN+
	18 GEN-	74 GEN-	79 GEN-
Experiment angesetzt mit Gelegen aus	GEN+ & GEN-	GEN+LMK & GEN-LMK nach MGS I	GEN+LMK I/II & GEN-LMK I/II (jeweils Mischung) nach der MGS II
		durchgeführte Generationen	11
Anzahl Replikate	1	2	2
Bezeichnungen der Behandlungsgruppen	GEN+LMK	GEN+LMK I/II	GEN+LMK I/II
	GEN-LMK	GEN-LMK I /II	GEN-LMK I/II
	GEN+TBT	GEN+TBT I /II	GEN+TBT I/II
	GEN-TBT	GEN-TBT I /II	GEN-TBT I/II
Kristallisierschalen pro Replikat ¹	10	7	7
Eingesetzte Larven pro Generation und Replikat	500	350	350
Genetikansätze ²	2 pro Replikat	1 pro Replikat	1 pro Replikat
Gelegeperiode ³	4 Tage	2 Tage	2 Tage
Trockengewicht der Imagines ermittelt	ja	nein	nein

Bei den MGS wurden 2 L-Kristallisierschalen (Schott & Duran, Ø 190 mm) als Testgefäße verwendet. Diese wurden einen Tag vor Versuchsbeginn mit 100 g gespiktem Quarzsand sowie mit 1 L rekonstituiertem Wasser befüllt. Die Testgefäße wurden belüftet und mit einer Gazeabdeckung versehen. Die MGS wurden aus unterschiedlichen Anzahlen an Gelegen aus der Mischpopulation (GEN+) sowie aus der Laborzuchtpopulation der J. W. Goethe-Universität Frankfurt (GEN-) angesetzt. Wie im Vorexperi-

ment mit Cd wurden in den Kristallisierschalen jeweils 50 Tiere eingesetzt. So konnte ein populationsrelevantes Experimentdesign gewährleistet werden. Pro Behandlungsgruppe wurden jeweils zehn (MGS I) bzw. sieben (MGS II/III) Kristallisierschalen angesetzt. Da in manchen Generationen der MGS I nicht genügend Gelege produziert wurden, konnte teilweise nicht die volle Anzahl an Kristallisierschalen angesetzt werden (Tab. 4). Auch in diesen Experimenten wurde der Zeitpunkt des Einsetzens der Tiere als Tag 0 definiert. Die Belüftung wurde abermals zu Beginn des Experimentes für 24 h abgestellt. Die Fütterung der Larven erfolgte analog zu dem Vorexperiment und ebenso wurden alle Endpunkte wie im Vorexperiment aufgenommen. Um eine zeitliche Divergenz des Versuchsansatzes zu vermeiden, wurden nur die Gelege, welche an den vier (bzw. zwei) Versuchstagen mit der höchsten Eiablage produziert wurden, für die nächste Generation verwendet. Die aus diesen Gelegen geschlüpften Larven wurden in die nächste Generation überführt. Am Ende der jeweiligen Generationen wurden nur in der MGS I die toten Imagines auf deren Trockengewicht untersucht.

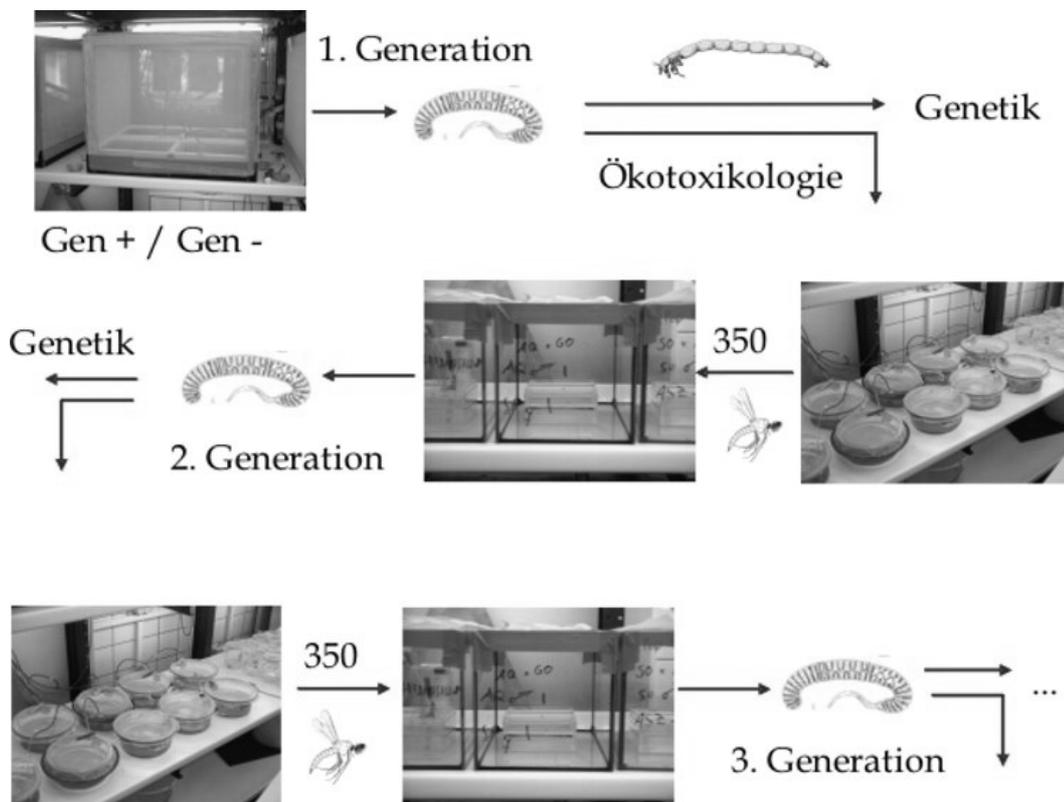


Abb. 3: Schema der Multigenerationsexperimente mit *Chironomus riparius*. Dargestellt ist beispielhaft die Durchführung der ersten drei Generationen der MGS III (in diesem Falle wurden jeweils 350 Tiere für den Start der nächsten Generation ausgewählt).



Als TBT-Nominalkonzentrationen wurden 80; 120 und 160 µg Sn/kg TG ausgewählt. Zusätzlich wurde jeweils eine Lösemittelkontrolle mit Ethanol durchgeführt. Die Testsubstanz wurde zu Beginn des Experimentes, wie im Vorexperiment, in das Sediment eingebracht. Außerdem wurden pH-Wert und Leitfähigkeit zu Anfang und zum Ende der jeweiligen Generationen aufgenommen. Auftretende Verdunstungsverluste wurden, ähnlich wie im Vorexperiment, durch Zugabe von rekonstituiertem Wasser kompensiert.

Für die genetischen Analysen wurden jeweils 200 L1-Larven von jeder Generation und Population in Aquarien (20x20x30 cm) bis zum letzten Larvalstadium unter Standardbedingungen herangezüchtet. Die Aquarien wurden mit 500 g Quarzsand (TBT-Behandlung oder LMK) und 3 L rekonstituiertem Wasser gefüllt. Die Fütterung der Larven erfolgte analog zu den MGS. Nach dem Erreichen des L4-Stadiums wurden die Tiere einzeln entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in 1,5 mL Eppendorf-Tubes bei -80°C bis zur genetischen Analyse gelagert.

In der vierten Generation der TBT-Population der MGS I wurde eine Larvalmortalität von 96% festgestellt. Ein ähnliches Problem trat in der zehnten Generation der MGS III in beiden TBT-Replikaten auf. Die jeweiligen Generationen standen nicht mehr für die Gründung der darauf folgenden Generation zu Verfügung. Um die Multigenerationsstudien trotzdem weiter führen zu können, wurden Gelege aus den gleichen vorbelasteten Populationen entnommen, welche allerdings im Rahmen von Nebenexperimenten über eine Generation unter Kontrollbedingungen gehalten wurden. So wurde beispielsweise die TBT-Population in der MGS I am Anfang drei Generationen gegenüber TBT exponiert, anschließend eine Generation unter Kontrollbedingungen gehalten und im Fortgang des Experimentes weitere sieben Generationen gegenüber TBT exponiert. Entsprechendes gilt für die MGS III, bei der die jeweiligen TBT-Replikat neun Generationen gegenüber TBT exponiert, in der darauf folgenden Generation unter Lösemittelbedingungen gehalten und anschließend wieder zwei Generationen einer TBT-Belastung ausgesetzt wurden.

2.5 Anpassungsstudien

Um Anpassungseffekte an TBT feststellen zu können, wurden zusätzlich nach ausgewählten Generationen akute und chronische Experimente durchgeführt (Tab. 5). In den Akuttests wurden L1-Larven in Mikrotiterplatten (2 mL/Kavität) gegenüber

TBT-Nominalkonzentrationen von 2; 6,3; 20; 63 und 200 µg Sn/L exponiert. Zusätzlich wurde eine LMK (10 µL Ethanol/L, 0,001 Vol.-%) durchgeführt. Als Endpunkt diente die Mortalität der Larven nach 24 h. Weiterhin erfolgten chronische Life-Cycle-Tests in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a), wobei das Testdesign der TBT-Vorstudie verwendet wurde (Kap. 2.3). Die getesteten TBT-Nominalkonzentrationen betragen 50; 80; 120 und 150 µg Sn/kg TG.

Tab. 5: Durchgeführte Akut- und Life-Cycle-Experimente in bzw. nach den ausgewählten Generationen der jeweiligen Behandlungsgruppen in den Multigenerationsstudien (MGS) I-III (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation).

MGS	Akuttest (in den Generationen)	Life-Cycle-Experiment (nach der Generation)
I	3/5/8/9/10 (GEN+)	11 (GEN+/GEN-)
	5/8/9/10 (GEN-)	
II	Es wurden keine Anpassungsexperimente durchgeführt	
III	3/4/8/10/12 (GEN+)	4/12 (GEN+)
	3/4 (GEN-)	

2.6 Cadmium als Zweitstressor

Neben den Multigenerationsexperimenten wurden weiterführende Experimente mit Cadmium als zweitem Stressor durchgeführt. Dabei wurde der Fragestellung nachgegangen, ob chronisch TBT-vorbelastete Populationen anders auf eine anschließende Cadmiumexposition reagieren als nicht TBT-vorbelastete Populationen. Innerhalb der MGS I und MGS III wurden diese Experimente mit einer Cd-Nominalkonzentration von 1,2 mg/kg TG parallel zu den MGS ebenfalls im Multigenerationsansatz (über drei Generationen) durchgeführt (Tab. 6). Die Zweitstressorstudien wurden identisch zum jeweiligen Testdesign (Replikatanzahl etc.) der MGS durchgeführt, wobei die einzelnen Belastungsgruppen entsprechend ihrer Vorexposition und Exposition während der Versuche benannt wurden (Tab. 6). Die Zweitstressorstudien wurden nur mit der Mischpopulation (GEN+) durchgeführt. Das erste Experiment, in der MGS I erfolgte dabei in der Diplomarbeit von HEß (2005) über die Generationen sieben bis neun. Die zweite Studie (ZSS III) wurde in der MGS III parallel zu den Generationen zehn bis zwölf durchgeführt.

Tab. 6: Stressorwechsel in den verschiedenen Behandlungsgruppen der MGS I (sechs Generationen TBT vorexponiert, Cd-Exposition über die Generationen sieben bis neun) und der MGS III (neun Generationen TBT vorexponiert, Cd-Exposition über die Generationen zehn bis zwölf; LMK – Lösemittelkontrolle, Cd – Cadmium, TBT – Tributylzinn).

Multigenerationsstudie I (einfache Replikation) – Zweitstressorexperiment (ZSS) I		
Bezeichnung	Vorexposition 6 Generationen	Folgebehandlung 3 Generationen
LMK+LMK	-	-
LMK+Cd	-	Cadmium
TBT+LMK	TBT	-
TBT+Cd	TBT	Cadmium
TBT+TBT	TBT	TBT
Multigenerationsstudie III (doppelte Replikation) – Zweitstressorexperiment (ZSS) III		
Bezeichnung	Vorexposition 9 Generationen	Folgebehandlung 3 Generationen
LMK+LMK I/II	- I/II	- I/II
LMK+Cd I/II	- I/II	Cadmium I/II
TBT+LMK I/II	TBT I/II	- I/II
TBT+Cd I/II	TBT I/II	Cadmium I/II
TBT+TBT I/II	TBT I/II	TBT I/II

2.7 Analytische Bestimmung der Testparameter

Neben der routinemäßigen Ermittlung von pH-Wert und Leitfähigkeit am Ende der Experimente erfolgte die analytische Bestimmung weiterer physiko-chemischer Parameter des rekonstituierten Wassers (Nitrit-/Ammoniumgehalt) sowie des Sediments (Elementanalyse) in ausgewählten Replikaten. Neben der Bestimmung von elementaren Hintergrundkonzentrationen wurde das Sediment in den Multigenerationsstudien I und III (80 bzw. 160 µg Sn/kg TG) sowie für die zusätzlichen Konzentrationen von 30 und 240 µg Sn/kg TG auf TBT und auf TBT-Metaboliten (Di- und Monobutylzinn) untersucht (DIN 19744, 2003). Dafür wurden einzelne Schalen mit den jeweiligen TBT-Konzentrationen gespikt und dem kompletten Testprozedere unterzogen (Tiere, Futter, etc.). Anschließend wurde das Sediment nach 1, 72 und 336 h analytisch untersucht. So konnte der Abbau von TBT über die Zeit abgeschätzt und durch die vier verschiedenen Konzentrationen eine Eichgerade aufgestellt werden. Um auch den TBT-Verlust durch das Spiken abschätzen zu können, wurde in der MGS III das Sediment nach dem Abdampfen des EtOH auf TBT (TBT-Metabolite) untersucht. Zusätzlich wurde der für die Versuche verwendete Quarzsand bezüglich eventueller produkti-

onsbedingter OZV-Rückstände analysiert. Für alle Experimente wurden, basierend auf den ermittelten TBT-Konzentrationen, nach dem Spiken und nach 336 h die zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998) berechnet und die auftretenden Effekte stets auf diese Konzentrationen bezogen. In den Akutexperimenten erfolgte keine TBT-Rückstandsanalytik, und die Ergebnisse beziehen sich stets auf TBT-Nominalkonzentrationen.

Für Cadmium wurde das Sediment und das Überstandswasser (Überstandswasser nur in der ZSS I) nach der vollen Testdauer (ca. 35 Tage) und nicht zu Beginn des Experimentes analysiert. Eventuelle Cadmiumgehalte in den Larven wurden nicht vermessen. Da bereits im Quarzsand geringe Cd-Konzentrationen auftreten, wurden die Cd-Konzentrationen im Test mit den Hintergrundwerten korrigiert.

Die Sedimentproben wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen und bei -32°C in 50 mL Falcon-Tubes eingefroren. Anschließend wurden die Sedimente gekühlt an die jeweiligen Kontraktlabors verschickt. Die Rückstandsanalysen für die OZV erfolgten durch die Firma GALAB (Geesthacht), und die Rückstandsanalytik für Cd sowie weitere Elemente und Verbindungen wurden am Internationalen Hochschulinstitut Zittau in der Abteilung Umweltanalytik durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Messgrößen, Standardisierung und Methoden der Rückstandsanalysen für die Experimente.

Messgröße	Verfahren	Methode
Organozinnverbindungen	DIN 19744	Organische Extraktion+ Gaschromatographie
Sedimentaufschluss	DIN 13656	Mikrowellenaufschluss
Cd-Sediment-/Wasseranalytik	DIN 38406-29	ICP-MS
Markoelementanalyse (Mg, K, Ca etc.)	DIN 38406-22	ICP-OES
Anionen im rekonstituierten Wasser	EN ISO 10304-1	Ionenchromatographie

2.8 Genetische Analysen

Die genetische Variabilität wurde anhand fünf verschiedener Mikrosatellitenmarker (MS) bei *C. riparius* analysiert (Tab. 8). Diese MS wurden vor dem Beginn der Multigenerationsstudien für *C. riparius* neu entwickelt und zu einem Routineverfahren etabliert (HEß, 2005; PUPP, 2005; KLEY, 2005; NOWAK et al., 2006; OETKEN et al., 2006).

Tab. 8: Für die genetischen Analysen verwendete Mikrosatellitenmarker (MS). Dargestellt sind die Wiederholungsmotive (MS-Motiv), die Anzahl an Allelen pro Locus (N_{Allele}), die Fragmentlängen (in Basenpaaren, bp) und die jeweilige Primersequenz (for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer) nach NOWAK et al. (2006).

MS	MS-Motiv	N_{Allele}	Fragmentlänge (bp)	Primersequenz
MS ₁	CA ₉	8	95-103	for: CAT CAT CCT TAA CAA CCC AC
		(4)	(96-100)	rev: CTA GCT TTG CAG GCG AGT GC
MS ₂	(TAA) ₉ , T ₁₀	8	114-141	for: AGA CTA ATG ACC AGA CTT GC
		(10)	(112-141)	rev: CTT GTG ATG CGA AAA GCC TG
MS ₃	(GT) ₁₄ , T ₉ , T ₆	7	168-176	for: ACT ACG CGT GCC TCA ACA GC
		(13)	(159-189)	rev: AGC TAA TTC TCA TGT TGG TC
MS ₄	(TCA) ₆	3	211-216	for: TGA CTG AAC TTC CGC AAT GGG
		(2)	(215-216)	rev: CCG AGA ATG CTG CGA TCC AG
MS ₅	(CA) ₁₁ , A ₉	10	264-278	for: AAC ATT TGA ACG CAC ATC G
		(13)	(269-290)	rev: ATT TGA TTG TAT GTC CTG

Mikrosatelliten sind kurze repetitive Sequenzen, welche zumeist aus Mono- bis Tetranukleotid-Wiederholungen bestehen. Dabei handelt es sich um stochastisch über das gesamte Genom verteilte, nicht kodierende DNA-Sequenzen (LOWE et al., 2004). Der Vorteil nicht kodierender Sequenzabschnitte ist die hohe Variabilität dieser Marker; infolgedessen können Unterschiede zwischen Populationen gut aufgelöst werden (DIMSOSKI & TOTH, 2001). Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu kodierenden Sequenzen ist, dass auf neutrale Marker kein direkter Selektionsdruck wirkt und sie sich deshalb evolutiv schneller verändern können. Weiterhin sind nicht kodierende Sequenzen hoch polymorph, und dank der hohen Polymorphie können Unterschiede zwischen eng verwandten Populationen erfasst werden (BICKHAM et al., 2000). Durch die Analyse von polymorphen Markern erhöht sich außerdem die Wahrscheinlichkeit eventuelle Veränderungen der Allelfrequenzen detektieren zu können. Einzelne Allele sind durch unterschiedliche Wiederholungszahlen der jeweiligen Repeats und durch unterschiedliche Sequenzlängen gekennzeichnet. Da es sich um nicht kodierende Marker handelt, ist außerdem davon auszugehen, dass diese Allele co-dominant vererbt werden (BICKHAM et al., 2000).

Das Protokoll zur DNA-Isolation, Mikrosatellitenamplifikation, gelelektrophoretischen Auftrennung der Mikrosatellitenfragmente und Auswertung der Mikrosatellitenlängen ist in NOWAK et al. (2006) beschrieben. Im Rahmen der MGS werden jeweils 36 (MGS I) bzw. 24 Tiere (III) in ausgewählten Generationen analysiert (Tab. 9).

Tab. 9: Generationen und Anzahl an Organismen, die innerhalb der Multigenerationsstudien hinsichtlich der genetischen Diversität untersucht wurden (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation, n.B. – nicht bestimmt).

Multigenerations- studie	Untersuchte Generationen		Untersuchte L4-Larven
	GEN+	GEN-	
MGS I	0, 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11	0, 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11	36
MGS II	0, 2 (nur LMK)	n.B.	36/24
MGS III	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12	n.B.	24

2.9 Datenauswertung

Die statistische Auswertung der ökotoxikologischen Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.03 (GraphPad Software, USA) durchgeführt. Bei normal verteilten Daten ohne Abweichungen der Varianzen wurde der ungepaarte t-Test oder bei mehreren Vergleichsgruppen eine einfache Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett's post test) durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Daten bzw. bei unterschiedlichen Varianzen wurden der Mann-Whitney U-Test oder der Kruskal-Wallis Test (Dunn's post test) herangezogen.

In der MGS II/III erfolgte eine Modifizierung des Testdesigns, wobei pro Behandlungsgruppe zwei unabhängige Replikate mit jeweils sieben Kristallisierschalen durchgeführt wurden (Kap. 2.4, Tab. 4). Im Vergleich dazu wurde in der MGS I jeweils nur ein unabhängiges Replikat mit 10 Kristallisierschalen durchgeführt (Kap. 2.4, Tab. 4). Aufgrund der Änderung des Testdesigns verringerte sich die Anzahl an Freiheitsgraden von zehn (MGS I) auf zwei (MGS II/III) pro Behandlungsgruppe, und deshalb konnten signifikante Ergebnisse des Vorexperimentes und der MGS I nur eingeschränkt bestätigt werden. Allerdings wurde durch die Veränderung des Testdesigns eine statistische Auswertung der Endpunkte Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), Populationswachstumsrate und vor allem für die genetischen Endpunkte in der MGS II und III möglich.

Mortalität und LC₅₀-Wert

Basierend auf der Larven- und Puppenmortalität wurde die prozentuale Mortalität für jedes Testgefäß einzeln berechnet und anschließend der Mittelwert aus den jeweiligen Einzelmortalitäten für jede Behandlung bzw. Generation bestimmt (Gl. 1).

$$\text{Mortalität [\%]} = \frac{(N_{\text{Larven}} + N_{\text{Puppen}}) \cdot 100}{N_{\text{Gesamt}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

N_{Larven} Anzahl toter Larven

N_{Puppen} Anzahl toter Puppen

N_{Gesamt} Anzahl eingesetzter Larven pro Schale (50 Tiere)

Für die chronischen Tests konnten aussagekräftige LC₅₀-Werte nur für die Experimente mit einer Kontrollmortalität < 30% berechnet werden. Zu Beginn der Analysen wurde für jede Konzentration eine mittlere Mortalität (\pm SD, n) ermittelt und diese anschließend für die Berechnung des LC₅₀-wertes mittels nicht linearer Regression (sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg) benutzt. Als festgesetzte Kurvenparameter dienten für die untere/obere Asymptote der Regressionskurve die Kontrollmortalität sowie die maximale Mortalität von 100%. Signifikante Unterschiede wurden für die MGS I durch ein Global-Fitting-Verfahren nach MOTULSKY und CHRISTOPOULOS (2004) bestimmt. In der MGS II/III wurde zuerst ein LC₅₀-Wert pro Replikat berechnet und anschließend die beiden Replikate pro Behandlungsgruppe zusammengefasst (n = 2). Signifikante Unterschiede der jeweiligen LC₅₀-Werte wurden nun durch einen t-Test bestimmt. In den Akuttests wurden die LC₅₀-Werte analog zu den chronischen Tests bestimmt.

Mittlerer Schlupfzeitpunkt und Hauptschlupfintervall

Basierend auf dem Schlupfzeitpunkt und der Anzahl der geschlüpften Tiere wurde der mittlere Schlupfzeitpunkt (EmT₅₀) für das jeweilige Geschlecht und für jede Schale ermittelt. Für die Berechnung des EmT₅₀ ist es notwendig, die Daten zu transformieren. Dabei wurde die Anzahl der geschlüpften Tiere kumuliert und anschließend auf 100% normalisiert. Zusätzlich wurde der natürliche Logarithmus des Schlupfzeitpunktes gebildet. Die normalisierte Anzahl der geschlüpften Tiere wurde danach gegen die



logarithmierte Zeitachse aufgetragen und eine nicht lineare Regression mit der Logistikkurve ermittelt (Gl. 2).

$$Y = \frac{c \cdot e^{b(x-EmT_{50})}}{1 + e^{b(x-EmT_{50})}} \quad \text{Gleichung 2}$$

- Y kumulierte Anzahl der geschlüpften Tiere (Männchen bzw. Weibchen)
- x logarithmierter Schlupfzeitpunkt
- c 100% (konstanter Wert für max. Schlupferfolg)
- b Anstieg der kumulativen Logistikkurve
- e Eulersche Zahl
- EmT₅₀ mittlere Emergenzzeit (Männchen bzw. Weibchen)

Das Softwareprogramm Prism[®] berechnete anhand der Logistikkurve die EmT₅₀ der jeweiligen Geschlechter, den Standardfehler, das dazugehörige 95% Konfidenzintervall (95% KI) sowie die Anzahl der Freiheitsgrade. Um die EmT₅₀-Werte anschaulich darstellen zu können, wurden die logarithmierten Werte rücktransformiert und anschließend die einzelnen EmT₅₀-Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst und sowohl im Vorexperiment als auch in der MGS I auf signifikante Unterschiede (t-Test) überprüft. In der MGS II/III wurde erneut zuerst einen EmT₅₀ pro Replikat berechnet und anschließend beide Replikate pro Behandlungsgruppe zusammengefasst (n = 2). Signifikante Unterschiede wurden abermals durch einen t-Test bestimmt. Weiterhin wurden die EmT₂₀ (20% Gesamtschlupf) und EmT₈₀ Werte (80% Gesamtschlupf) anhand einer kumulativen Logistikkurve mittels Interpolation im Vorexperiment bestimmt. So lässt sich durch Subtraktion (EmT₈₀-EmT₂₀) das Hauptschlupfintervall, in dem 60% aller Tiere geschlüpft sind, ermitteln.



Weibchenanteil der geschlüpften Imagines (AW)

Der Anteil der Weibchen an der Gesamtzahl der geschlüpften Tiere wurde wie folgt berechnet (Gl. 3):

$$AW = \frac{(N_{EW} + N_{SuW})}{(N_{EW} + N_{SuW}) + (N_{EM} + N_{SuM})} \quad \text{Gleichung 3}$$

N_{EW} Anzahl der erfolgreich geschlüpften Weibchen

N_{SuW} Anzahl der weiblichen Schlupfunfälle

N_{EM} Anzahl der erfolgreich geschlüpften Männchen

N_{SuM} Anzahl der männlichen Schlupfunfälle

Signifikante Unterschiede wurden in der Vorstudie und in der MGS I mittels Fisher's exact-Test und in der MGS II/III mittels t-Test ermittelt.

Gelege pro Weibchen

Die Anzahl an Gelegen pro zeugungsfähigem Weibchen wurde durch einfache Division berechnet. Dieser Parameter kann bezüglich der gesamten Anzahl an Gelegen pro Weibchen und der fertilen Gelegeanzahl pro Weibchen unterschieden werden. Signifikante Unterschiede wurden in der Vorstudie und in der MGS I mittels Fisher's exact-Test und in der MGS II/III mittels t-Test ermittelt.

Gelegegröße

In den Experimenten wurde die Gelegegröße mit der modifizierten Ringzählmethode nach BENOIT et al. (1997) aufgenommen. Gelege, die eine unregelmäßige Form aufwiesen, wurden dabei nicht berücksichtigt und im Ergebnissteil mit n.d. (non det., nicht bestimmt) gekennzeichnet. Da die Gelegegröße nicht normal verteilt war, wurde die mediane Gelegegröße der gesamten und der fertilen Gelege bestimmt und mittels U-Test auf signifikante Unterschiede im Vorexperiment und in der MGS I überprüft. Signifikante Unterschiede der Gelegegrößen wurden innerhalb der MGS II/III wieder analog zur Mortalität ermittelt.

Trockengewicht der Imagines

Das Trockengewicht der Imagines wurde aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nur in der MGS I ermittelt. Die Gewichte der Weibchen wiesen dabei keine Normalverteilung, sondern eine bimodale Verteilungsfunktion auf, welche mit der Eiablage erklärt werden kann (VOGT, 2003). So ist anzunehmen, dass Weibchen mit bereits erfolgter Eiablage deutlich leichter sind als Weibchen, deren Eier noch nicht abgelegt wurden.

Populationswachstumsrate

Die Populationswachstumsrate (λ) wurde über den mathematischen Zusammenhang einzelner Entwicklungs- und Reproduktionsparameter berechnet (Gl. 4). Die Berechnungsgrundlage der Populationswachstumsrate wurde 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. (1997), auf das gewählte Testdesign angepasst (HOMMEN, 2005):

$$\lambda = \left(e \cdot d \cdot c \cdot \left(1 - \frac{a}{100} \right) \right)^{\frac{1}{b}} \quad \text{Gleichung 4}$$

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

Signifikante Unterschiede konnten im Vorexperiment und in der MGS I aufgrund der einfachen Replikation nicht bestimmt werden. In den MGS II bzw. III wurden signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erneut mittels t-Test ($n = 2$) berechnet.



Genetische Analysen

Die populationsgenetischen Diversitätsmaße (z.B. die beobachtete und die erwartete Heterozygotie) sowie der Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Allelfrequenzen an den jeweiligen Genorten wurden mit dem Programm GENPOP[®] (Online-Version 3.4, RAYMOND & ROUSSET, 1995) ermittelt.

Ableitung genereller Aussagen

Für die Ermittlung von generellen Aussagen wurden alle 25 Generationen der Population GEN+LMK und für die Verbesserung der statistischen Aussagekraft 15 Generationen der Population GEN-LMK herangezogen. Dabei wurden allerdings die ersten beiden Generationen der GEN-LMK in der MGS I aufgrund der extrem niedrigen Reproduktion nicht mit berücksichtigt. Bei diesen beiden Generationen ist von einer gestörten Situation auszugehen, und es können keine allgemeinen Aussagen für *C. riparius* abgeleitet werden. Da die Studien insgesamt über zwei komplette Jahre durchgeführt wurden, werden für die Jahreszyklen jeweils die Mittelwerte der Life-Cycle-Parameter der entsprechenden Monate (\pm SD) gebildet.

Zweitstressorexperimente

Die Endpunkte der Life-Cycle-Experimente mit Cadmium (Cd) werden in jeder Generation aufgenommen und für beide Zweitstressorstudien (ZSS) als gemittelte Werte (\pm SD) der drei Generationen aufgeführt. Die jeweiligen Behandlungsgruppen werden, der besseren Übersichtlichkeit halber, nach ihrer Vorbelastung in „nicht vorbelastet“ und „TBT-vorbelastet“ getrennt. Statistisch signifikante Unterschiede werden in allen Grafiken für Unterschiede zwischen der Cd-Behandlung und der jeweils zugehörigen Kontrolle bzw. zwischen den beiden Cd-Ansätzen dargestellt. Die Ergebnisse der jeweiligen Vergleichsgruppen aus den MGS I und III werden zusammenfassend für die jeweiligen Generationen dargestellt (GEN+LMK, GEN+TBT).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Ausgangspopulationen

3.1.1 Genetische Diversität der Einzelpopulationen und der Mischpopulation

Vor dem Beginn der Multigenerationsexperimente wird die genetische Variabilität der Ausgangspopulationen bestimmt und als beispielhaftes Diversitätsmaß der Shannon-Index berechnet (Abb. 4). Dabei ist zu erkennen, dass die Einzellaborpopulationen eine niedrigere genetische Variabilität als beide Freilandpopulationen aufweisen (NOWAK et al., 2007). Der Shannon-Index variiert in den Laborzuchten zwischen 0,07 (LY) und 0,65 (CA). Im Gegensatz dazu weisen beide Freilandpopulationen deutlich höhere Werte zwischen 1,23 (SB) und 1,34 (KA) auf. Die Mischpopulation (GEN+) hat eine höhere genetische Variabilität als die Einzellaborpopulationen, erreicht jedoch mit einem Shannon-Index von 1,05 nicht ganz das Niveau der beiden Freilandpopulationen. Für GEN- wird ein niedriger Shannon-Index von 0,08 ermittelt.

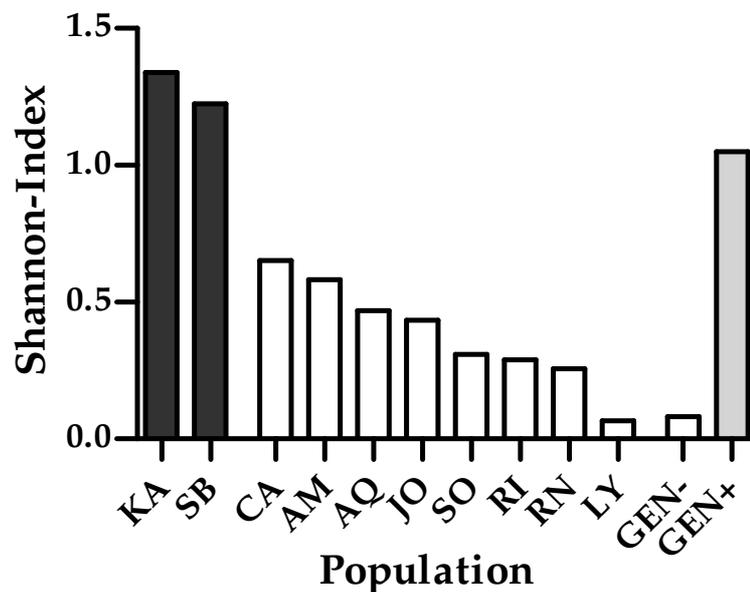


Abb. 4: Genetische Diversität von *Chironomus riparius*, ausgedrückt als Shannon-Index von zwei Freiland- (dunkle Balken), neun Einzel- (helle Balken) und der erstellten Mischpopulation (grauer Balken, Abkürzungen vgl. Kap. 2.2.2).

3.1.2 Kreuzungsexperimente

Die Kreuzungsexperimente mit einzelnen *C. riparius*-Stämmen aus den verschiedenen Laboren verdeutlichen die Annahme, dass eine erfolgreiche Vermischung einzelner

Populationen möglich ist (Tab. 10). Dabei ist es nicht entscheidend, ob Männchen oder Weibchen der jeweiligen Population miteinander gekreuzt werden. Die meisten produzierten Gelege sind fertil, wobei nur zwei Ausnahmen bei der Kreuzung von Männchen der AS-Population mit Weibchen der AQ-Population sowie von Männchen der SO-Population und Weibchen der AS-Population festzustellen sind. Hierbei sind 61% (AS ♂, AQ ♀) bzw. 36% (SO ♂, AS ♀) aller produzierten Gelege fertil.

Tab. 10: Kreuzungsschema und produzierte Gelege (gesamt bzw. fertil) der Einzelpopulationen vor der Erstellung der Mischpopulation. Abkürzungen der Einzelpopulationen vgl. Kap. 2.2.2, ♀/♂ - einzeln aufgezogene Weibchen/Männchen.

Population/ Geschlecht	AM ♀	AQ ♀	AS ♀	CA ♀	GEN- ♀	JO ♀	LY ♀	OH ♀	RN ♀	RI ♀	SO ♀
AM ♂			8/8								
AQ ♂											
AS ♂		31/19		19/19							
CA ♂	27/27								9/9		
GEN- ♂				11/11							
JO ♂				6/4							1/1
LY ♂											
OH ♂											
RN ♂											
RI ♂											
SO ♂			11/4			11/11					

3.2 Life-Cycle-Test zur Bestimmung der TBT- und Cd-Testkonzentrationen

Rückstandsanalytik

Für den in den Versuchen verwendeten Quarzsand werden kein TBT und keine TBT-Metaboliten nachgewiesen (Tab. 11; VOGT et al., 2007a). Für TBT sind die berechneten, zeitlich gewichteten mittleren Testkonzentrationen deutlich niedriger als aufgrund der Nominalkonzentration erwartet wird, wobei nur ca. 6% der eingesetzten Testkonzentration analytisch wieder gefunden werden konnten (Tab. 11). Im Gegensatz dazu sind die Wiederfindungsraten für Cadmium im Sediment mit zeitlich gewichteten mittleren Testkonzentrationen von minimal 55% (2,1 mg Cd/kg TG) bis maximal 85% (0,2 mg Cd/kg TG) der gewählten Testkonzentrationen deutlich höher. Die

zusätzlich aufgenommen Parameter, wie z.B. Nitrit- und Nitratkonzentration des Testsystems, sind im Anhang nachzulesen.

Tab. 11: Zeitlich gewichtete mittlere Testkonzentrationen für das TBT- und Cd-Vorexperiment (LMK – Lösemittelkontrolle) nach der OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998). Die Rückstandsanalysen werden in Anlehnung an die DIN-Norm 19744 durchgeführt (Nachweisgrenze < 1 µg OZV/kg TG).

Nominalkonzentration	zeitlich gewichtete mittlere Testkonzentrationen
Tributylzinn [µg Sn/kg TG]	
Kontrolle	< 1
LMK	< 1
50	2,79
80	4,46
100	5,58
200	11,2
Cadmium [mg/kg TG]	
LMK	0
0,20	0,17
0,50	0,39
0,80	0,61
1,00	0,78
1,20	0,76
1,50	0,91
1,80	1,39
2,10	1,17

Validitätskriterien

Die beiden Vorexperimente erfüllen nahezu alle Validitätsanforderungen der OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a), wobei die Mortalität in beiden Lösemittelkontrollen (LMK) unter 30% liegt. Der Hauptschlupf der Imagines findet zwischen dem 12. und 23. Versuchstag statt. Hinsichtlich der chemischen Parameter wird eine geringe Abweichung von der OECD-Richtlinie festgestellt, da der pH-Wert nicht wie vorgegeben zwischen 6,0 und 9,0, sondern in Einzelfällen bei 5,5 liegt. Weiterhin beträgt die Temperatur über den gesamten Versuchsverlauf $20 \pm 1^\circ\text{C}$, die Leitfähigkeit beträgt zu Beginn des Experimentes $540 \mu\text{S}/\text{cm}$ und die Sauerstoffsättigung ist stets über 60%.



Lösemitteleffekte und Testdesign

Im TBT-Experiment wies keiner der untersuchten Endpunkte signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle mit rekonstituiertem Wasser und der LMK mit EtOH auf. Weiterhin zeigen die Endpunkte der beiden Testdesigns mit verschiedener Larvenanzahl pro Testgefäß und mit unterschiedlichem Sediment:Wasser-Verhältnis keine signifikanten Unterschiede.

Mortalität und Weibchenanteil

Die Exposition gegenüber beiden Substanzen resultiert in einer klaren Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 5), wobei die Mortalität mit steigender Konzentration signifikant ansteigt (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$). Signifikant ($p < 0,001$, ANOVA, Dunnett's post test) erhöhte Larvalmortalitäten werden bei der höchsten TBT-Konzentration (11,2 $\mu\text{g Sn/kg TG}$) mit einem Mittelwert von 75% verzeichnet. Weiterhin wird ein LC_{50} -Wert für TBT von 8,27 $\mu\text{g Sn/kg TG}$ ($\pm 95\%$ KI: 6,56 – 10,4 $\mu\text{g Sn/kg TG}$) ermittelt. Steigende Cd-Konzentrationen führen ebenso zu erhöhter Larvalmortalität, wobei ein signifikanter ($p < 0,05$, ANOVA, Dunnett's post test) Unterschied bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG mit einer mittleren Mortalität von 79% im Vergleich zur LMK vorliegt. Eine Ausnahme von der monoton steigenden Konzentrations-Wirkungsbeziehung wird in der höchsten Cd-Konzentration beobachtet. Diese weist eine mittlere Mortalität von 52% auf. Der berechnete LC_{50} -Wert für Cd beträgt 0,85 mg Cd/kg TG ($\pm 95\%$ KI: 0,62 – 1,17 mg Cd/kg TG). In beiden Vorexperimenten wird keine erhöhte Anzahl an toten L4-Larven oder Puppen beobachtet, wobei der Maximalwert von 6% (in Summe) bei einer Cd-Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG festgestellt wird. Außerdem gibt es keinen Einfluss der Testsubstanzen auf den Schlupferfolg der Puppen, da diese zumeist erfolgreich schlüpfen.

Beide Testsubstanzen führen nicht zu einer signifikanten Veränderung des Weibchenanteils. Dieser schwankt um den erwarteten Wert von 0,5 und liegt stets zwischen 0,38 (0,76 und 1,17 mg Cd/kg TG) und 0,57 (LMK im Cd-Experiment).

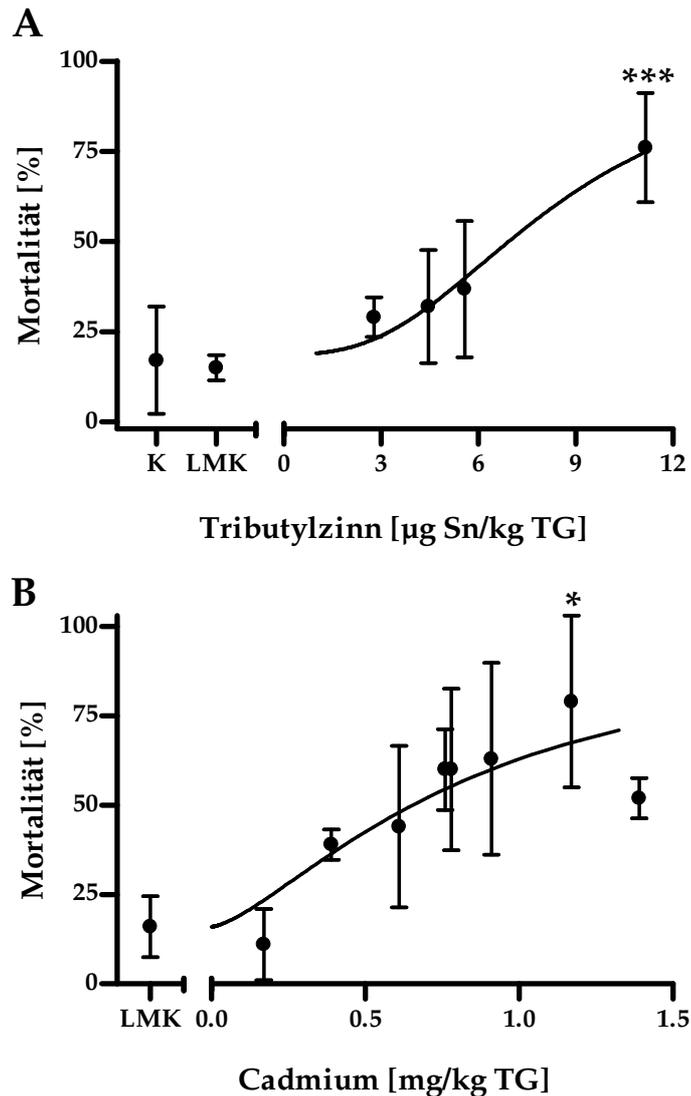


Abb. 5: Mittlere Mortalität (\pm SD, in %) von *Chironomus riparius*, exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B). Signifikante Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse bestimmt (ANOVA, Dunnett's post test, $n_{\text{TBT}} = 4-5$, $n_{\text{Cd}} = 1-2$, $\star = p < 0,05$, $\star\star\star = p < 0,001$, K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle). Die Berechnung der LC_{50} -Werte erfolgt mittels nicht linearer Regression (sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg, geschlossene Linie). LC_{50} -Wert TBT = $8,27 \mu\text{g Sn/kg TG}$ (\pm 95% KI: $6,56 - 10,4 \mu\text{g Sn/kg TG}$, $n = 22$) und LC_{50} -Wert Cd = $0,85 \text{ mg/kg TG}$ (\pm 95% KI: $0,62 - 1,18 \text{ mg/kg TG}$, $n = 16$)

Mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT_{50}) und Hauptschlupfintervall

In allen Behandlungsgruppen schlüpfen die Männchen früher als die Weibchen (Abb. 6). Weiterhin ist festzustellen, dass beide Testsubstanzen den Schlupf geschlechtsunabhängig beeinflussen, da eine signifikante Korrelation der EmT_{50} -Werte ermittelt wird (Pearson-Korrelation, $p < 0,001$). Schlüpfen die Männchen später, dann schlüpfen auch die Weibchen später. Für TBT wird eine deutliche Konzentrations-Wirkungsbeziehung festgestellt (Abb. 6A), wobei der Schlupf beider Geschlechter in



den beiden höchsten Konzentrationen signifikant verzögert wird ($p < 0,05$, ANOVA, Dunnett's post test). Der späteste mittlere Schlupfzeitpunkt der Männchen mit 30 Tagen und der Weibchen mit 32 Tagen ist in der höchsten TBT-Konzentration zu beobachten. Im Hinblick auf das Hauptschlupfintervall werden keine signifikanten Effekte der TBT-Exposition beobachtet. In der LMK schlüpfen 60% der Tiere im Zeitraum von ca. 5 Tagen. Ein gleich langes Hauptschlupfintervall wird auch bei den TBT-Behandlungen ermittelt. Außerdem wird kein geschlechtsspezifischer Unterschied hinsichtlich dieses Parameters beobachtet.

Für Cd variieren die berechneten EmT_{50} -Werte und das Hauptschlupfintervall stark, was durch die niedrige Anzahl an Replikaten und die damit einhergehende geringe statistische Aussagekraft zu erklären ist (2 Replikate pro Konzentration). Bei den Konzentrationen von 0,91 und 1,17 mg Cd/kg TG basieren die EmT_{50} -Werte und das Hauptschlupfintervall auf Werten aus nur einem Replikat, da aufgrund einer Mortalität von mehr als 80% im zweiten Replikat kein aussagekräftiger Wert berechnet werden kann. Cadmium verzögert die EmT_{50} -Werte beider Geschlechter signifikant in einer deutlichen Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 6B, Pearson-Korrelation, $p < 0,05$). Die maximale Schlupfverzögerung wird bei einer Konzentration von 0,76 mg Cd/kg TG beobachtet, wobei der EmT_{50} -Wert für die Männchen 36 Tage und für die Weibchen 40 Tage beträgt. Im Vergleich zur LMK ist der mittlere Schlupfzeitpunkt um ca. 60% verzögert. Deutliche Effekte der Cd-Exposition werden neben dem mittleren Schlupfzeitpunkt auch auf die Länge des Hauptschlupfintervalls festgestellt. Für diesen Parameter besteht eine signifikant positive Korrelation für die Weibchen (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$). So führen erhöhte Cd-Konzentrationen zu längeren Hauptschlupfintervallen der weiblichen Tiere, wobei der maximale Effekt bei 0,76 mg Cd/kg TG beobachtet wird. Bei dieser Konzentration beträgt das Hauptschlupfintervall ca. zehn Tage und ist fast doppelt so lang wie in der LMK (ca. 5 d). Für die Männchen wird der Substanzeffekt auf das Hauptschlupfintervall ebenfalls beobachtet, und eine deutliche Verlängerung des Schlupfes ist bei den Konzentrationen 0,78; 0,91 und 1,17 mg Cd/kg TG festzustellen.

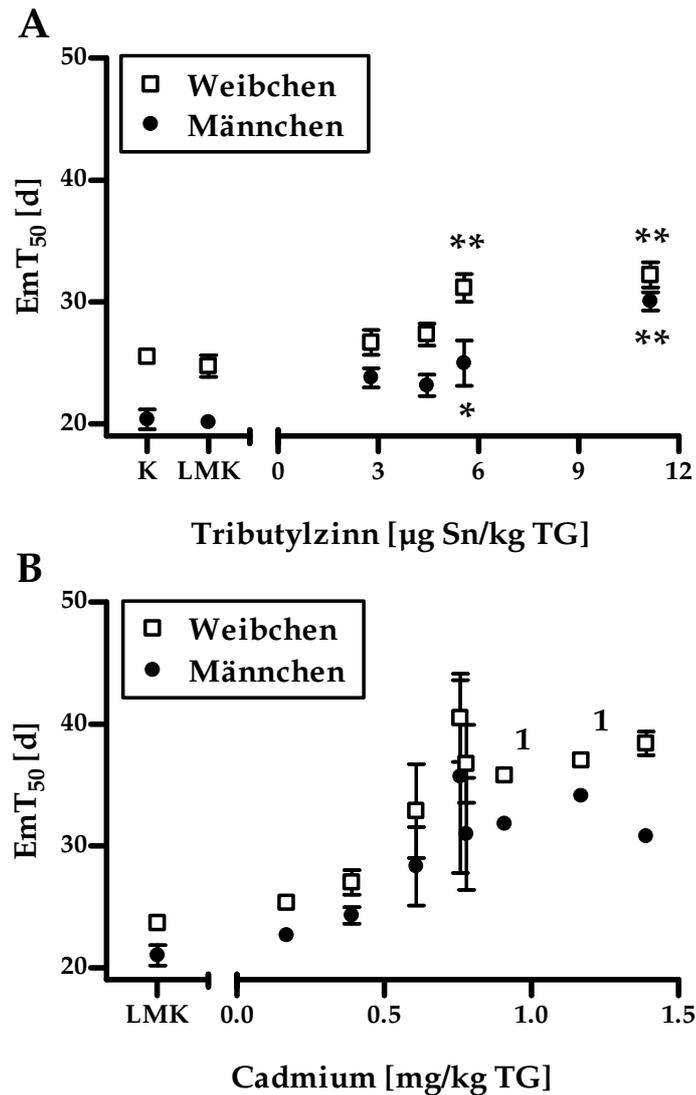


Abb. 6: Mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT₅₀ ± SEM, in d) von *Chironomus riparius*-Männchen (geschlossene Punkte) und -Weibchen (offene Quadrate) des Tributylzinn- (A) und Cadmium-Experimentes (B). Signifikante Unterschiede werden mittels einfacher Varianzanalyse berechnet (ANOVA, Dunnett's post test, n_{TBT} = 4 – 5, n_{Cd} = 1 – 2, ★ p < 0,05, ★★ p < 0,01). K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle (Ethanol), ¹ Werte werden basierend auf einem Replikat berechnet, da im anderen Replikat die Mortalität > 80% war.

Reproduktion

Bezüglich der Gelegenanzahl pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) wird festgestellt, dass die Weibchen bei einer TBT-Konzentration von 2,79 µg Sn/kg TG und in der LMK des Cd-Experimentes mehr als ein Gelege pro Weibchen mit 1,03 (TBT-Experiment) und 1,04 (Cd-Experiment) produzieren (Tab. 12). Für die Exposition gegenüber TBT wird in den beiden höchsten Konzentrationen eine geringere Anzahl an Gelegen pro Weibchen

im Vergleich zur Lösemittelkontrolle ermittelt. Dabei wird in der höchsten Konzentration nur ein Gelege produziert, und die Anzahl an Gelegen pro Weibchen mit 0,13 berechnet. Die Fertilität der Gelege wird von TBT nicht beeinflusst und variiert zwischen 74% (5,58 µg Sn/kg TG) und 100% (11,2 µg Sn/kg TG).

Cadmium wirkt sich negativ auf die Reproduktion der Weibchen aus. Niedrigere Reproduktionsraten im Vergleich zur Kontrolle werden bei 0,76; 1,17 und 1,39 mg Cd/kg TG festgestellt. Allerdings folgen diese Effekte keiner klaren Konzentrations-Wirkungsbeziehung, da die Reproduktion bei 0,78 und 0,91 mg Cd/kg TG nicht beeinflusst wird. Cadmium hat des Weiteren einen Einfluss auf die Fertilität der Gelege. Bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG sind nur 40% der produzierten Gelege fertil, während in der LMK 85% fertile Gelege beobachtet werden.

Die Gelegegröße von regelmäßig spiralförmig ausgeprägten Gelegen wird als Eianzahl pro Gelege abgeschätzt. Diese Methode wird vor den Multigenerationsstudien bezüglich ihrer Aussagekraft untersucht (Abb. 7). Die Kalibrierungskurve zeigt, dass die geschätzte mit der gezählten Eizahl pro Gelege positiv korreliert (Spearman-Korrelation, $p < 0,001$). Die angewandte Methode führt allerdings zu einer Überschätzung der Gelegegröße bei kleinen Gelegen und zu einer Unterschätzung der Eizahl bei großen Gelegen. Dieser Effekt wird in der Auswertung der Experimente aufgrund des hohen linearen Regressionskoeffizienten ($r^2 = 0,84$) vernachlässigt.

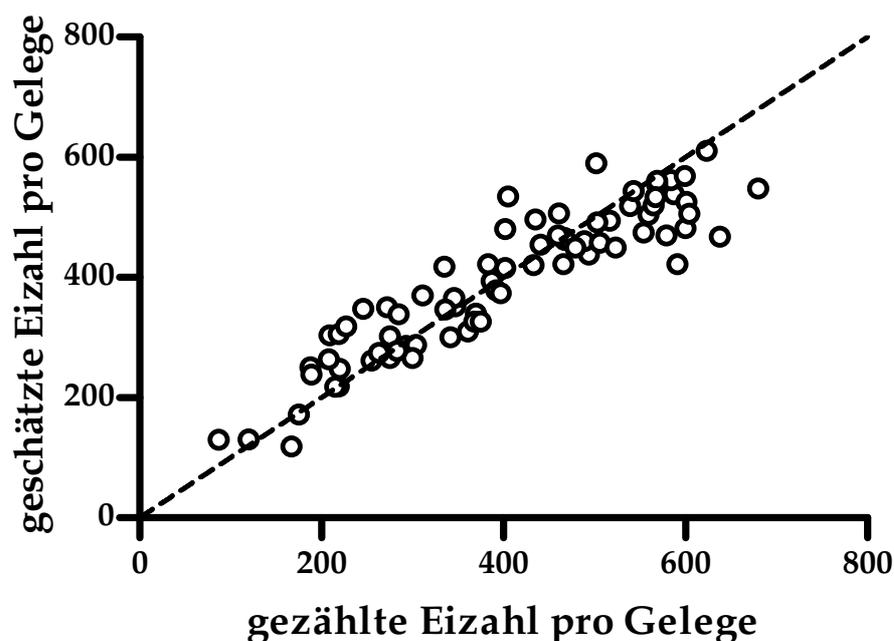


Abb. 7: *Chironomus riparius*. Gezählte und geschätzte Eizahl pro Gelege (Spearman Korrelation, $p < 0,001$, $n = 76$, gestrichelte Linie - lineare Regression mit der Steigung 1).



In den Vorexperimenten wurde unter Kontrollbedingungen überprüft, ob alle Eier eines als fertil kategorisierten Geleges entwicklungsfähig sind. Dabei wurde festgestellt, dass durchschnittlich aus 85% ($\pm 14,8\%$ SD) aller Eier eine L1-Larve schlüpft.

Für TBT wird kein Effekt auf die Gelegegröße beobachtet (Tab. 12). Im Gegensatz dazu werden signifikante Effekte der Cd-Exposition bei 0,17; 0,61; 0,78; 0,91 und 1,39 mg Cd/kg TG berechnet. In diesen Behandlungsgruppen sind Gelege signifikant ($p < 0,05$, U-Test) kleiner als in der LMK, wobei eine nicht monotone Konzentrations-Wirkungsbeziehung ermittelt wird. Außerdem werden in nahezu allen Kontrollen bzw. LMK und Behandlungsgruppen vereinzelte Gelege mit einer Abweichung von der regelmäßigen spiralförmigen Ausprägung beobachtet (Tab. 12).

Neben den reproduktionsrelevanten Parametern wird im Vorexperiment auch die Anzahl an Larven der F1-Generation abgeschätzt, um die Realisierbarkeit der folgenden Multigenerationsstudien zu überprüfen. Für TBT beträgt die Anzahl an Larven für die nächste Generation in der Kontrolle 11.246 und in der LMK 14.068. In der niedrigsten TBT-Konzentration (2,79 $\mu\text{g Sn/kg TG}$) wird festgestellt, dass die Anzahl an Larven für die nächste Generation mit 15.478 leicht über der Anzahl der Kontrollgruppen liegt. Im Gegensatz dazu führt eine Erhöhung der TBT-Konzentration zu einer deutlichen Verringerung der Larvenzahlen für die nächste Generation. Im Cd-Experiment wird in der Lösemittelkontrolle eine höhere Anzahl an Larven für die nächste Generation ermittelt als im TBT-Experiment (26.606). Mit steigenden Cd-Konzentrationen fällt die Anzahl an Larven signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$), und der Minimalwert von 1.209 Larven wird bei 1,17 mg Cd/kg TG beobachtet.

Tab. 12: Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), Eier pro Gelege und geschätzte Larvenanzahl der F1-Generation im TBT- und Cd-Vorexperiment (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post test, ★ $p < 0,05$, ★★ $p < 0,01$, LMK - Lösemittelkontrolle).

Konzentration	Gelege pro Weibchen		Eier pro Gelege (Median, 25/75% Perzentil; <i>n</i>)	Geschätzte Larvenzahl der F1- Generation
	gesamt	fertil		
Tributylzinn [$\mu\text{g Sn/kg TG}$]				
Kontrolle	0,80	0,68	504 (218/593; 25)	11.246
LMK	0,90	0,80	518 (300/608; 28)	14.068
2,79	1,03	1,00	530 (263/630; 26)	15.478
4,46	0,80	0,60	455 (340/545; 13)	8.138
5,58	0,65	0,48	418 (320/495; 14)	6.814
11,2	0,13	0,13	495 (-/-; 1)	495
Cadmium [mg Cd/kg TG]				
LMK	1,04	0,89	678 (457/819; 42)	26.606
0,17	0,96	0,84	605 (361/693; 40) ★★	21.643
0,39	0,96	0,77	625 (329/748; 24)	13.167
0,61	0,92	0,81	586 (373/661; 24) ★	10.777
0,76	0,40	0,33	551 (351/645; 6)	2.537
0,78	0,75	0,63	595 (442/656; 11) ★	5.225
0,91	0,83	0,78	534 (240/635; 14) ★★	7.176
1,17	0,63	0,25	512 (434/638; 5)	1.209
1,39	0,73	0,55	418 (382/570; 16) ★	6.008

Trockengewicht der Imagines

Das Trockengewicht der Imagines wird in den Vorexperimenten nur im TBT-Experiment gemessen. Für die Männchen wird eine Normalverteilung festgestellt, während für die Weibchen eine deutliche Abweichung von der Gaußschen Glockenkurve zu beobachten ist. Die männlichen Imagines der Lösemittelkontrolle weisen das höchste mittlere Durchschnittsgewicht mit 0,40 mg auf. Im Gegensatz dazu werden signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, Dunnett's post test) leichtere männliche Imagines (0,34 mg) bei der höchsten TBT-Konzentration im Vergleich zur LMK festgestellt. Die medianen Trockengewichte der Weibchen schwanken zwischen 0,38 (5,58 $\mu\text{g Sn/kg TG}$) und 0,61 mg (11,2 $\mu\text{g Sn/kg TG}$), und es wird kein Einfluss der Testsubstanz auf diesen Endpunkt ermittelt.

Populationswachstumsrate

Die Populationswachstumsrate (PWR) wird in beiden Experimenten mit steigenden Konzentrationen kontinuierlich geringer (Abb. 8), wobei eine signifikante Konzentrations-Wirkungsbeziehung berechnet wird (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$). Die höchsten PWR werden in den LMK mit $1,22 \text{ d}^{-1}$ im TBT-Experiment und mit $1,26 \text{ d}^{-1}$ im Cd-Experiment ermittelt. Im Vergleich dazu führt die Exposition gegenüber der höchsten TBT-Konzentration zu einer deutlich niedrigeren PWR von $1,06 \text{ d}^{-1}$. Für Cd wird die niedrigste PWR mit $1,06 \text{ d}^{-1}$ bei einer Konzentration von $1,17 \text{ mg Cd/kg TG}$ ermittelt. Ähnlich wie bei den übrigen Endpunkten des Cd-Experimentes (z.B. Mortalität und EmT_{50}) wird eine Abweichung von der Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei der höchsten Cd-Konzentration festgestellt.

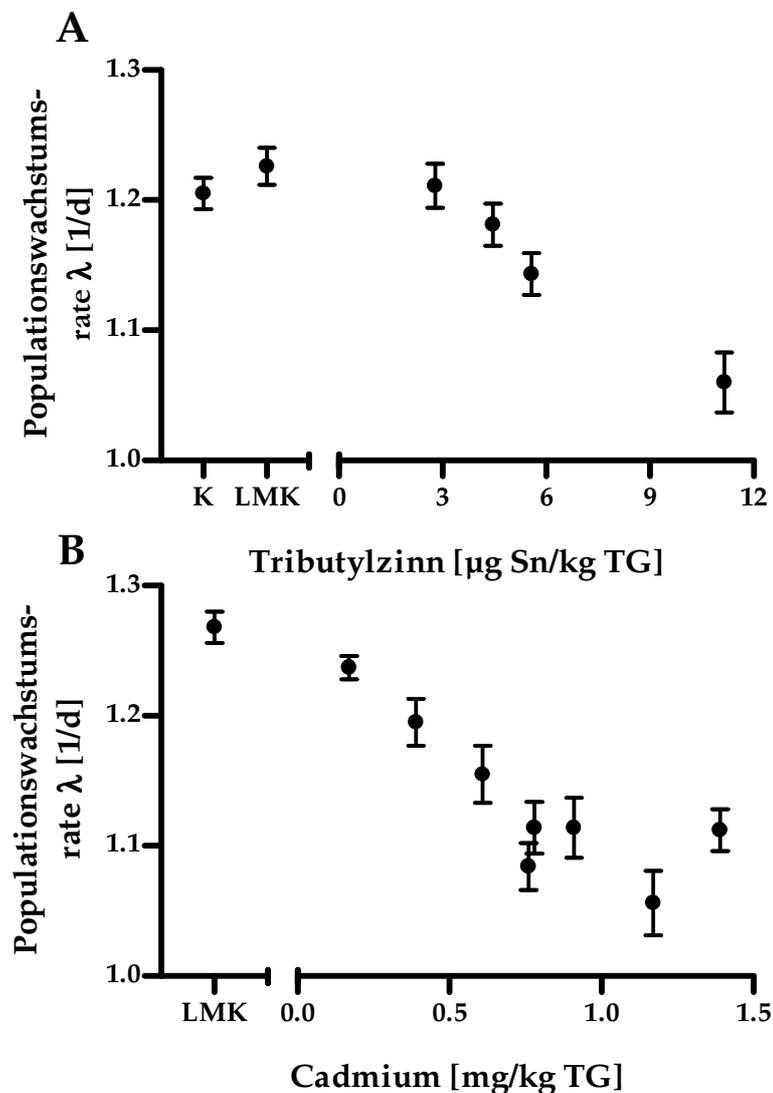


Abb. 8: Populationswachstumsrate ($\pm \text{SD}$, in d^{-1}) von *Chironomus riparius*, exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B). K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle.

3.3 Multigenerationsstudien mit *Chironomus riparius*

3.3.1 Multigenerationsstudie mit 80 µg Sn/kg über elf Generationen (MGS I)

Die Multigenerationsstudie I wird über 11 Generationen mit den beiden Populationen GEN+ und GEN- durchgeführt (VOGT et al., 2007b).

Rückstandsanalytik

Nach einer Stunde wird bei dem gewählten Testdesign (50 Tiere, 1 L rekonstituiertes Wasser, Futter etc.) eine TBT-Sedimentkonzentration von 8,7 µg TBT/kg TG analytisch nachgewiesen (Tab. 13), was ca. 5% der ausgewählten Nominalkonzentration entspricht. Zu diesem Zeitpunkt sind keine TBT-Metaboliten im Testsystem festzustellen. Ein leicht erhöhter Wert wird nach einer Testdauer von 72 h mit 10,0 µg TBT/kg TG gemessen. Vor dem Schlupf der Imagines (336 h) fällt die TBT-Konzentration auf ca. 40%, wobei 4,1 µg TBT/kg TG gemessen werden. Neben TBT werden außerdem für die Messungen nach 72 und 336 h zwei TBT-Abbauprodukte, Di- und Monobutylzinn, in Spuren nachgewiesen. Die mittlere zeitlich gewichtete TBT-Testkonzentration wird mit einem Wert von 4,46 µg Sn/kg TG nach der OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998) berechnet.

Tab. 13: Ergebnisse der Rückstandsanalytik für den Quarzsand und die Organozinnverbindungen (Mono-, Di- und Tributylzinn) der TBT-Behandlungen nach einer Testdauer von 1, 72 und 336 h in der Multigenerationsstudie I (dargestellt als Konzentration der Verbindung und als Sn/kg TG). Die eingesetzte Nominalkonzentration ist 80 µg als Sn bzw. 195 µg als TBT/kg TG. Die Rückstandsanalysen werden in Anlehnung an die DIN-Norm 19744 durchgeführt (Nachweisgrenze < 1 µg OZV/kg TG).

Organozinnverbindung [als Verbindung (als Sn) in µg/kg TG]	1 h	72 h	336 h
Monobutylzinn	< 1	1,3 (0,9)	4,6 (3,1)
Dibutylzinn	< 1	1,1 (0,6)	1,0 (0,5)
Tributylzinn	8,7 (3,6)	10,0 (4,1)	4,1 (1,7)

Mortalität

Die Mortalität schwankt in allen vier Behandlungsgruppen stark, vor allem bei GEN- (Abb. 9). In der GEN+LMK wird eine Mortalität zwischen 11 und 48% beobachtet. Ähnliche Schwankungen werden auch für GEN+TBT festgestellt. In dieser Population liegt die Mortalität zwischen 12 und 37%, mit Ausnahme der vierten Generation.

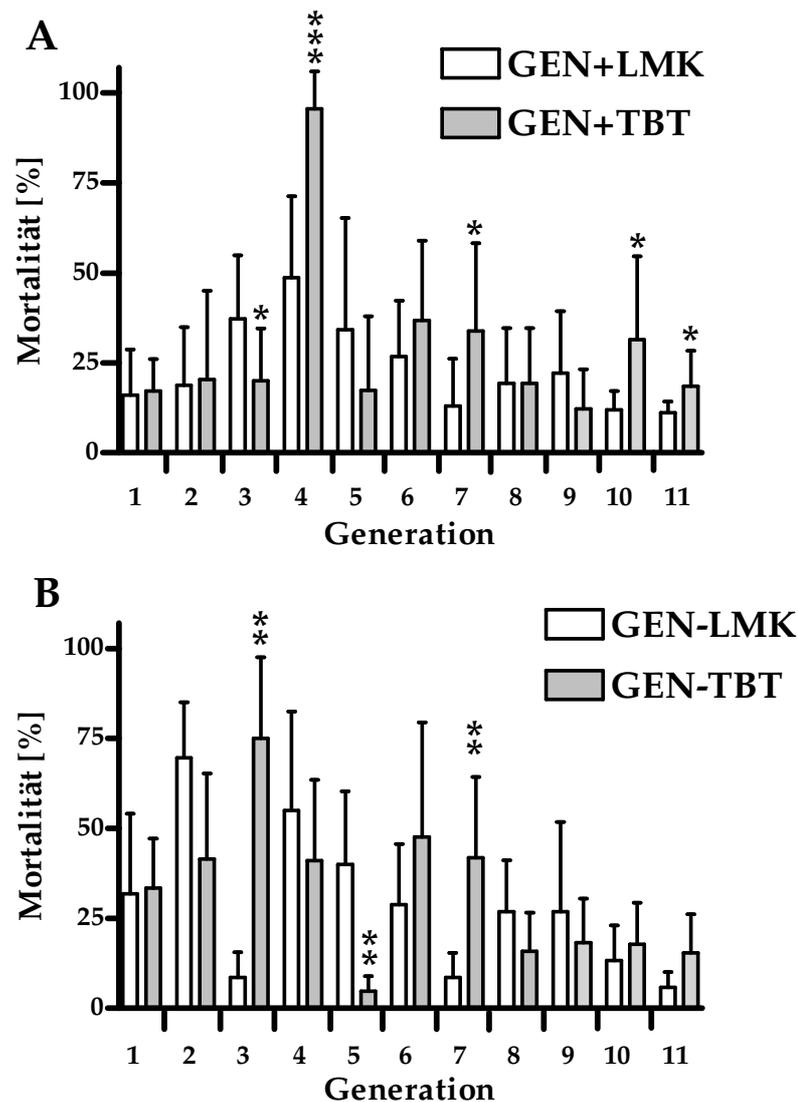


Abb. 9: *Chironomus riparius*. Mortalität (MW \pm SD, in %) der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 $\mu\text{g Sn/kg TG}$. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$, $\star\star\star p < 0,001$, $n = 6-10$).



In der vierten Generation wird eine außergewöhnlich hohe Mortalität von 96% ermittelt, und die Multigenerationsstudie kann nur mit Gelegen aus einer Absicherungszucht fortgeführt werden. Bei GEN schwankt die Mortalität in der LMK zwischen 6 und 70% und in der TBT-Behandlung zwischen 5 und 75%. Im Allgemeinen kann allerdings festgestellt werden, dass die Mortalität (\pm SD) über alle Generationen für GEN+LMK 24% (\pm 19,9%) beträgt. Für GEN+TBT wird eine leicht erhöhte durchschnittliche Mortalität über alle elf Generationen von 31% (\pm 28,6%) berechnet.

GEN- weist über alle Generationen mittlere Mortalitäten von 28 (\pm 25,1%, GEN-LMK) und 31% (\pm 24,9%, GEN-TBT) auf. Daraus folgend ergeben sich bei der gewählten Konzentrationen innerhalb der gesamten Studie keine Hinweise auf eine akute Toxizität. Signifikant ($p < 0,05$, t-Test) erhöhte Mortalitäten im Vergleich zur LMK werden für GEN+TBT Population in den Generationen vier, sieben, zehn und elf festgestellt, während im Gegensatz dazu die Mortalität bei GEN+LMK in der dritten Generation signifikant ($p < 0,05$, t-Test) höher ist als die der TBT-Behandlung. Für GEN- sind signifikant ($p < 0,05$, t-Test) erhöhte Mortalitäten in den Generationen drei und sieben der TBT-Exposition im Vergleich zur LMK festzustellen. Ähnlich wie bei GEN+ wird auch hier in einer Generation (fünf) eine signifikant ($p < 0,01$, t-Test) niedrigere Mortalität nach TBT-Exposition im Vergleich zur LMK festgestellt.

Mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT_{50}) und Weibchenanteil

TBT verzögert den mittleren Emergenzzeitpunkt der Tiere in beiden Populationen (GEN+ & GEN-) bis zur vierten Generation, wobei signifikant ($p < 0,05$, t-Test) verspätete mittlere Schlupfzeitpunkte in den Generationen eins und drei bei GEN+ und in den Generationen eins, zwei und vier bei GEN- ermittelt werden (Abb. 10). Ab der fünften Generation wird der verzögernde Effekte auf den Schlupf der Tiere nicht mehr beobachtet, und die Imagines der TBT-Behandlung schlüpfen sogar in der achten (GEN+TBT) sowie in der zehnten (GEN-TBT) Generation signifikant ($p < 0,05$, t-Test) früher als die Tiere der LMK.

Weiterhin werden in der MGS I, wie bereits im Vorexperiment beobachtet, keine signifikanten ($p > 0,05$, Fishers Exakt-Test) Unterschiede des Weibchenanteils festgestellt. Dieser Parameter schwankt für beide Behandlungsgruppen von GEN+ stets zwischen 0,44 und 0,53. Für GEN- werden Werte zwischen 0,36 und 0,58 festgestellt. Bei der Betrachtung des mittleren Weibchenanteil (\pm SD) über alle Generationen werden für

GEN+ Werte von $0,48 (\pm 0,03)$ für die LMK und $0,49 (\pm 0,02)$ für die TBT-Behandlung berechnet. Für GEN- beträgt der mittlere Weibchenanteil (\pm SD) $0,51 (\pm 0,03)$, GEN-LMK) und $0,47 (\pm 0,07)$, GEN-TBT).

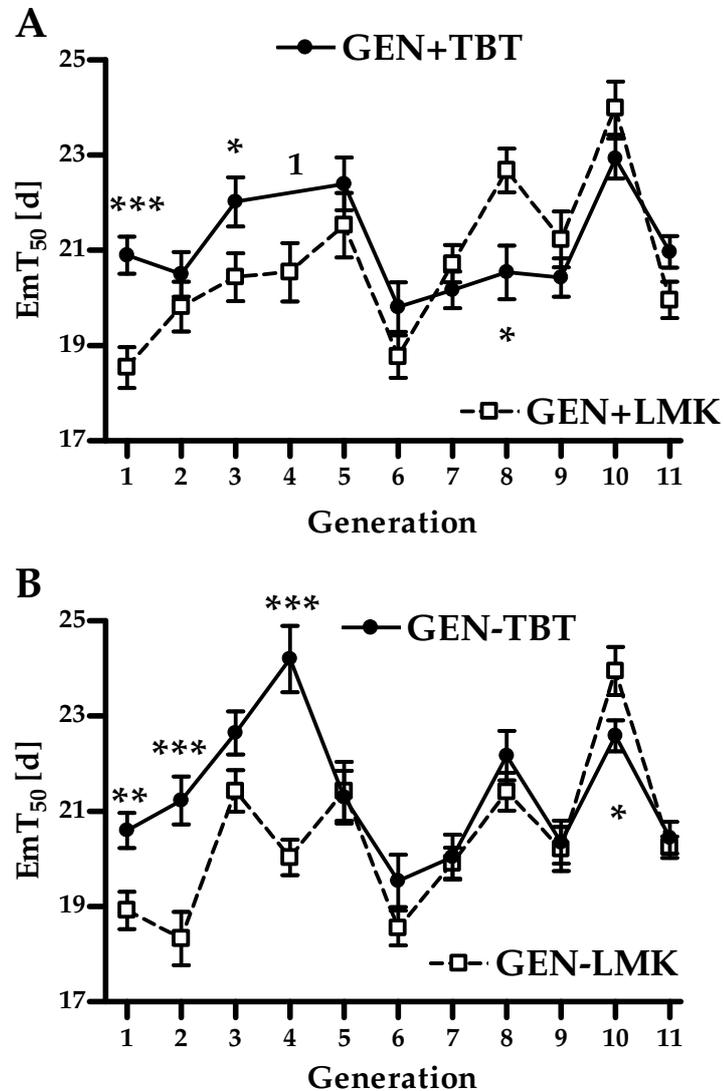


Abb. 10: *Chironomus riparius*. Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT_{50}) ($MW \pm SD$, in d) der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von $4,46 \mu\text{g Sn/kg TG}$. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittekontrolle (LMK) bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6-10$). ¹ EmT_{50} aufgrund von zu hoher Mortalität ($> 80\%$) nicht kalkulierbar.

Reproduktion

Die Anzahl an Gelegen pro Weibchen schwankt über alle Generationen von GEN+LMK zwischen $0,76$ und $1,26$ (Tab. 14) und in GEN+TBT zwischen $0,75$ und $1,35$.



In GEN+LMK werden in vier der elf Generationen mehr als ein Gelege pro Weibchen produziert. Im Vergleich dazu fördert TBT die Reproduktion, da in neun der elf Generationen die Weibchen mehr als ein Gelege produzieren (GEN+TBT). Für GEN- variiert die Anzahl an Gelegen pro Weibchen zwischen 0,40 und 1,27 bei GEN-LMK und zwischen 0,18 und 0,98 bei GEN-TBT. Auffällig ist, dass besonders in den ersten Generationen geringe Gelegezahlen pro Weibchen in beiden Behandlungen beobachtet werden.

Die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen variiert bei GEN+LMK zwischen 0,62 und 1,22 (Tab. 14). Im Vergleich dazu schwankt dieser Parameter bei GEN+TBT zwischen 0,50 und 1,27. Für GEN-LMK werden Werte zwischen 0,08 und 1,11 festgestellt. Die Werte für GEN-TBT weisen im Allgemeinen einem deutlich niedrigeren Schwankungsbereich zwischen 0,01 und 0,70 auf. Auch hier ist besonders die niedrige Anzahl an fertile Gelegen pro Weibchen in den ersten Generationen festzustellen.

In allen Generationen ist eine hohe Fertilität der produzierten Gelege festzustellen. Bei GEN+ werden mittlere Fruchtbarkeiten (\pm SD) von 84% (\pm 5,3%, GEN+LMK) und von 85% (\pm 9,3%, GEN+TBT) über alle Generationen festgestellt. In GEN- ist die Fertilität der Gelege im Allgemeinen deutlich geringer als bei GEN+, wobei Mittelwerte aller Generation von 75% (\pm 19,2%, GEN-LMK) und 44% (\pm 22,6%, GEN-TBT) berechnet werden. Weiterhin kann festgestellt werden, dass der Anteil fertiler Gelege an den gesamt produzierten Gelegen bei GEN+ in beiden Behandlungsgruppen in der ersten Generation am höchsten ist. In den folgenden Generationen nimmt dieser Anteil ab. Für GEN+TBT werden allerdings in den späteren Generationen wieder hohe Anteile an fertilen Gelegen mit mehr als 90% beobachtet (Generationen sieben, neun und elf). Bei GEN- verhält sich dieser Zusammenhang umgekehrt, wobei in den ersten Generationen beider Behandlungsgruppen niedrige Werte festgestellt werden. Im Verlauf des Experimentes stabilisiert sich die Zahl an fertilen Gelegen pro Weibchen auf einem moderaten Niveau ($>$ 50%).

Aufgrund der einfachen Replikation (nur ein Reproduktionsbehälter pro Population) können keine Signifikanzen für die Anzahl an Gelegen pro Weibchen zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen berechnet werden.

Tab. 14: Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung der jeweiligen Populationen (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation) in der Multigenerationsstudie I.

Generation/ Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gelege pro Weibchen (gesamt)											
GEN+LMK	1,26	0,78	0,96	0,86	1,09	1,19	0,97	0,96	0,91	0,76	1,01
GEN+TBT	0,84	1,00	1,01	0,75	1,01	1,07	1,35	1,03	1,03	1,32	1,30
GEN-LMK	0,40	0,82	0,95	1,18	1,21	1,09	0,91	1,27	0,99	0,85	0,96
GEN-TBT	0,24	0,18	0,39	0,95	0,56	0,66	0,63	0,70	0,75	0,88	0,98
fertile Gelege pro Weibchen											
GEN+LMK	1,22	0,62	0,75	0,72	0,92	1,02	0,77	0,84	0,73	0,66	0,83
GEN+TBT	0,80	0,78	0,79	0,50	0,79	0,89	1,27	0,92	0,99	1,09	1,20
GEN-LMK	0,08	0,67	0,78	1,00	0,90	0,97	0,63	1,11	0,79	0,67	0,82
GEN-TBT	0,04	0,01	0,06	0,70	0,19	0,41	0,36	0,45	0,42	0,48	0,46

Die mediane Anzahl an Eiern pro Gelege variiert bei GEN+LMK zwischen 432 und 533 und bei GEN+TBT zwischen 450 und 600 (Ergebnisse nicht dargestellt). Signifikant ($p < 0,05$, U-Test) größere Gelege werden in den Generationen zwei, acht, neun und zehn festgestellt, wobei die Gelege in der TBT-Behandlung stets größer sind als in der LMK. Dieser Effekt wird auch in den Generationen sieben, acht, neun und zehn festgestellt, wenn nur die Größe der fertilen Gelege für die Auswertung herangezogen wird. In den genannten Generationen legen die Weibchen der TBT-Behandlung signifikant ($p < 0,05$, U-Test) größere fertile Gelege als in der LMK.

Für GEN- werden ähnliche Schwankungen der medianen Gelegegrößen festgestellt. Sie betragen bei GEN-LMK zwischen 406 und 592, bei GEN-TBT zwischen 364 und 525 (Ergebnisse nicht dargestellt). In der ersten Generation weist GEN- ein ähnliches Bild wie GEN+ auf, da die Gelege von GEN-TBT signifikant ($p < 0,05$, U-Test) größer sind als die von GEN-LMK. In den weiteren Generationen wird allerdings ein umgekehrtes Phänomen beobachtet, wobei die Gelege in den Generationen zwei, vier, fünf, sechs und acht bei TBT-Exposition signifikant ($p < 0,05$, U-Test) kleiner sind als bei GEN-LMK. Die Ergebnisse für die kleineren Gelegegrößen werden bestätigt, wenn nur die fertilen Gelege für die Auswertung betrachtet werden. So sind die fertilen Gelege



von GEN-TBT in den Generationen vier, acht und neun signifikant ($p < 0,01$, U-Test) kleiner als bei GEN-LMK.

Trockengewicht der Imagines

Für GEN+LMK wird ein mittleres Trockengewicht der Männchen zwischen 0,31 und 0,37 mg und für GEN+TBT zwischen 0,34 und 0,38 mg festgestellt (Abb. 11A). Die TBT-Belastung führt in acht der elf Generation zu einem signifikant ($p < 0,05$, t-Test) höheren Trockengewicht der Männchen im Vergleich zu den Männchen aus GEN+LMK. Betrachtet man das mittlere Trockengewicht der Männchen über alle Generationen, so sind die Tiere aus GEN+LMK ($0,34 \pm 0,001$ mg) signifikant ($p < 0,001$, t-Test) leichter als die Tiere aus GEN+TBT ($0,37 \pm 0,001$ mg). Die Weibchen aus GEN+ weisen diesen TBT-Effekt nicht in gleichem Umfang wie die Männchen auf, allerdings können in sechs der elf Generation (zwei, drei, fünf, acht, neun und zehn) signifikant ($p < 0,05$, U-Test) schwerere Tiere ermittelt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). In den anderen Generationen kann kein Unterschied zwischen den LMK und den TBT-Behandlungen festgestellt werden.

Für die Männchen von GEN- und GEN+ werden vergleichbare mittlere Trockengewichte festgestellt, wobei die Effekte der TBT-Exposition nicht so homogen sind wie bei GEN+ (Abb. 11B). Signifikant ($p < 0,01$, t-Test) schwerere Männchen werden bei GEN-TBT in drei Generationen (eins, sieben und neun) im Vergleich zu GEN-LMK festgestellt. Ein konträres Bild ergibt sich in den Generationen drei, vier, fünf, sechs und neun, wobei die Männchen aus GEN-TBT signifikant ($p < 0,01$, t-Test) leichter sind als die aus GEN-LMK Population. Für GEN- kann festgestellt werden, dass diese Männchen bei TBT-Belastung im Mittel über alle Generationen signifikant ($p < 0,001$, t-Test) leichter sind als die Männchen aus GEN-LMK (GEN-LMK $0,36 \pm 0,001$ mg, GEN-TBT $0,34 \pm 0,001$ mg).

Für die Weibchen werden ähnliche Ergebnisse wie im Experiment mit GEN+ festgestellt, so sind die Weibchen der TBT-Behandlung in den Generationen vier, fünf, sechs, sieben und zehn signifikant ($p < 0,05$, U-Test) schwerer als die Weibchen der Kontrollgruppe.

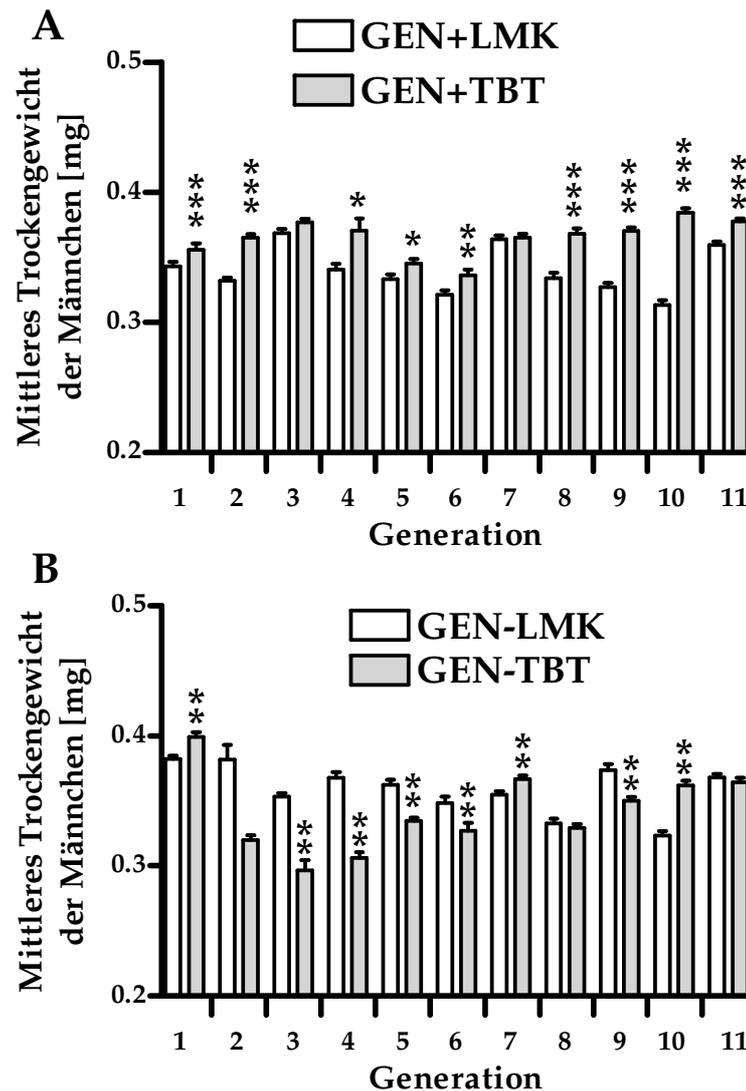


Abb. 11: *Chironomus riparius*. Trockengewicht (MW \pm SD, in mg) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 $\mu\text{g Sn/kg TG}$. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$, $\star\star\star p < 0,001$, $n = 17-180$).

Populationswachstumsrate (PWR)

Für die PWR werden Werte zwischen 1,22 und 1,31 d^{-1} für GEN+ ermittelt (Abb. 12A), wobei die PWR in den jeweiligen Generationen zwischen den beiden Behandlungsgruppen annähernd gleich sind. Für GEN+TBT wird anhand der PWR nur in der ersten Generation ein Einfluss auf die Entwicklung und Reproduktion erkennbar, da in dieser Generation GEN+LMK eine höheren PWR mit 1,29 d^{-1} im Vergleich zu GEN+TBT mit 1,26 d^{-1} aufweist. In den folgenden Generationen (zwei bis sechs) nähern

sich die PWR an und sind nahezu identisch. In den Generationen sieben bis zehn wird ein umgekehrter Trend im Vergleich zur ersten Generation beobachtet, wobei die PWR für GEN+TBT größer sind als für GEN+LMK. In der letzten Generation sind die PWR beider Behandlungsgruppen wieder auf dem gleichen Niveau.

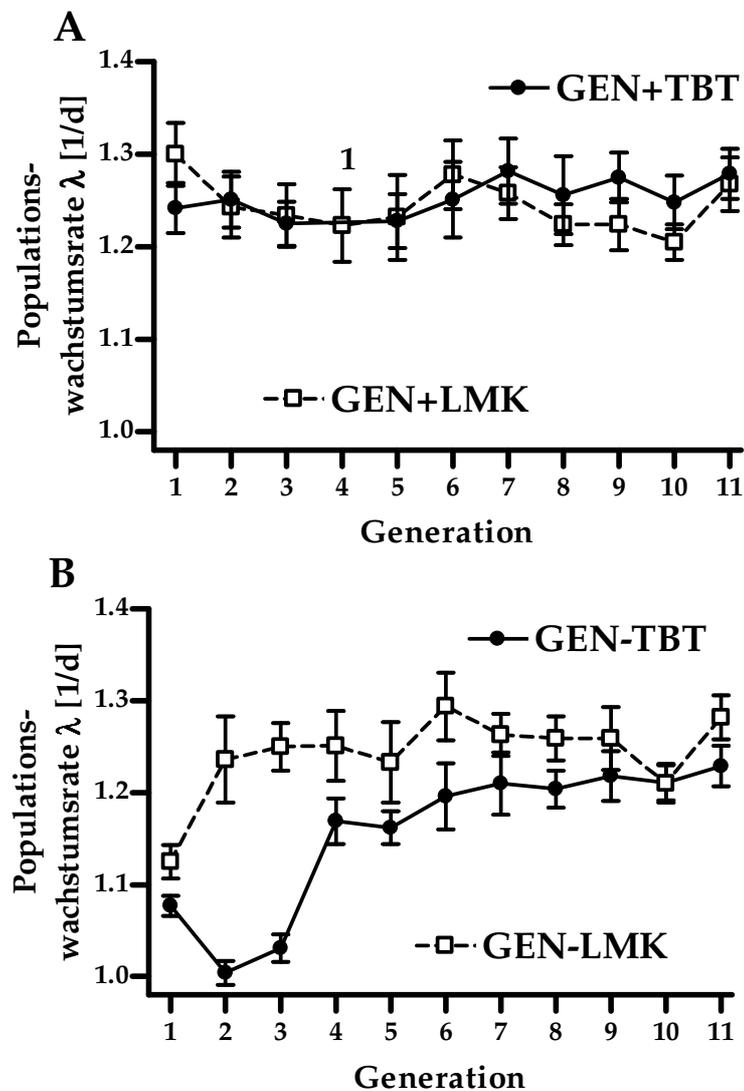


Abb. 12: *Chironomus riparius*. Populationswachstumsrate (\pm SD, in d^{-1}) der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von $4,46 \mu\text{g Sn/kg TG}$ (LMK – Lösemittelkontrolle). ¹ Populationswachstumsrate wird aufgrund von zu hoher Mortalität ($> 80\%$) nicht berechnet.

Im Vergleich dazu weist GEN- besonders in der ersten Generation sehr niedrige PWR auf (GEN-LMK: $1,12 d^{-1}$ & GEN-TBT: $1,09 d^{-1}$). Im Verlauf des Experimentes fällt die PWR für GEN-TBT sogar in der zweiten Generation fast unter den kritischen Wert von $1,0 d^{-1}$ mit $1,004 d^{-1}$, während GEN-LMK kontinuierlich höhere PWR bis zur vierten



Generation erreicht. Dabei fällt auf, dass die PWR für GEN-TBT sprunghaft zwischen der dritten und vierten Generation ansteigt. Im weiteren Experiment liegen die PWR für GEN-TBT, mit Ausnahme der zehnten Generation, stets unter den Werten von GEN-LMK.

Genetische Analysen

Die genetische Diversität von GEN+ wird in der Ausgangspopulation und in acht der elf durchgeführten Generationen innerhalb der Multigenerationsstudie ermittelt. Alle Genorte zeigen eine hohe Variabilität für GEN+ (Abb. 13A). Am Mikrosatellitenloкус vier wird in den letzten beiden untersuchten Generationen von GEN+TBT keine Variabilität mehr beobachtet, da ein Allel nicht nachgewiesen werden kann. Während die genetische Variabilität von GEN+LMK über den Verlauf der Studie langsam fällt, wird bei GEN+TBT keine Reduktion der Diversität beobachtet. Die erwartete Heterozygotie liegt stets zwischen 0,43 und 0,52 für GEN+LMK und zwischen 0,51 und 0,57 für GEN+TBT. Die genetische Diversität der GEN+LMK ist stets niedriger als bei GEN+TBT. Auffällig ist auch der plötzliche Abfall der genetischen Diversität zwischen der Ausgangspopulation und der ersten Generation, welcher in beiden Behandlungsgruppen von GEN+ zu beobachten ist.

Bei GEN- wird die genetische Diversität in der Ausgangspopulation und in sieben der elf untersuchten Generationen untersucht (Abb. 13B). Im Allgemeinen wird für diese Populationen eine deutlich niedrigere genetische Diversität als bei der Mischpopulation festgestellt. So ist GEN- mit der angewandten Messmethode keine Heterozygotie nachweisbar, und alle untersuchten Genorte liegen homozygot vor. Gleiches ist ebenso in beiden GEN- der ersten Generation zu beobachten. Im Verlauf der MGS kommt es allerdings in beiden Behandlungsgruppen zu einem Anstieg der Heterozygotie. Die Heterozygotie steigt bei GEN-LMK in der zweiten und in der GEN-TBT in der fünften Generation sprunghaft an. Der Anstieg der Heterozygotie setzt sich bei GEN-LMK bis zur dritten Generation fort, und anschließend werden annähernd konstante Werte um 0,25 gemessen. In GEN-TBT steigt die Heterozygotie ebenso bis zur achten Generation an, und am Ende der MGS wird eine Heterozygotie von 0,13 festgestellt.

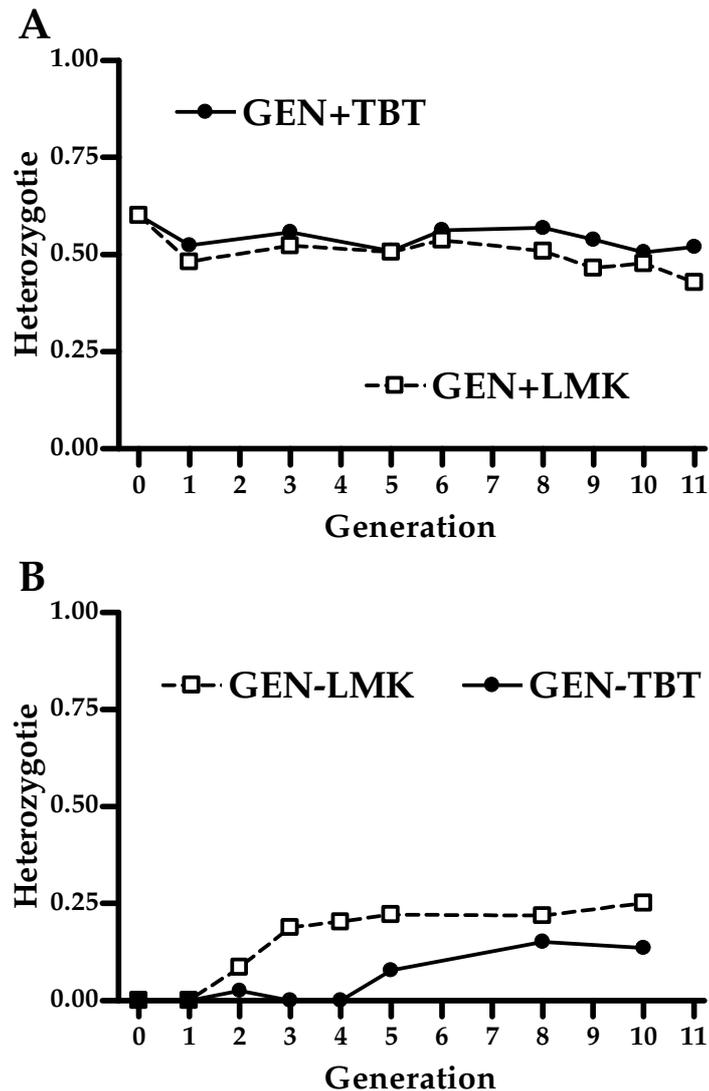


Abb. 13: *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46 $\mu\text{g Sn/kg TG}$ (LMK – Lösemittelkontrolle).

Bei GEN+LMK werden an allen fünf untersuchten Genorten signifikante ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) festgestellt (Tab. 15). Während für GEN+LMK nur ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, χ^2 -Test, Locus 1 in der achten Generation) ermittelt wird, werden bei GEN+TBT zehn signifikante ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Abweichungen vom HWG über alle fünf Mikrosatellitenmarker festgestellt. In der ersten Generationen befinden sich die Abweichungen vom HWG hauptsächlich an den Mikrosatelliten drei, vier und fünf. In den folgenden Generationen beschränken sich die Abweichungen hauptsächlich auf den ersten und zweiten Locus.

Tab. 15: *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitenorte für die Mischpopulation (GEN+) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie I (Gen. – Generation, Beh. – Behandlung). Signifikante Abweichungen werden mittels χ^2 -Test bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$, $\star\star\star p < 0,001$).

Gen.	Beh.	Mikrosatelliten				
		Lokus 1	Lokus 2	Lokus 3	Lokus 4	Lokus 5
0		0,81 $\star\star\star$	0,63 \star	0,68 $\star\star$	0,38 $\star\star\star$	0,50
1	LMK	0,62	0,53	0,59	0,21	0,45
	TBT	0,52	0,70	0,67 $\star\star\star$	0,09 \star	0,64 \star
3	LMK	0,71	0,44	0,60	0,36	0,51
	TBT	0,73 \star	0,68	0,61	0,12	0,61
5	LMK	0,77	0,45	0,59	0,33	0,40
	TBT	0,78	0,61 $\star\star\star$	0,62	0,08	0,46
6	LMK	0,76	0,58	0,63	0,22	0,49
	TBT	0,75 \star	0,67	0,67	0,07	0,65
8	LMK	0,82 \star	0,47	0,58	0,21	0,47
	TBT	0,77	0,64 $\star\star\star$	0,67	0,09 $\star\star\star$	0,66
9	LMK	0,80	0,46	0,45	0,03	0,59
	TBT	0,80 \star	0,49	0,68	0,04	0,69
10	LMK	0,81	0,35	0,53	0,18	0,52
	TBT	0,77	0,54	0,64	0,00	0,58
11	LMK	0,77	0,22	0,53	0,19	0,44
	TBT	0,76 $\star\star$	0,69	0,64	0,00	0,52

Im Vergleich zu GEN+ werden bei GEN- nur am fünften Locus signifikante ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Abweichungen vom HWG ermittelt (Tab. 16). Dies wird bei GEN-LMK in der achten Generation und bei GEN-TBT in der zehnten Generation beobachtet. Sowohl bei GEN-LMK als auch bei GEN-TBT treten der zweite und vierte Mikrosatellitenlocus fast ausschließlich homozygot auf, und die ermittelte genetische Variabilität beruht in Folge dessen, besonders in den späteren Generationen, auf den ersten, dritten und fünften Mikrosatellitenmarker.

Tab. 16: *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitengenorte für die Laborzuchtpopulation (GEN-) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie I (Gen. – Generation, Beh. - Behandlung). Signifikante Abweichungen werden mittels χ^2 -Test bestimmt ($\star p < 0,05$).

Gen.	Beh.	Mikrosatelliten				
		Lokus 1	Lokus 2	Lokus 3	Lokus 4	Lokus 5
0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	LMK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	TBT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	LMK	0,00	0,00	0,14	0,00	0,14
	TBT	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00
3	LMK	0,37	0,00	0,38	0,00	0,31
	TBT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	LMK	0,41	0,00	0,38	0,00	0,37
	TBT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	LMK	0,40	0,00	0,32	0,00	0,50
	TBT	0,00	0,00	0,24	0,00	0,11
8	LMK	0,50	0,02	0,41	0,00	0,38 \star
	TBT	0,00	0,07	0,42	0,00	0,35
10	LMK	0,51	0,00	0,38	0,00	0,41
	TBT	0,03	0,00	0,43	0,00	0,41 \star

Anpassungsexperimente

Die Akuttests zeigen für beide Behandlungsgruppen von GEN+ in den Generationen drei, fünf und acht annähernd gleiche LC_{50} -Werte (Tab. 17), wobei diese zwischen 14,5 und 26,1 $\mu\text{g Sn/L}$ bei GEN+LMK und zwischen 15,1 und 21,3 $\mu\text{g Sn/L}$ bei GEN+TBT schwanken. Im Gegensatz dazu werden signifikant unterschiedliche LC_{50} -Werte (Global-Fitting, $p < 0,001$) zwischen GEN+LMK und GEN+TBT in den Generationen neun und zehn beobachtet. In diesen Generationen sind die L1-Larven, die aus der vorbelasteten Behandlungsgruppe (GEN+TBT) stammen, weniger sensitiv gegenüber TBT. In der Generation neun ist die TBT-vorbelastete Population viermal und in der zehnten Generation sogar achtmal unempfindlicher gegenüber TBT als die Lösemittelkontrolle (GEN+LMK).

Für GEN- werden in den Akuttests ähnliche LC_{50} -Werte wie für GEN+ ermittelt. Die

LC₅₀-Werte der GEN-LMK liegen zwischen 12,6 und 31,2 µg Sn/L und die der GEN-TBT zwischen 13,7 und 28,9 µg Sn/L. Zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen werden allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Tab. 17: Berechnete LC₅₀-Werte (\pm SD; *n*) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) für die Anpassungsexperimente der Multigenerationsstudie I (sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg, Global-Fitting (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004; ★★★ *p* < 0,001).

Generation	Behandlung	GEN+ Population	GEN- Population
Akuttests mit L1-Larven [µg Sn/L]			
3	LMK	21,8 (\pm 1,19; 4)	-
	TBT	16,9 (\pm 1,12; 4)	-
5	LMK	26,1 (\pm 14,5; 4)	24,8 (\pm 1,72; 4)
	TBT	21,3 (\pm 1,61; 4)	13,7 (\pm 1,22; 4)
8	LMK	14,5 (\pm 1,03; 4)	12,6 (\pm 1,64; 4)
	TBT	15,1 (\pm 1,16; 4)	24,7 (\pm 1,13; 4)
9	LMK	14,1 (\pm 1,13; 4)	31,2 (\pm 1,18; 4)
	TBT	51,1 (\pm 1,19; 4) ★★★	25,3 (\pm 1,20; 4)
10	LMK	7,51 (\pm 1,15; 4)	25,5 (\pm 1,30; 4)
	TBT	51,1 (\pm 1,19; 4) ★★★	28,9 (\pm 1,19; 4)
Life-Cycle-Experimente [µg Sn/kg TG] (mittlere zeitlich gewichtete Konz.)			
11	LMK	6,74 (\pm 1,23; 3)	7,09 (\pm 1,15; 3)
	TBT	7,95 (\pm 1,03; 3)	10,1 (\pm 1,47; 3)

Im chronischen Anpassungstest nach elf Generationen liegen die LC₅₀-Werte auf dem Niveau, das bereits im Vorexperiment (LC₅₀-Wert: 8,27 µg Sn/kg TG) ermittelt wird. Für GEN+LMK ein LC₅₀-Wert von 6,74 µg Sn/kg TG berechnet. Für GEN+TBT ist der LC₅₀-Wert mit 7,95 µg Sn/kg TG höher, und die Tiere der TBT-vorbelasteten Population sind, wie bereits in den Akuttests beobachtet, unempfindlicher gegenüber dem Stressor TBT. Dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch nachweisbar (*p* > 0,05, Global-Fitting). Für GEN- werden bei den chronischen Anpassungstests ähnliche LC₅₀-Werte wie für beide GEN+ ermittelt. GEN-LMK weist dabei einen LC₅₀-Wert von 7,09 µg Sn/kg TG und die TBT vorbelastete Population (GEN-TBT) einen LC₅₀-Wert von 10,1 µg Sn/kg TG auf. Auch in diesen beiden Behandlungsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (*p* > 0,05, Global-Fitting).



3.3.2 Mehrgenerationenstudie mit 120 µg Sn/kg über zwei Generationen (MGS II)

Die Mehrgenerationenstudie II wird über zwei aufeinander folgende Generationen mit den beide Populationen GEN+ und GEN- durchgeführt.

Rückstandsanalytik

In der MGS II wird aufgrund der Kürze der Studie (zwei Generationen) keine Rückstandsanalytik durchgeführt. Die zeitlich gewichtete, mittlere Testkonzentration wird in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998) mittels linearer Regression, basierend auf den zuvor berechneten zeitlich gewichteten, mittleren TBT-Testkonzentrationen (4,46 und 8,93 µg Sn/kg TG) mit 6,69 µg Sn/kg TG ermittelt.

Mortalität

Die Mortalität ist nach TBT-Exposition stets höher als in den Kontrollgruppen (Tab. 18). Dieser Unterschied trifft für beide Populationen zu, und in der zweiten Generation von GEN+ ist die Mortalität mit 41,0% signifikant ($p < 0,01$, t-Test) höher. Im Vergleich dazu wird in der Lösemittelkontrolle eine Mortalität von 9,4% beobachtet. Betrachtet man die mittlere Mortalität über alle Generationen der MGS II, wird ebenfalls ein signifikanter ($p < 0,05$, t-Test) Unterschied für GEN+ (GEN+LMK, $12,9 \pm 2,36\%$, GEN+TBT, $36,7 \pm 6,86\%$) festgestellt. Für GEN- wird hingegen keine signifikant unterschiedliche Mortalität zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt ($p > 0,05$, t-Test).

Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT_{50}) und Weibchenanteil

TBT verzögert, wie bereits im Vorexperiment beobachtet, die mittlere Emergenzzeit der Tiere von GEN+. Auch in der ersten Generation von GEN- kann diese Wachstumsverzögerung bei TBT-Exposition beobachtet werden. In der zweiten Generation der GEN- wird allerdings ein umgekehrter Effekt beobachtet, da die Tiere in GEN-TBT eher schlüpfen als die der Lösemittelkontrolle. Im Allgemeinen werden allerdings keine signifikanten Effekte der TBT-Exposition auf den Emergenzzeitpunkt ermittelt ($p > 0,05$, t-Test).

In der MGS II werden keine signifikanten ($p > 0,05$, t-Test) TBT-Effekte auf den Weibchenanteil von GEN+ beobachtet (Tab. 18). Bei GEN- wird im Gegensatz dazu ein signifikanter ($p < 0,05$, t-Test) Unterschied in der zweiten Generation festgestellt, wobei der Weibchenanteil bei GEN-TBT (0,55) im Vergleich zu GEN-LMK (0,50) signifikant ($p < 0,05$, t-Test) höher ist.

Tab. 18: *Chironomus riparius*. Endpunkte des Mehrgenerationenexperimentes II mit der Mischpopulation (GEN+) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 6,69 µg Sn/kg TG über zwei Generationen (LMK – Lösemittelkontrolle, Gen. - Generation). Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und der LMK ermittelt (★ p < 0,05, ★★ p < 0,01). Alle Angaben sind ± SEM und basieren auf zwei Replikaten (n = 2).

Endpunkt	Gen.	GEN+ Population		GEN- Population	
		LMK I/II	TBT I/II	LMK I/II	TBT I/II
Mortalität [%]	1	16,4 (± 2,43)	31,7 (± 15,4)	9,81 (± 6,48)	24,1 (± 9,86)
	2	9,43 (± 1,12)	41,0 (± 1,00) ★★	15,9 (± 2,15)	42,0 (± 9,71)
EmT ₅₀ [d]	1	21,0 (± 0,12)	24,3 (± 1,09)	19,7 (± 0,56)	20,8 (± 0,50)
	2	21,0 (± 0,27)	22,1 (± 0,79)	21,2 (± 0,49)	20,0 (± 0,79)
Weibchenanteil	1	0,50 (± 0,07)	0,51 (± 0,02)	0,50 (± 0,03)	0,50 (± 0,03)
	2	0,52 (± 0,01)	0,48 (± 0,06)	0,50 (± 0,01)	0,55 (± 0,01) ★
Gelege pro Weibchen (gesamt)	1	1,01 (± 0,11)	1,09 (± 0,21)	1,16 (± 0,02)	1,07 (± 0,05)
	2	0,94 (± 0,07)	1,23 (± 0,10)	1,12 (± 0,02)	1,23 (± 0,08)
Gelege pro Weibchen (fertil)	1	0,95 (± 0,17)	0,96 (± 0,29)	1,04 (± 0,04)	0,96 (± 0,07)
	2	0,77 (± 0,11)	1,14 (± 0,09)	1,01 (± 0,02)	1,14 (± 0,03)
Gelegegröße	1	480 (± 10,6)	460 (± 5,00)	518 (± 4,25)	541 (± 25,4)
	2	463 (± 14,1)	446 (± 14,3)	486 (± 4,90)	514 (± 12,5)
Gelegegröße (fertile Gelege)	1	488 (± 22,7)	527 (± 4,60)	462 (± 4,30)	555 (± 25,7)
	2	457 (± 19,2)	484 (± 7,80)	443 (± 17,6)	516 (± 8,45)

Reproduktion

In der Multigenerationsstudie II werden keine Unterschiede zwischen der Reproduktion der Tiere in den Lösemittelkontrollen und den jeweiligen TBT-Behandlungen ermittelt (Tab. 18). Die Gelegezahlen pro Weibchen sind, mit Ausnahme der zweiten Generation von GEN+LMK, stets höher als 1,0. Auch die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen liegt bei hohen Werten über 0,77 in beiden Populationen und Behandlungsgruppen. In dieser Studie werden keine TBT-Effekte auf die Gelegegröße beobachtet (Tab. 18). So schwankt dieser Parameter für beide Populationen zwischen 446 (GEN+LMK, Generation zwei) und 541 (GEN+TBT, Generation eins). Auf die Gelegegröße der fertilen Gelege werden ebenfalls keine Effekte der TBT-Belastung ermittelt.

Populationswachstumsrate (PWR)

Die PWR beider Populationen und Behandlungen liegen, ähnlich wie in den späteren Generationen der Multigenerationsstudie I, stets zwischen 1,2 und 1,3 d⁻¹ (Abb. 14). Weiterhin werden keine signifikanten TBT-Effekte auf die PWR festgestellt. Allein in der ersten Generation der GEN+TBT ist ein Trend zu einer niedrigeren PWR im Vergleich zur Lösemittelkontrolle festzustellen.

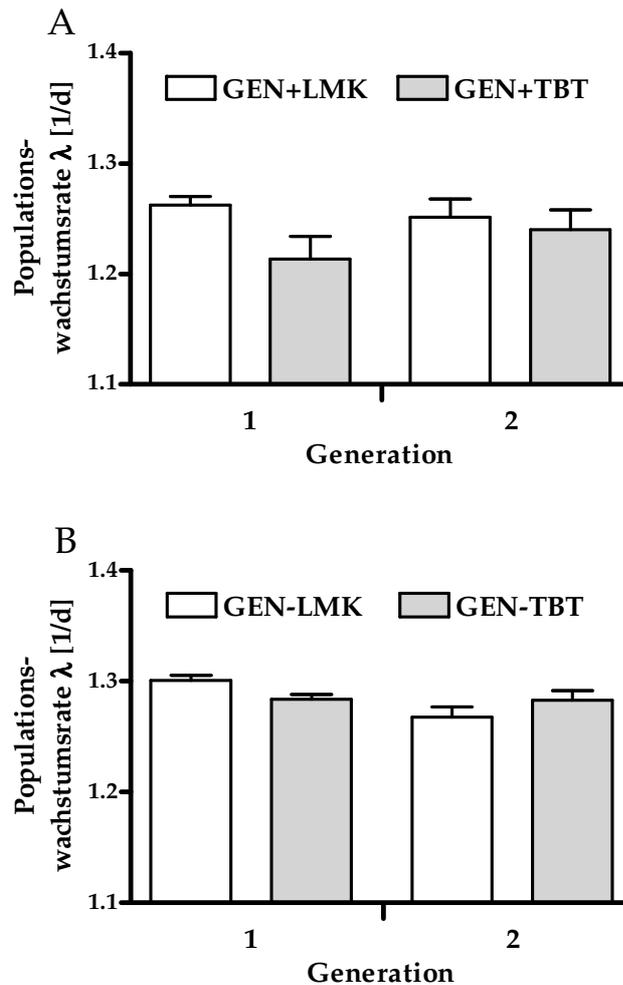


Abb. 14: *Chironomus riparius*. Populationswachstumsrate (MW ± SD, in d⁻¹) der Mischpopulation (GEN+) (A) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (B) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Konzentration von 6,69 µg Sn/kg TG (LMK – Lösemittelkontrolle).

Genetische Analysen

Die Heterozygotie der GEN+ fällt im Versuchsverlauf leicht ab. So beträgt die erwartete Heterozygotie am Ende der MGS I (Generation elf) 0,43 und nach den beiden Generationen der MGS II 0,39 (Mittelwert aus GEN+LMK I/II).

3.3.3 Multigenerationsstudie mit 160 µg Sn/kg über zwölf Generationen (MGS III)

Die dritte Mehrgenerationenstudie wird mit GEN+ über 12 Generationen durchgeführt. Außerdem wird zum Vergleich GEN- über vier Generationen gegenüber der erhöhten TBT-Konzentration exponiert. Für GEN- werden keine genetischen Analysen durchgeführt.

Rückstandsanalytik

Nach dem Spiken der Sedimente (inkl. EtOH-Evaporation) werden 13,6% (21,7 µg Sn/kg TG) der ausgewählten Nominalkonzentration von 160 µg Sn/kg TG analytisch bestimmt (Tab. 19). Nach einer Stunde verringert sich die TBT-Konzentration auf 9,8 µg Sn/kg TG. Zu diesem Zeitpunkt wird darüber hinaus ein Abbauprodukt (Dibutylzinn) in einer Konzentration von 1,1 µg Sn/kg TG nachgewiesen. Die TBT-Konzentration wird im Verlauf des Experimentes immer niedriger, und kurz vor dem Schlupf der adulten Tiere (nach 336 h) wird eine TBT-Konzentration von 2,8 µg Sn/kg TG gemessen. Zu diesem Zeitpunkt weist das Sediment ebenfalls eine erhöhte Konzentration an Monobutylzinn (8,1 µg Sn/kg TG) auf. Gemäß OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998) wird für die MGS III eine zeitlich gewichtete mittlere TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG berechnet.

Tab. 19: Ergebnisse der Rückstandsanalytik (Mono-, Di- und Tributylzinn) nach dem Spiken (inkl. EtOH abdampfen) der Sedimente und einer Testdauer von 1, 72 und 336 h in der Multigenerationsstudie III (dargestellt als Konzentration der Verbindung bzw. als Sn/kg TG). Die eingesetzte Nominalkonzentration ist 160 µg als Sn bzw. 390 µg als TBT/kg TG. Die Rückstandsanalytik wird in Anlehnung an die DIN-Norm 19744 (2003) durchgeführt (Nachweisgrenze < 1 µg OZV/kg TG).

Organozinnverbindung [als Verbindung (als Sn) in µg/kg TG]	nach dem Spiken			
	(inkl. Abdampfen EtOH)	1h	72 h	336 h
Monobutylzinn	< 1	< 1	6,3 (4,3)	12,0 (8,1)
Dibutylzinn	3,6 (1,8)	2,1 (1,1)	3,2 (1,6)	1,6 (0,8)
Tributylzinn	53,0 (21,7)	23,8 (9,8)	21,7 (8,9)	6,8 (2,8)

Mortalität

Die Mortalität zeigt in beiden Populationen große Schwankungen, ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten. Für GEN+LMK wird eine Mortalität zwischen 8 und 68% und für GEN+TBT zwischen 23 und 69% beobachtet. Ähnlich wie in der MGS I tritt auch in dieser Studie eine extreme Ausnahme auf, wobei GEN+TBT in der zehnten Generation eine Mortalität 100% aufweist (Abb. 15A). Auch in diesem Falle konnte die Studie nur über eine Absicherungspopulation weitergeführt werden.

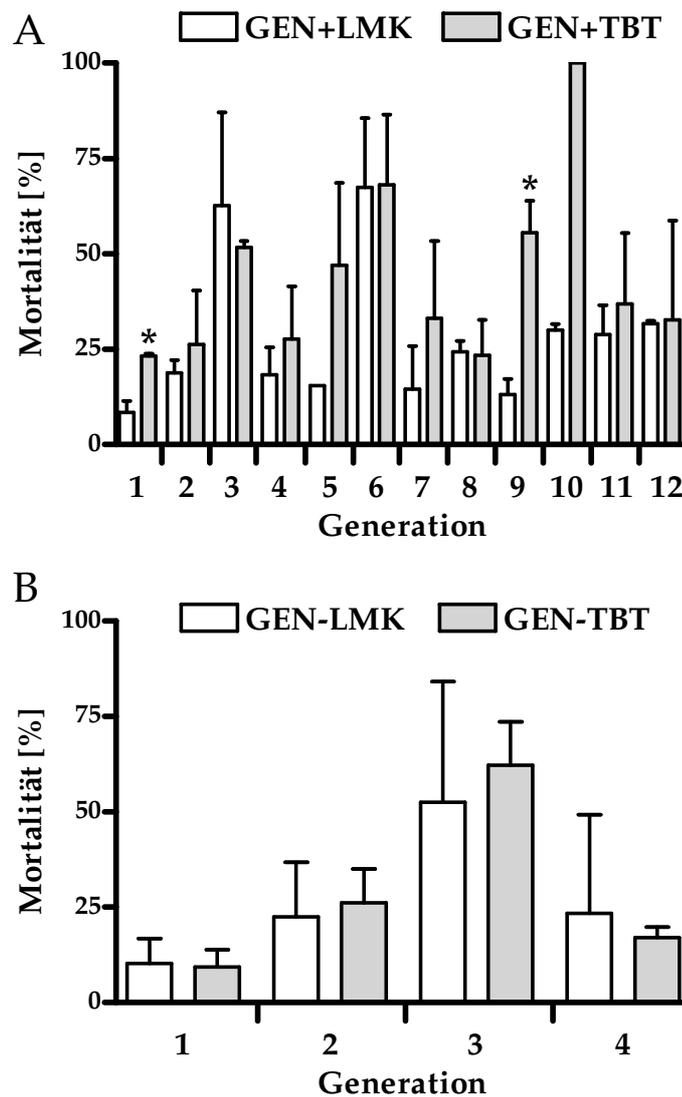


Abb. 15: *Chironomus riparius*. Mortalität (MW \pm SD, in %) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 $\mu\text{g Sn/kg TG}$. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ($\star p < 0,05, n = 2$).



Signifikant ($p < 0,05$, t-Test) erhöhte Mortalitäten für GEN+TBT werden im Vergleich zur Lösemittelkontrolle in den Generationen eins und neun festgestellt. Ähnliche variable Mortalitäten werden bei GEN- beobachtet, wobei die Mortalität in der GEN-LMK zwischen 10 und 52% und in der GEN-TBT zwischen 9 und 62% liegt (Abb. 15B). Für GEN- werden innerhalb der jeweiligen Generationen keine signifikanten ($p > 0,05$, t-Test) Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt.

Die mittlere Mortalität (\pm SD) beträgt über alle Generationen für GEN+LMK 28% ($\pm 4,01\%$). Im Vergleich dazu wird für GEN+TBT eine signifikant ($p < 0,05$, t-Test) höhere durchschnittliche Mortalität von 43,8% ($\pm 5,05\%$) über alle zwölf Generationen berechnet. Für GEN-LMK beträgt die durchschnittliche Mortalität (\pm SD) über die vier durchgeführten Generationen 27% ($\pm 8,28\%$) und für GEN-TBT 25% ($\pm 7,92\%$). Anhand dieser Ergebnisse kann die erhöhte Mortalität, die im Vorexperiment bei dieser Konzentration festgestellt wurde, für GEN- nicht bestätigt werden.

Mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT_{50}) und Weibchenanteil

TBT verzögert den mittleren Emergenzzeitpunkt beider GEN+ in allen Generationen der Multigenerationsstudie III, wobei signifikant verspätete EmT_{50} -Werte ($p < 0,05$, t-Test) in den Generationen zwei, drei, acht und neun ermittelt werden (Abb. 16A). Die Verzögerung tritt besonders in der achten und neunten Generation auf und kehrt nach dem Zusammenbruch in Generation zehn wieder auf ein ähnliches Niveau wie zu Beginn der Studie zurück.

Im Mittel beträgt der EmT_{50} -Wert für GEN+LMK über alle Generationen 20,8 Tage. Nach TBT-Exposition wird dieser signifikant ($p < 0,01$, t-Test) um ca. drei Tage verzögert, wobei ein mittlerer EmT_{50} -Wert von 23,4 Tagen festgestellt wird. Für GEN- werden ähnlich TBT-Effekte festgestellt, wobei der mittlere Emergenzzeitpunkt in allen vier Generationen verspätet ist (Abb. 16B). Für GEN-LMK wird im Mittel ein EmT_{50} -Wert von 19,4 Tagen festgestellt. Für GEN-TBT ist die Entwicklung der Tiere um ca. einen Tag verzögert (EmT_{50} -Wert = 20,3 d).

Wie schon in den Multigenerationsstudien zuvor, werden keine signifikanten Unterschiede des Weibchenanteils zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt. Dieser Parameter schwankt für beide Populationen und Behandlungsgruppen stets zwischen 0,42 und 0,57.

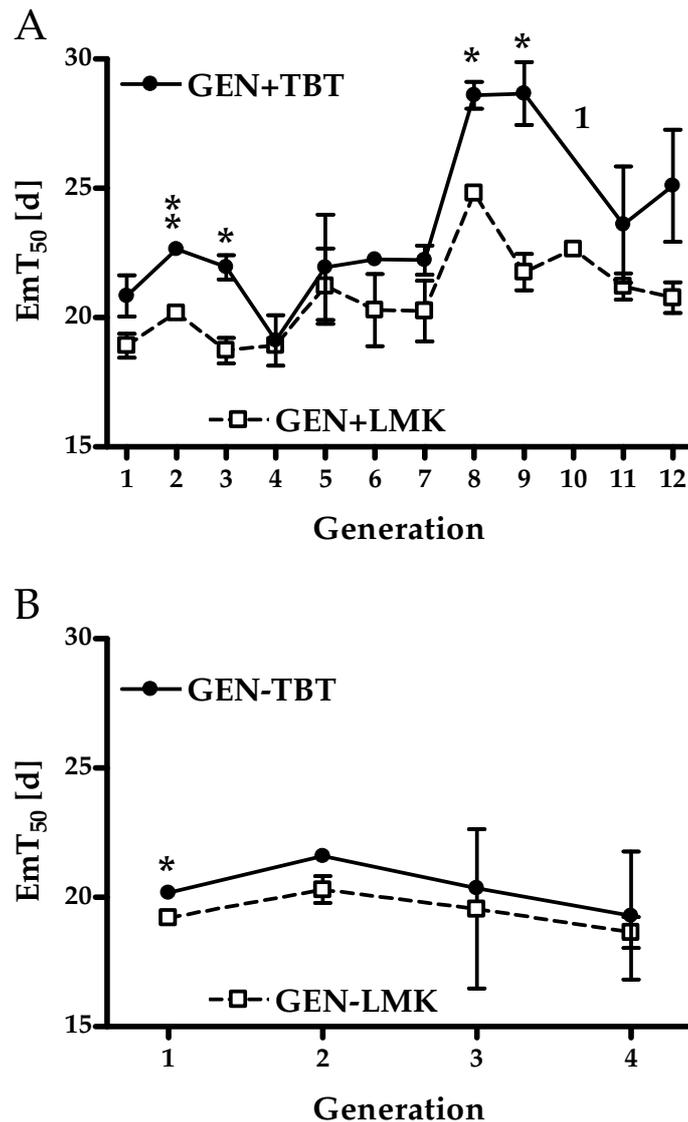


Abb. 16: *Chironomus riparius*. Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT_{50}) (MW \pm SD, in d) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 $\mu\text{g Sn/kg TG}$. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$ $n = 2$). ¹ EmT_{50} aufgrund von zu hoher Mortalität (> 80%) nicht kalkulierbar.

Reproduktion

Die Anzahl an Gelegen pro Weibchen schwankt über alle Generationen für GEN+LMK zwischen 0,88 und 1,37 und für GEN+TBT zwischen 0,86 und 1,07 (Ergebnisse nicht dargestellt). Für GEN+LMK wird über alle Generationen hinweg eine signifikant ($p < 0,01$, t-Test) höhere durchschnittliche Gelegeanzahl pro Weibchen mit 1,11 ($\pm 0,04$)

im Vergleich zu GEN+TBT mit 0,96 ($\pm 0,04$) festgestellt. Für GEN- werden im Allgemeinen über die einzelnen Generationen höhere Werte ermittelt als bei GEN+. Die Gelegezahl pro Weibchen schwankt für GEN-LMK zwischen 1,09 und 1,29 und für GEN-TBT zwischen 1,11 und 1,43.

Die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen variiert für GEN+LMK zwischen 0,73 und 1,25 (Tab. 20). Im Vergleich dazu werden für GEN+TBT niedrigere Werte zwischen 0,59 und 1,05 festgestellt. Ähnliche Effekte finden sich nach TBT-Exposition über alle Generationen wieder. Hier ist die durchschnittliche Anzahl an Gelegen pro Weibchen (\pm SD) bei GEN+TBT signifikant ($p < 0,01$, t-Test) niedriger ($0,83 \pm 0,04$) als bei GEN+LMK ($0,99 \pm 0,04$). Für GEN- werden für die Anzahl an Gelegen pro Weibchen und für die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen keine Effekte der TBT-Exposition festgestellt. Der Anteil fertiler Gelege an den gesamt produzierten Gelegen wird durch TBT nicht beeinflusst. Im Durchschnitt werden bei beiden Populationen und Behandlungsgruppen Werte zwischen 84% (GEN-TBT) und 89% (GEN+LMK) beobachtet.

Tab. 20: Fertile Gelege pro Weibchen für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung der jeweiligen Populationen (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation) in der Multigenerationsstudie III. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und der Lösemittelkontrolle (LMK) berechnet ($\star p < 0,05$). Alle Angaben sind MW \pm SEM und basieren auf zwei Replikaten ($n = 2$, n.B. - nicht bestimmbar aufgrund zu hoher Mortalität).

Generation	GEN+ Population		GEN- Population	
	LMK	TBT	LMK	TBT
1	1,25 ($\pm 0,07$)	0,80 ($\pm 0,06$) \star	1,07 ($\pm 0,08$)	1,18 ($\pm 0,04$)
2	1,01 ($\pm 0,03$)	0,92 ($\pm 0,12$)	1,10 ($\pm 0,09$)	0,92 ($\pm 0,08$)
3	0,97 ($\pm 0,01$)	1,05 ($\pm 0,10$)	1,07 ($\pm 0,03$)	1,08 ($\pm 0,12$)
4	0,89 ($\pm 0,04$)	0,89 ($\pm 0,04$)	0,91 ($\pm 0,10$)	0,97 ($\pm 0,07$)
5	0,81 ($\pm 0,11$)	0,78 ($\pm 0,10$)	-	-
6	0,99 ($\pm 0,13$)	0,64 ($\pm 0,03$)	-	-
7	0,73 ($\pm 0,14$)	0,59 ($\pm 0,19$)	-	-
8	0,81 ($\pm 0,21$)	0,99 ($\pm 0,05$)	-	-
9	1,23 ($\pm 0,04$)	0,92 ($\pm 0,12$)	-	-
10	0,92 ($\pm 0,18$)	n.B.	-	-
11	1,24 ($\pm 0,17$)	0,89 ($\pm 0,10$)	-	-
12	1,02 ($\pm 0,10$)	0,76 ($\pm 0,08$)	-	-



Die mediane Anzahl an Eiern pro Gelege variiert bei GEN+LMK zwischen 323 und 520 und bei GEN+TBT zwischen 376 und 554 (Ergebnisse nicht dargestellt). Für GEN-LMK werden Gelegegrößen zwischen 480 und 533 und für GEN-TBT zwischen 463 und 570 Eiern pro Gelege beobachtet. Die Gelege in der ersten Generation von GEN-TBT sind signifikant ($p < 0,05$, t-Test) kleiner als die der GEN-LMK. Bezüglich der Gelegegrößen fertiler Gelege werden für GEN+LMK Werte zwischen 332 und 538 und für GEN+TBT Werte zwischen 378 und 550 ermittelt. Bei GEN- sind die fertilen Gelege beider Behandlungsgruppen ähnlich groß (GEN-LMK 470 - 536, GEN-TBT 447 - 554).

Populationswachstumsrate (PWR)

Die PWR ist auch in der MGS III deutlich über $1,0 \text{ d}^{-1}$, und es werden ähnlich Werte wie in den Studien zuvor ermittelt (Abb. 17A). Innerhalb GEN+ liegen die PWR für GEN+LMK zwischen $1,19$ und $1,32 \text{ d}^{-1}$ und für GEN+TBT zwischen $1,17$ und $1,29 \text{ d}^{-1}$. In allen Generationen liegt die PWR der GEN+TBT unter der der LMK. Signifikante ($p < 0,05$, t-Test) Unterschiede können in den Generationen eins, zwei, sechs, neun und elf ermittelt werden. Betrachtet man die durchschnittliche PWR ($\pm \text{SD}$) über alle Generationen, so ist diese mit $1,26 \text{ d}^{-1}$ ($\pm 0,03 \text{ d}^{-1}$) bei GEN+LMK signifikant ($p < 0,001$, t-Test) höher als bei GEN+TBT mit $1,22 \text{ d}^{-1}$ ($\pm 0,04 \text{ d}^{-1}$).

Die PWR ist in den ersten beiden Generationen der GEN-TBT signifikant ($p < 0,05$, t-Test) niedriger als bei der GEN-LMK (Abb. 17B). In den folgenden Generationen drei und vier gleichen sich die Werte der beiden Behandlungsgruppen wieder an und es werden keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet. Im Allgemeinen liegen allerdings die PWR auch bei dieser Population deutlich über dem kritischen Wert von $1,0 \text{ d}^{-1}$. Die durchschnittliche PWR ($\pm \text{SD}$) der GEN-LMK ist mit $1,29 \text{ d}^{-1}$ ($\pm 0,03 \text{ d}^{-1}$) nur unwesentlich höher als die der GEN-TBT mit $1,28 \text{ d}^{-1}$ ($\pm 0,03 \text{ d}^{-1}$).

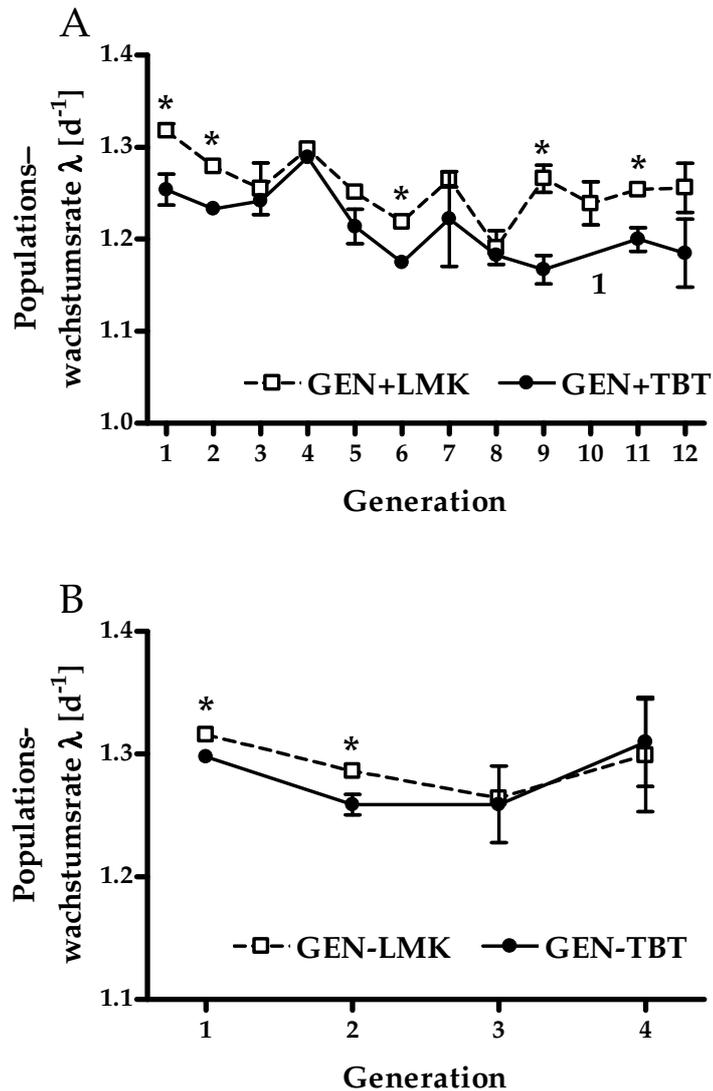


Abb. 17: *Chironomus riparius*. Populationswachstumsrate (MW \pm SD, in d^{-1}) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93 μg Sn/kg TG. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ($\star p < 0,05$, $n = 2$). ¹ PWR aufgrund von zu hoher Mortalität (100%) nicht kalkulierbar.

Genetische Analysen

Die genetische Diversität in der MGS III wurde in der Ausgangspopulation und in sechs der insgesamt zwölf Generationen nur für GEN+ untersucht. Die erwartete Heterozygotie der GEN+ wird im Verlauf der vorangegangenen Experimente deutlich niedriger, und der Startwert liegt nur noch bei ca. 0,4 (Abb. 18). Weiterhin werden annähernd gleiche Heterozygotien für GEN+LMK und für GEN+TBT in den Generatio-

nen zwei und vier festgestellt. In den folgenden beiden Generationen kommt es zu einer allgemeinen Verminderung der genetischen Diversität, und in der sechsten Generation wird ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen festgestellt. Dabei ist die Diversität in der GEN+TBT signifikant niedriger ($p < 0,05$, χ^2 -Test) als in der GEN+LMK. In den folgenden Generation acht und zehn wird erneut ein ähnliches Niveau in beiden Behandlungsgruppen ermittelt. In der letzten Generation ist die Diversität der GEN+TBT abermals signifikant ($p < 0,05$, χ^2 -Test) niedriger als in der GEN+LMK. Im Allgemeinen ist bei GEN+LMK ein stetiger Rückgang der Heterozygotie über zwölf Generationen hinweg zu erkennen. Dieser Trend zu mehr homozygoten Genorten fällt bei der GEN+TBT vergleichsweise stärker aus.

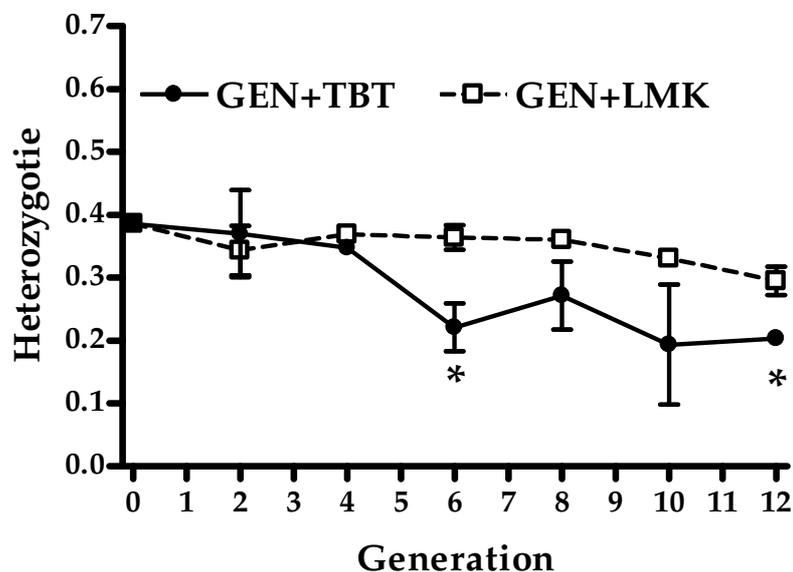


Abb. 18: *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie ($MW \pm SD$) der Mischpopulation (GEN+) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von $8,93 \mu\text{g Sn/kg TG}$ (LMK – Lösemittelkontrolle). Signifikante Unterschiede werden mittels χ^2 -Test ermittelt ($\star p < 0,05$, $n = 2$).

In der MGS III werden ebenfalls signifikante ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) bei der GEN+ festgestellt (Tab. 21). Dieses betrifft aber sowohl die Lösemittelkontrolle (3x) als auch die TBT-Behandlung (3x), wobei im Gegensatz zur MGS I nur wenige Abweichungen beobachtet werden. Die Abweichungen vom HWG beschränken sich auf die Mikrosatellitengenorte eins und vier. Die Genorte vier und fünf weisen ab der sechsten Generation überhaupt keine Heterozygotie mehr auf. Deshalb wird die gesamte Heterozygotie der GEN+TBT im

Mittel deutlich verringert. Im Allgemeinen werden auch bei der Betrachtung der einzelnen Mikrosatellitenorte deutlich niedrigere Werte im Vergleich zur MGS I beobachtet.

Tab. 21: *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitenorte für die Mischpopulation (GEN+) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie III (Gen. – Generation, Beh. - Behandlung). Signifikante Abweichungen werden mittels χ^2 -Test bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$, $\star\star\star p < 0,001$).

Gen.	Beh.	Mikrosatelliten				
		Lokus 1	Lokus 2	Lokus 3	Lokus 4	Lokus 5
0		0,76	0,29	0,51	0,21	0,17
2	LMK I	0,77	0,17	0,46	0,09	0,09
	LMK II	0,81	0,19	0,48	0,22	0,16
	TBT I	0,77	0,12	0,51	0,08	0,13
	TBT II	0,80	0,38	0,51	0,28	0,12
4	LMK I	0,85 \star	0,22	0,51	0,19	0,04
	LMK II	0,76	0,28	0,49	0,08	0,26
	TBT I	0,81	0,33	0,53	0,08	0,00
	TBT II	0,76	0,31	0,50	0,12	0,04
6	LMK I	0,75	0,00	0,49	0,51	0,00
	LMK II	0,75 \star	0,13	0,50	0,29	0,22
	TBT I	0,72	0,25	0,00	0,00	0,00
	TBT II	0,25 \star	0,25	0,25	0,00	0,00
8	LMK I	0,62	0,13	0,51	0,51	0,00
	LMK II	0,68	0,08	0,50	0,36	0,36
	TBT I	0,65	0,42	0,42	0,00	0,00
	TBT II	0,42	0,31	0,38	0,00	0,08
10	LMK I	0,71	0,03	0,46	0,50	0,00
	LMK II	0,65	0,17	0,40	0,31	0,08
	TBT I	0,50 $\star\star$	0,11	0,03	0,00	0,00
	TBT II	0,77 $\star\star$	0,24	0,18	0,00	0,11
12	LMK I	0,51	0,04	0,50	0,51	0,00
	LMK II	0,71	0,12	0,39	0,13 $\star\star\star$	0,05
	TBT I	0,69	0,34	0,00	0,00	0,00
	TBT II	0,69	0,31	0,00	0,00	0,00

Anpassungsexperimente

Die Sensitivität gegenüber TBT in den Akutttests mit den L1-Larven ist in beiden Populationen und Behandlungsgruppen ähnlich (Tab. 22). Durch das gewählte statistische Verfahren ($n = 2$) werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt. Dies trifft vor allem für die erste Generation der GEN+ zu. Dabei wird für GEN+LMK ein LC_{50} -Wert von $24,8 \mu\text{g Sn/L}$ festgestellt. Im Vergleich dazu ist der Wert für GEN+TBT mit $41,1 \mu\text{g Sn/L}$ fast doppelt so hoch. Im weiteren Verlauf der Experimente werden für GEN+LMK LC_{50} -Werte zwischen $14,1$ und $21,7 \mu\text{g Sn/L}$ berechnet. Für GEN+TBT werden LC_{50} -Werte zwischen $12,9$ und $29,5 \mu\text{g Sn/L}$ ermittelt. Bei GEN- ist auffällig, dass in der vierten Generation der LC_{50} -Wert in der TBT-Behandlung nur halb so hoch ist, wie in der GEN-LMK und die TBT-vorexponierten Tiere empfindlicher gegenüber dem Stressor TBT sind.

Tab. 22: Berechnete LC_{50} -Werte (MW \pm SEM; n) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) für die Anpassungsexperimente der MGS III (¹ - nur ein Replikat als Berechnungsgrundlage, n.B. – nicht bestimmbar aufgrund zu hoher Kontrollmortalitäten, sigmoidale Konzentrations-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg, t-Test, ★ $p < 0,05$, $n = 2$).

Generation	Behandlung	GEN+ Population	GEN- Population
Akutttests mit L1-Larven [$\mu\text{g Sn/L}$]			
3	LMK	24,8 ($\pm 1,67$; 2)	19,9 ($\pm 7,66$; 2)
	TBT	41,1 ($\pm 8,52$; 2)	17,1 ($\pm 3,75$; 2)
4	LMK	14,1 ($\pm 3,05$; 2)	20,2 ($\pm 8,59$; 2)
	TBT	13,9 ($\pm 6,55$; 2)	9,86 ($\pm 4,59$; 2)
8	LMK	21,7 ($\pm 0,20$; 2)	-
	TBT	29,5 ($\pm 6,13$; 2)	-
10	LMK	16,1 ($\pm 3,03$; 2)	-
	TBT	12,9 ($\pm 8,41$; 2)	-
12	LMK	21,3 ($\pm 4,17$; 2)	-
	TBT	17,2 ($\pm 1,30$; 4)	-
Life-Cycle-Experimente [$\mu\text{g Sn/kg TG}$] (mittlere zeitlich, gewichtete Konz.)			
4	LMK	5,68 (-; 1) ¹	15,6 (-; 1) ¹
	TBT	8,64 ($\pm 0,31$; 2) ★	n.B.
12	LMK	n.B.	n.B.
	TBT	n.B.	n.B.

Die chronischen Anpassungstests sind im Allgemeinen durch die hohen Kontrollmortalitäten gekennzeichnet (> 30%). Deshalb konnten, mit einer Ausnahme, keine LC₅₀-Werte berechnet werden. In dem einzig validen Experiment wird deutlich, dass die TBT-vorexponierte Population GEN+ einen signifikant ($p < 0,05$, t-Test) erhöhten LC₅₀-Wert im Vergleich zur Lösemittelkontrolle aufweist.

3.4 Zweitstressorstudien mit Cadmium

Die genauen Bezeichnungen der einzelnen Populationen in den Zweitstressorexperimenten sind dem Kapitel 2.6, Tabelle 6 zu entnehmen.

Rückstandsanalytik

In den ZSS wird eine gesonderte Cd-Rückstandsanalytik für das Sediment und für das Überstandswasser durchgeführt. Dabei wird ebenfalls, wie im Cd-Vorexperiment (Kap. 2.3; VOGT et al., 2007a), in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 211 (1998) eine zeitlich gewichtete, mittlere Testkonzentration von 0,76 mg/kg TG berechnet. Im Überstandswasser werden zum Ende des Versuches 0,19 µg Cd/L gemessen (HEß, 2005).

Mortalität

Die Mortalität befindet sich in allen Kontrollgruppen (LMK+LMK, LMK+TBT) stets auf einem niedrigen Niveau und weist in beiden Studien etwa 25% auf (Abb. 19). Wie bereits für die MGS I beschrieben, wird ein geringer TBT-Effekt auf die mittlere Mortalität in der ZSS I über die Generationen sieben bis neun festgestellt (Abb. 19A). Dies trifft auch für die Population TBT+TBT in der MGS III zu (Abb. 19B). Im Gegensatz dazu kann ein erhöhter toxischer Effekt des Schwermetalls Cd auf die Tiere beobachtet werden. Die Mortalität ist in der ZSS I in beiden Cd-Behandlungsgruppen (LMK+Cd, TBT+Cd) signifikant höher als in den jeweiligen Kontrollen ($p < 0,05$, t-Test).

In der ZSS III werden ebenfalls signifikant ($p < 0,05$, t-Test) erhöhte Mortalitäten nach Cd-Exposition (LMK+Cd, TBT+Cd) beobachtet. Allerdings werden in beiden ZSS keine Unterschiede zwischen der nicht-vorbelasteten und der TBT-vorbelasteten Population festgestellt. Interessant ist, dass die TBT-vorbelasteten Gruppen (TBT+Cd) in beiden Studien statistisch niedrigere Cd-Effekte auf das Überleben der Tiere aufweisen als die nicht-vorbelasteten Gruppen (LMK+Cd). Weiterhin hat die Exposition gegenüber einer identischen Cd-Konzentration in der ZSS III im Vergleich zur ZSS I eine höhere Mortalität in der GEN+LMK und in der GEN+TBT zur Folge.

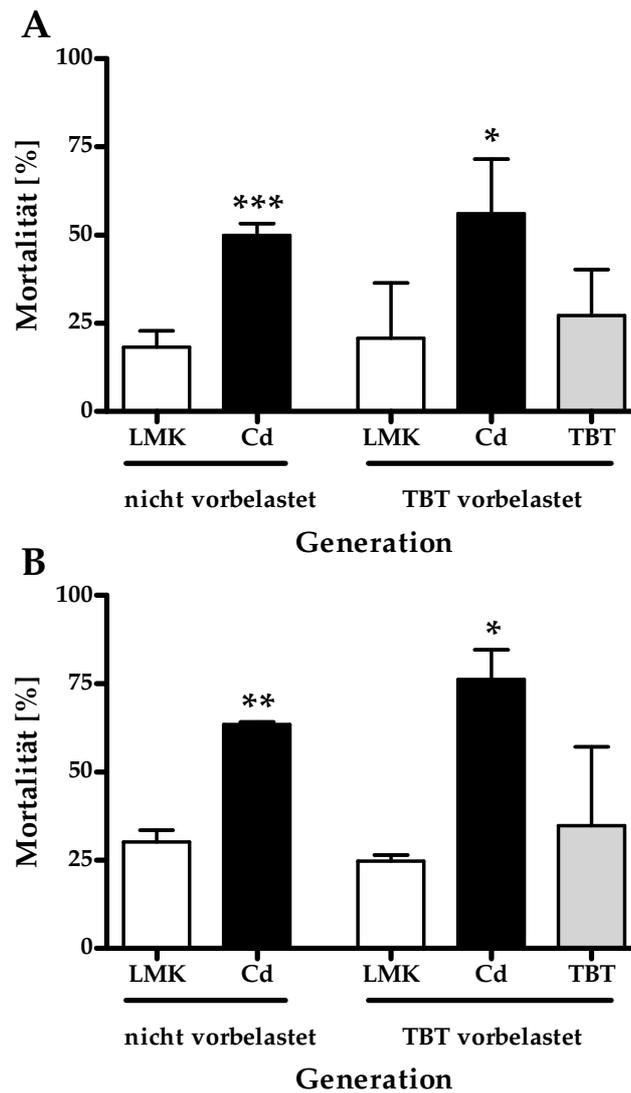


Abb. 19: *Chironomus riparius*. Mortalität (MW \pm SD, in %) in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (**A**) parallel zur MGS I und (**B**) parallel zur MGS III. Dargestellt sind die beiden Populationen bei Schadstoffwechsel auf Cadmium (schwarzer Balken, Cd) und die jeweiligen Vergleichsgruppen (weißer Balken, Lösemittelkontrolle – LMK; grauer Balken, Tributylzinn –TBT) über drei Generationen. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 2-3$).

Mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT_{50}) und Weibchenanteil

Die Tiere in den jeweiligen Kontrollgruppen beider Zweitstressorexperimente (LMK+LMK, TBT+LMK) weisen einen mittleren Emergenzzeitpunkt von ca. 20 Tagen auf, wobei dieser in den jeweiligen Behandlungsgruppen kaum variiert (Abb. 20).

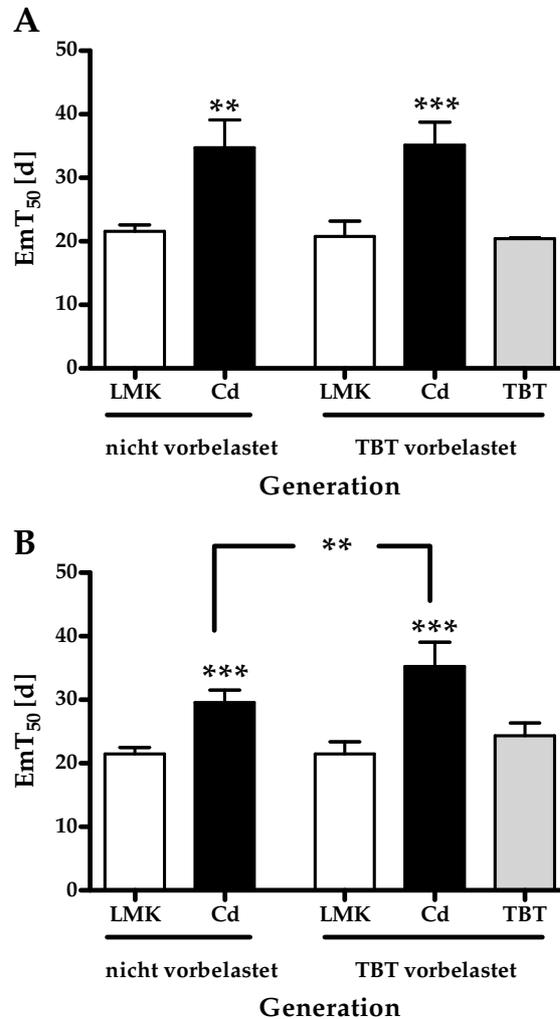


Abb. 20: Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT_{50} , in d) von *Chironomus riparius* (MW \pm SD) in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (A) parallel zur MGS I und (B) parallel zur MGS III. Dargestellt sind die beiden Populationen bei Schadstoffwechsel auf Cadmium (schwarzer Balken, Cd) und die jeweiligen Vergleichsgruppen (weißer Balken, Lösemittelkontrolle – LMK; grauer Balken, Tributylzinn –TBT) über drei Generationen. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test bestimmt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 2-3$).

Die TBT-Vorbelastung spielt dabei keine Rolle. In den Experimenten der MGS I wird in den Generationen sieben bis neun kein signifikanter ($p > 0,05$, t-Test) TBT-Effekt auf



den mittleren Schlupfzeitpunkt bei GEN+TBT festgestellt. Im Gegensatz dazu wird der Schlupf der Tiere der GEN+TBT in der MGS III nach TBT-Exposition deutlich verzögert ($p = 0,052$, t-Test). Das Schwermetall Cd führt in beiden Studien offensichtlich zu höheren EmT_{50} -Werten, wobei die Tiere aller Cd-Behandlungsgruppen signifikant ($p < 0,01$, t-Test) später schlüpfen. Die Emergenz der Tiere verzögert sich dabei in allen vier Cd-Behandlungen um durchschnittlich 12 Tage ($\pm 2,88$). Auffällig ist, dass in der ZSS I keine Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich vorbelasteten Populationen (GEN+LMK, GEN+TBT) zu erkennen sind.

In der ZSS III ist dies nicht der Fall. GEN+TBT, welche über neun Generationen mit einer höheren TBT-Konzentration vorbelastet wurde, ist signifikant ($p < 0,01$, t-Test) empfindlicher gegenüber dem Zweitstressor als die nicht vorbelastete GEN+LMK.

Bezüglich des Weibchenanteils werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt.

Gelege pro Weibchen und Gelegegröße

Die Reproduktion der Tiere wird in beiden Zweitstressorstudien unterschiedlich beeinflusst (Tab. 23). In der Vorstudie werden eine deutlich niedrigere Gelegeanzahl pro Weibchen sowie tendenziell kleinere Gelege bei Cd-Stress bei der gewählten Konzentration ermittelt (Kap. 3.2; VOGT et al., 2007a).

Im Allgemeinen werden unabhängig von der TBT-Vorbelastung und von der Cd-Exposition hohe Gelegenzahlen pro Weibchen festgestellt, wobei diese zwischen 0,88 und 1,17 schwanken. Weiterhin können keine Effekte auf die Entwicklungsfähigkeit der Gelege beobachtet werden, da die Weibchen zumeist fertile Gelege produzieren. In der ZSS I wird ein signifikanter ($p < 0,05$, t-Test) Unterschied zwischen TBT+LMK und TBT+Cd ermittelt, wobei die Weibchen unter Cd-Stress mehr Gelege produzieren. In der ZSS III werden im Gegensatz dazu keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt. Die Gelegegröße unter Cd-Stress ist in der ZSS I bei LMK+Cd signifikant ($p < 0,01$, t-Test) geringer als bei LMK+LMK. In der ZSS III ergibt sich ein umgekehrtes Bild, da die produzierten Gelege der LMK+Cd signifikant ($p < 0,05$, t-Test) größer sind als die der LMK+LMK. Des Weiteren sind die von der TBT+TBT produzierten Gelege signifikant ($p < 0,05$, t-Test) kleiner als die der TBT+LMK.

Tab. 23: Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertile, MW \pm SD) und Eier pro Gelege (MW \pm SD) der Zweitstressorstudien mit Cadmium parallel zu den Multigenerationsstudien I & III. (Abkürzungen der Behandlungsgruppen Kap. 2.6, Tab. 6). Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test bestimmt (\star $p < 0,05$, $\star\star$ $p < 0,01$, $n = 2-3$).

Behandlungsgruppe & Endpunkt	Gelege pro Weibchen (MW \pm SD)		Eier pro Gelege (MW \pm SD)
	gesamt	fertil	
Zweitstressorstudie I (parallel zur MGS I)			
LMK+LMK	0,95 (\pm 0,03)	0,78 (\pm 0,06)	459 (\pm 13,1)
LMK+Cd	1,04 (\pm 0,18)	0,97 (\pm 0,16)	394 (\pm 17,7) $\star\star$
TBT+LMK	0,88 (\pm 0,08)	0,82 (\pm 0,08)	494 (\pm 11,0)
TBT+Cd	1,11 (\pm 0,08) \star	0,99 (\pm 0,06)	464 (\pm 40,7)
TBT+TBT	1,14 (\pm 0,19)	1,06 (\pm 0,19)	497 (\pm 11,0)
Zweitstressorstudie III (parallel zur MGS III)			
LMK+LMK	1,17 (\pm 0,18)	1,06 (\pm 0,16)	394 (\pm 44,4)
LMK+Cd	1,07 (\pm 0,16)	0,89 (\pm 0,10)	505 (\pm 13,7) \star
TBT+LMK	1,08 (\pm 0,09)	1,06 (\pm 0,09)	538 (\pm 37,3)
TBT+Cd	0,95 (\pm 0,37)	0,89 (\pm 0,29)	508 (\pm 30,0)
TBT+TBT	0,97 (\pm 0,08)	0,82 (\pm 0,09)	391 (\pm 22,2) \star

Populationswachstumsrate (PWR)

In Kontrollbehandlungen (LMK+LMK, TBT+LMK) beider Studien weisen die PWR ein ähnlich hohes Niveau mit täglichen Wachstumsraten um ca. 25% auf (Abb. 21). Dieses ist wie bei den Life-Cycle-Parametern Mortalität und EmT_{50} -Wert wiederum unabhängig von der TBT-Vorexposition.

Die TBT-Exposition hat in der MGS I keinen Effekt auf Wachstum und Reproduktion von *C. riparius* in den Generationen sieben bis neun, da die durchschnittliche PWR ein ähnliches Niveau wie in der GEN+LMK erreicht (Abb. 21A). In der MGS III ist dies nicht der Fall, und es wird eine signifikant ($p < 0,01$, t-Test) niedrigere durchschnittliche PWR (\pm SD) mit ca. $1,2 \text{ d}^{-1}$ bei GEN+TBT im Vergleich zur GEN+LMK ermittelt (Abb. 21B). Die Exposition gegenüber Cd führt in allen vier Behandlungsgruppen zu signifikant ($p < 0,01$, t-Test) niedrigeren PWR im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Auffällig ist auch, dass die Reduktion der PWR in der ZSS I in der nicht-vorbelasteten und in der TBT-vorbelasteten Behandlungsgruppe gleich stark ausfällt. Im Gegensatz

dazu ist die TBT-vorbelastete Gruppe im ZSS III signifikant ($p < 0,05$, t-Test) empfindlicher gegenüber Cd als die nicht-vorbelastete Gruppe.

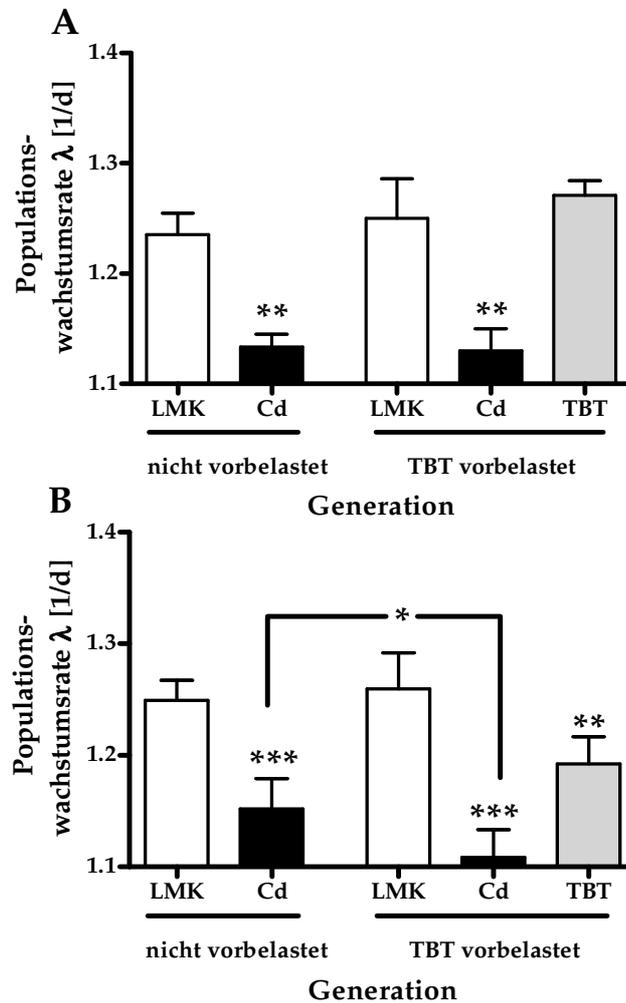


Abb. 21: Populationswachstumsrate (MW \pm SD, in d^{-1}) von *Chironomus riparius* in den Zweitstressorexperimenten mit nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (**A**) parallel zur MGS I und (**B**) parallel zur MGS III. Dargestellt sind die beiden Populationen bei Schadstoffwechsel auf Cadmium (schwarzer Balken, Cd) und die jeweiligen Vergleichsgruppen (weißer Balken, Lösemittelkontrolle – LMK; grauer Balken, Tributylzinn – TBT) über drei Generationen. Signifikante Unterschiede werden mittels t-Test bestimmt ($\star p < 0,05$, $\star\star p < 0,01$, $\star\star\star p < 0,001$, n = 2-3).



4 Diskussion

Die in den Life-Cycle-Experimenten erhaltenen Daten werden in der Diskussion mit folgenden Schwerpunkten behandelt:

- Ausgangsbedingungen und Vorexperimente
- Einfluss des Testdesigns auf die Multigenerationsstudien
- Effekte der TBT-Exposition in den Multigenerationsexperimenten
- Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress
- Zweitstressorstudien mit Cadmium

4.1 Ausgangsbedingungen und Vorexperimente

Im ersten Abschnitt werden die Ausgangsbedingungen hinsichtlich der genetischen Diversität der eingesetzten Populationen, der Rückstandsanalytik und der physikochemischen Eigenschaften des Testsystems sowie der Vorexperimente zur Bestimmung geeigneter TBT und Cd-Konzentrationen für die Multigenerationsstudien diskutiert.

Genetische Diversität der Ausgangspopulationen

Obwohl bekannt ist, dass die genetische Diversität von Laborzuchten einen wichtigen Einfluss auf die Ergebnisse von ökotoxikologischen Tests besitzt (WOODS et al., 1989; DUAN et al., 1997; MUKHOPADHYAY et al., 1997), wurden in den letzten Jahren wenige Experimente durchgeführt, um die Rolle der genetischen Variabilität in der ökotoxikologischen Substanztestung näher zu beschreiben. In den Vorstudien wurden neben der Bestimmung von geeigneten TBT- und Cd-Testkonzentrationen für die Multigenerationsstudien auch die genetische Struktur von zwei *Chironomus riparius*-Freilandpopulationen sowie von neun Laborpopulation mit hoch auflösender Mikrosatellitenanalyse erfasst (Kap. 2.8). Die genetische Variabilität der beiden Freilandpopulationen ist deutlich höher als in den Laborzuchten (Abb. 4), wobei der Shannon-Index in den Zuchten, bedingt durch die jahrelange isolierte Laborhaltung, niedriger ist. Das Phänomen der genetischen Verarmung von Laborzuchten wurde bereits für Dipteren (WOODS et al., 1989; MUKHOPADHYAY et al., 1997; NORRIS et al., 2001), Amphipoden (DUAN et al., 1997), Trematoden (STOHLER et al.; 2004) und Nagertiere (RAZZOLI et al., 2003) beschrieben. So konnte beispielsweise in einer Studie von WOODS et al. (1989)



eine verringerte Proteinvariation in einer Laborzuchtpopulation des mit *C. riparius* eng verwandten *C. tentans* beobachten werden.

Inzuchtprozesse sind ein generelles Problem von Laborkulturen. Es gibt zwei Möglichkeiten, die genetische Verarmung zu erklären. Laborzuchten werden meistens mit einer begrenzten Anzahl an Tieren aus dem Freiland oder von anderen Laborstämmen etabliert. Dadurch kommt es zu einem „Gründereffekt“, welcher zwangsläufig in einer niedrigeren genetischen Diversität der so aufgebauten Laborzucht resultiert, da nur eine begrenzte Anzahl an Organismen aus der Ausgangspopulation entnommen werden kann (KNIPPERS, 2001). Entsprechend wird nicht der gesamte Genpool, sondern nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Genotypen ins Labor überführt. Weiterhin werden selten zusätzlich Organismen aus dem Freiland oder aus anderen Zuchten in bestehende Laborkulturen eingebracht (NOWAK et al., 2007), und es existiert nur ein eingeschränkter Genfluss. Der Austausch von unterschiedlichen Allelen zwischen Populationen stellt jedoch eine wichtige Ressource für die Aufrechterhaltung der genetischen Variation dar. Über längere Zeiträume kommt es innerhalb der Population zu einem Verlust an Allelen und zu einer Verringerung der genetischen Variabilität.

Neben diesen beiden Parametern spielt die effektive Populationsgröße eine wichtige Rolle. Je kleiner Populationen sind, desto schneller kann es zu einem Verlust an genetischer Variation kommen (BICKHAM et al., 2000; MONTGOMERY et al., 2000; VAN STRAALLEN & TIMMERMANS, 2002; FRANKHAM, 2005b). Dieses ist aufgrund der aufwendigeren Zucht besonders bei Standardorganismen höherer Taxa, wie z.B. Fischen und Säugern, der Fall. Die Verminderung der genetischen Vielfalt ist auch in der zu Beginn sehr diversen GEN+LMK über alle 25 Generationen der durchgeführten Multigenerationsstudien festzustellen und der Anteil heterozygoter Allele nimmt unter Standardlaborbedingungen stetig ab (Abb. 22, NOWAK et al., 2007).

Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte Inzucht zu negativen Effekten (genannt Inzuchtdepression) auf die individuelle Fitness, wie z.B. die Wachstumsrate oder Fruchtbarkeit, führt (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987; BIJLSMA et al., 2000; FRANKHAM et al., 2002). Für genetisch verarmte Populationen kommt erschwerend hinzu, dass negative Inzuchteffekte besonders unter Stressbedingungen auftreten. Dies konnte unter anderem in Studien mit *Drosophila melanogaster* klar gezeigt werden, wobei eine über mehrere Generationen in Inzucht gehaltene Population eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aceton und Kupfersulfat sowie gegenüber Trockenstress aufwies

(DAHLGAARD & HOFFMANN, 2000). In einer Metaanalyse von 34 Einzelstudien zeigen ARMBRUSTER und REED (2005) ebenfalls eine klare Tendenz zu höheren Sensitivitäten gegenüber Umweltstress von Populationen in Inzucht. Auch für *C. riparius* wird dieses Phänomen gezeigt. Populationen aus Inzuchten sind dabei deutlich empfindlicher gegenüber Cadmium und moderaten Temperaturveränderungen als genetisch variable Populationen (CZEIKOWITZ, 2006, NOWAK et al., eingereicht, VOGT et al., akzeptiert).

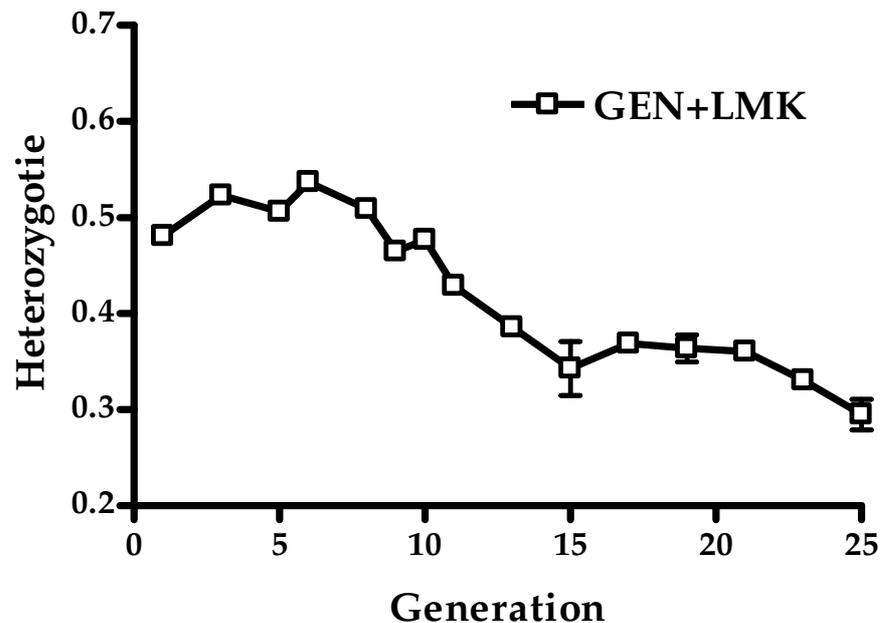


Abb. 22: Erwartete Heterozygotie an 5 Mikrosatellitengenorten über 25 Generationen GEN+LMK (n = 1-2).

Genetische Verarmung von Laborzuchten impliziert natürlich auch Konsequenzen für die ökotoxikologische Substanztestung und die damit verbundene Ableitung von Effektkonzentrationen. Populationen mit reduziertem Genpool sind, wie bereits dargestellt, sensitiver gegenüber Schadstoffstress, und die daraus resultierenden niedrigen Effektkonzentrationen können zu einer überschätzten Toxizität einzelner Substanzen führen.

Ein weiterer Aspekt ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den einzelnen Laboren. Dabei kommt es auf die genetische Variation der ausgewählten Population an, mit denen die Experimente durchgeführt werden. So können unterschiedliche Effektkonzentrationen (z.B. in Ringtests) unter anderem durch unterschiedliche genetische Variabilitäten der Testpopulationen erklärt werden. Experimente von JOST (2006)



und CZEIKOWITZ (2006) zeigen, dass genetisch unterschiedlich variable *C. riparius*-Populationen abweichende LC₅₀-Werte im Life-Cycle-Experiment mit Cadmium aufweisen (NOWAK et al., eingereicht). Dabei schwanken die LC₅₀-Werte bis um den Faktor vier. Studien mit *Folsomia candida* (CROUAU et al., 1999), *Daphnia magna* (BAIRD et al., 1990) und *Potamopyrgus antipodarum* (JENSEN & FORBES, 2001) zeigen den Einfluss der genetischen Diversität auf die ermittelte Effektkonzentration ebenfalls, wobei Schwankungen bis zum Faktor 10 möglich sind.

Eine lange Laborhaltung kann nicht nur zu genetischer Verarmung führen, sondern auch zu einer Anpassung der Organismen an Substanzen, gegenüber denen sie kontinuierlich in niedrigen Hintergrundkonzentrationen exponiert sind. So besteht die Möglichkeit, dass Laborkulturen ihre Sensitivität beispielsweise gegenüber Substanzen verlieren, die aus Labormaterialien (PVC-Schalen, Plastikschläuche) austreten. Befunde für die Vorderkiemerschnecke *Potamopyrgus antipodarum* untermauern diese These. So gibt es Hinweise, dass Populationen, die über viele Generationen im Labor gehalten wurden, ihre Sensitivität gegenüber Östrogenen einbüßen können; eine mögliche Ursache ist die Hintergrundexposition gegenüber östrogenartig wirkenden Substanzen, die aus Kunststoffen auslaugen und zu einer reduzierten Dichte und/oder Empfindlichkeit der Rezeptoren (*down regulation*) führen (OETKEN, persönl. Mitteilung).

Die genetische Variation von GEN+ ist zu Beginn der Studien höher als die der jeweiligen Einzellaborzuchten. Allerdings erreicht GEN+ nicht ganz das Niveau der beiden Freilandpopulationen (Abb. 4). Folglich wird selbst durch Auffrischung oder Kreuzung von 11 verschiedenen Einzellaborzuchten nicht die genetische Variation von Freilandpopulationen erreicht. Außerdem sind die zusammen gekreuzten Einzelpopulationen nicht im selben Umfang in der Mischpopulation vorhanden (Tab. 10; NOWAK et al., 2007). Die Auffrischung von Laborzuchten durch Organismen aus anderen Laborzuchten ist als ungenügend zu betrachten, und in zukünftigen Laborzuchten sollten stets Tiere aus dem Freiland mit eingebracht werden. Dies ist allerdings für *C. riparius* relativ schwierig zu realisieren, da die Artdeterminierung auf Basis morphologischer Parameter im Freiland nur bedingt möglich ist (LANGTON, 1991; VALLENDUUK & MOROZOVA, 2005). Im Vergleich dazu stehen allerdings moderne genetische Methoden für die sichere Artbestimmung im Labor zur Verfügung (CAREW et al., 2003; CAREW et al., 2005; NOWAK et al., 2006; PFENNINGER et al., im Druck). Ein weiteres Problem ist generell die Überführung von Freilandorganismen ins Labor. So konnte in Nebenexperi-



menten festgestellt werden, dass eine ins Labor überführte *C. riparius*-Freilandpopulation nicht in der Lage ist, sich erfolgreich zu reproduzieren (Ergebnisse nicht dargestellt).

Rückstandsanalytik und physiko-chemische Eigenschaften im gewählten Testdesign

Bei dem gewählten Testdesign wird eine große Diskrepanz zwischen der gewählten TBT-Nominalkonzentration und der analytisch bestimmten TBT-Konzentration festgestellt. So werden z.B. nach dem Abdampfen des Lösemittels bei der höchsten TBT-Nominalkonzentration (160 µg Sn/kg TG) nur 22 µg Sn/kg TG analytisch bestimmt (Tab. 19). Somit sind bereits nach diesem Schritt 86% des eingesetzten TBT nicht mehr im Testsystem zu finden. Eine mögliche Ursache sind Adsorptionsprozesse an den für das Spiken eingesetzten Labormaterialien, wie z.B. an Glaszylindern oder Pipettenspitzen. Zusätzlich kommen Verluste in Folge des Ethanol-Abdampfprozesses unter dem Abzug in Betracht. Da TBT in 300 mL Ethanol/kg TG gelöst auf das Sediment gegeben und für 24 h unter dem Abzug stehen gelassen wird, ist es wahrscheinlich, dass durch den relativ großen Abluftstrom des Abzugs sich auch TBT zum Teil verflüchtigt. Dieser mögliche TBT-Verlust wird durch die geringe Bindungsfähigkeit des Quarzsands für organische Moleküle zusätzlich verstärkt. Der verwendete ausgeglühte Quarzsand hat keine Kationenaustauscher, wie das z.B. bei Lehm oder Torf der Fall ist und eine relative niedrige Elektronegativität. Deshalb kann die Bindung zwischen TBT und dem Quarzsand als recht instabil eingestuft werden. Für zukünftige Experimente sollte dieser Aspekt unbedingt berücksichtigt werden und das Lösemittel z.B. über einen längeren Zeitraum bei geringerem Abluftstrom abgedampft werden. Durch diese Variante können Unterschiede zwischen der gewählten TBT-Nominalkonzentration und der realen gemessenen TBT-Konzentration minimiert werden.

Im weiteren Verlauf des Tests verringert sich die reale TBT-Konzentration weiter. Dies kann wiederum auf Adsorptionsprozesse, z.B. am Futter oder an der Cuticula der Larven zurückgeführt werden. Ein Teil der Substanz wird ebenfalls durch die Larven aufgenommen (LOOSER et al., 2000). Aufgrund der geringen Biomasse der Tiere ist jedoch davon auszugehen, dass nur ein kleiner Teil der Substanz akkumuliert wird. Außerdem geht ein gewisser Anteil der Testsubstanz aus dem Sediment in das Porenwasser bzw. Überstandswasser über. TBT liegt bei einem pH-Wert von 8,0 hauptsächlich als TBT-OH vor und ist somit im Vergleich zu den anderen TBT-Spezies relativ gut wasserlöslich (FENT & LOOSER, 1995). In zukünftigen Experimenten sollte deshalb auch das



Poren- sowie das Überstandswasser auf den Gehalt an Organozinnverbindungen (OZV) untersucht werden. In der vorliegenden Studie wurden keine weiterführenden analytischen Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt, da die OZV-Partizionierung bei dem gewählten Testdesign nicht im Vordergrund der Experimente stand und die Messung von OZV relativ aufwendig und teuer ist.

Während die TBT-Konzentration im Verlauf des Experimentes weiter abnimmt, steigen die Konzentrationen der TBT-Metaboliten Di- und Monobutylzinn an. Dies kann auf biochemische Abbauprozesse, wie z.B. auf hydrolytischen, photochemischen oder mikrobiellen Abbau, zurückgeführt werden (WATANABE et al., 1992; NAVIO et al., 1993; SARRADIN et al., 1995; BUA, 2003). Das gewählte Testdesign führt aufgrund der Sauerstoffversorgung, Lichteinstrahlung und Temperatur (20°C) zu einem verstärkten TBT-Abbau, und es ist von kurzen TBT-Halbwertszeiten auszugehen. Da Metaboliten von Substanzen teilweise eine höhere ökotoxikologische Aktivität auf Organismen haben, wie dies z.B. für das Fungizid Vinclozolin bekannt ist (KELCE et al., 1994), können TBT-Effekte auf ältere Larvalstadien sowie das Puppenstadium auch durch die Metaboliten Di- und Monobutylzinn ausgelöst werden. Diese Effekte sind jedoch nur schwer abzuschätzen, da bisher keine Daten von Life-Cycle-Experimenten mit *C. riparius* und den TBT-Metaboliten vorliegen. Im Falle der Butylzinnverbindungen weisen jedoch alle vorliegenden Befunde für aquatische Organismen darauf hin, dass TBT deutlich toxischer als seine Metaboliten ist (FENT, 1996).

Ein zusätzliches Problem der OZV-Analytik ist, dass die ausgewählten Konzentrationen relativ dicht an der Nachweisgrenze (1 µg OZV/kg TG) der gaschromatographischen Messmethode liegen (DIN 19744, 2003). Deshalb ist mit größeren systematischen Fehlern zu rechnen, und im Testverlauf ansteigende TBT-Konzentrationen können vermutlich auch dadurch erklärt werden.

Zusammenfassend gilt es festzuhalten, dass die Multigenerationsstudien bei geringeren TBT-Konzentrationen als den eingesetzten Nominalkonzentrationen durchgeführt wurden und sich die Umweltrelevanz dadurch erhöht. Die zeitlich gewichteten, mittleren TBT-Sedimentkonzentrationen (4,46 – 8,93 µg Sn/kg TG) entsprechen dabei umweltrelevanten Konzentrationen (ARAMBARRI et al., 2003; BHOSLE et al., 2004; BURTON et al., 2005). So wurden beispielsweise im Jahre 2001 in der Alster bei Haselknick Sedimentkonzentrationen zwischen 2 und 10 µg Sn/kg TG festgestellt (UBA, 2002). Ähnlich niedrige TBT-Konzentrationen (bis maximal 30 µg Sn/kg TG) ergaben auch Mes-



sungen von frischen, schwebstoffbürtigen Elbesedimenten bei Schmilka, Magdeburg und Schnackenburg für die Jahre 2001 bis 2005 (ARGE Elbe, 2005).

Für Cadmium werden im Vergleich zum TBT deutlich höhere prozentuelle Gehalte am Ende der Experimente in den Sedimenten wieder gefunden (ca. 66%, Tab. 11, Kap. 3.4). Da Cadmium bereits als Element vorliegt und somit nicht weiter abgebaut werden kann, spielen im Gegensatz zum TBT Abbauprozesse bei der Verminderung der realen Sedimentkonzentrationen keine entscheidende Rolle. Das Schwermetall Cadmium ist im Gegensatz zum TBT kaum flüchtig und es liegt nahe, dass nach dem Spiken im Laufe des Ethanol-Abdampfens weniger Substanz verloren geht.

Dass trotzdem ca. 33% der Substanz nicht mehr analytisch nachzuweisen sind, könnte daran liegen, dass Cadmium relativ gut wasserlöslich ist (MERCK SCHUCHARDT OHG, 2006b). Deshalb geht auch bei dieser Testsubstanz ein relativ großer Anteil in das Poren- bzw. Überstandswasser über. Die Messungen am Ende des Experimentes bestätigen diese These allerdings nicht, da die Konzentrationen im Überstandswasser im Nanogramm pro Literbereich liegen (0,19 µg/L, Kap. 3.4). Als weitere Cd-Senke kommt, ähnlich wie beim TBT, die Bioakkumulation der Substanz durch die Chironomidenlarven in Betracht (BARJAKTAROVIC & BENDELL-YOUNG, 2001; BERVOETS et al., 2004). Allerdings ist auch bei Cd aufgrund der niedrigen Biomasse der Larven davon auszugehen, dass ein nur ein geringer Teil der Substanz akkumuliert wird. Außerdem sind Chironomiden in der Lage, aufgenommenes Cadmium entweder bereits als Larve (POSTMA et al., 1996) oder bei der Metamorphose mittels der Exuvie wieder abzugeben (GROENENDIJK et al., 1999a).

Im Allgemeinen werden die von der OECD-Richtlinie 218 geforderten chemischen Parameter in den Experimenten eingehalten (OECD, 2004a). Allerdings gibt es vereinzelte Testgefäße, in denen der von der OECD geforderte pH-Bereich (6 - 9) des rekonstituierten Wassers um eine pH-Einheit unterschritten wird. Diese Unterschreitung des Toleranzbereiches führt jedoch zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die Larvalmortalität oder auf den Schlupfzeitpunkt der Tiere in den Kontrollgruppen (Pearson-Korrelation, $p > 0,05$). In den Experimenten werden am Ende der Tests in einigen Kristallisierschalen erhöhte Leitfähigkeiten bis zu Maximalwerten von 2 mS/cm gemessen. Diese hohen Leitfähigkeiten sind mit dem Nachfüllen von rekonstruiertem Wasser bei auftretenden Verdunstungsverlusten zu erklären. Auch für die Leitfähigkeit wird keine signifikante Korrelation mit einzelnen Life-Cycle-Parametern von *C. riparius* in den



Kontrollgruppen ermittelt (Pearson-Korrelation, $p > 0,05$). Die Ergebnisse stimmen gut mit Studien von BERVOETS et al. (1996) überein, wobei in Laborstudien ebenfalls eine große Toleranz von *C. riparius* gegenüber dem Salzgehalt festgestellt wurde.

Eine weitere Unsicherheit in den Experimenten sind die Temperaturschwankungen innerhalb des Klimaraumes. So wird in einzelnen Schalen eine von der OECD-Richtlinie abweichende Temperatur von maximal $\pm 2^{\circ}\text{C}$ festgestellt. Diese abweichenden Temperaturen treten vor Allem im Winterhalbjahr auf und werden nur teilweise durch die regelmäßige Randomisierung der Kristallisierschalenstandorte kompensiert. Der Aspekt der Temperaturschwankungen ist als besonders kritisch anzusehen, da einzelne Life-Cycle-Parameter durch Temperaturschwankungen stark beeinflusst werden (PUPP, 2005; VOGT et al., akzeptiert). Dadurch kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse der Multigenerationsstudien kommen. So verkürzt sich z.B. der mittlere Schlupfzeitpunkt der Tiere mit steigenden Temperaturen, bis hin zu einer Maximaltemperatur, signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$; STEVENS, 1998; PUPP, 2005). Weitere temperaturabhängige Parameter sind das Gewicht der Imagines und die Flügelgröße, wobei bei wärmeren Temperaturen kleiner Tiere beobachtet werden (SURAKARN & YANO, 1995; FROUZ et al., 2002; VOGT et al., akzeptiert).

Da die Kontrollpopulationen mit den behandelten Gruppen stets zur selben Zeit verglichen werden, kann der Einfluss von Temperaturschwankungen vernachlässigt werden. Auch die hohe Anzahl an Testgefäßen wirkt sich ausgleichend auf die einzelnen Life-Cycle-Parameter aus.

Ökotoxikologische Vorexperimente mit Tributylzinn und Cadmium

In den Vorexperimenten werden die Effekte von Tributylzinn und Cadmium auf die Entwicklung und Reproduktion von *Chironomus riparius* untersucht (VOGT et al., 2007a). Die Experimente dienen als Vorbereitung für die folgenden Multigenerationsstudien und erfüllen die Validitätskriterien der OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a). Nur beim pH-Wert wird eine Abweichung der Testparameter ermittelt. Dieser soll nach der OECD-Richtlinie im gesamten Versuchszeitraum zwischen 6 und 9 liegen, wird aber in den Vorexperimenten geringfügig um 0,5 unterschritten.

In den Vorexperimenten wird festgestellt, dass das Sediment ohne organischen Kohlenstoffanteil keinen negativen Effekt auf die Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius* hat und für die Multigenerationsstudien geeignet ist. Weiterhin gibt es keine



Unterschiede zwischen den Kontrollen mit Hälterungswasser und den Lösemittelkontrollen, deshalb kann ein Effekt von Ethanol bei dem gewählten Testdesign ausgeschlossen werden. Die Vorexperimente werden auch durchgeführt, um eine geeignete Larvendichte und ein geeignetes Sediment:Wasser-Verhältnis zu ermitteln. Da keine signifikanten Unterschiede der Endpunkte zwischen beiden Testdesigns existieren, wird die Variante mit den Kristallisierschalen (50 Larven) ausgewählt, was ein populationsrelevantes Testdesign (bzgl. Der Populationsgröße) bei relativ geringem experimentellem Aufwand ermöglicht.

Die Ergebnisse der Vorstudien zeigen, dass bei dem gewählten Testdesign beide Testsubstanzen in der Lage sind, das Wachstum und die Reproduktion von *C. riparius* zu beeinflussen (Kap. 3.2). Die beobachteten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen decken dabei den chronischen sowie den akuten Wirkungsbereich ab (Abb. 5). Da der ermittelte LC₅₀-Wert für Cadmium ca. 100-mal höher ist als für TBT (bezogen auf TBT als Sn), wird deutlich, dass TBT ein wesentlich höheres toxikologisches Potential besitzt als Cadmium. Andere Studien mit Chironomiden bestätigen das hohe toxikologische Potential von TBT (FARGASOVA, 1998; HAHN & SCHULZ, 2002; GILDEMEISTER, 2007).

Im Gegensatz dazu ist Cadmium weniger toxisch. Für Cadmium werden für *C. riparius* in der Literatur LC₅₀-Werte zwischen 1,64 und 39 mg Cd/kg TG in Abhängigkeit vom organischen Kohlenstoffanteil des Sediments beschrieben. MILANI et al. (2003) berechnen einen LC₅₀-Wert von 39 mg/kg TG in einer Studie mit *C. riparius*-Larven, welche gegenüber einem natürlichen Sediment mit einem Kohlenstoffanteil von 3% exponiert werden. Weiterhin ermittelt die Autorin einer Studie mit Cadmium und *C. riparius* bei einem OECD-Richtlinie 218 konformen Sediment (Kohlenstoffanteil 5%) einen LC₅₀-Wert von 1,64 mg Cd/kg TG (PEDINA, 2001). Eine dritte Studie kommt zu dem Schluss, dass ein künstliches Sediment mit 15% Kohlenstoffanteil bei einer Konzentration von 2 mg Cd/kg TG zu einer Mortalität von 13% führt (WATTS & PASCOE, 2000a). Diese Studien zeigen, dass verschiedene Testdesigns in unterschiedlichen Ergebnissen resultieren und Vorexperimente für die Bestimmung von geeigneten Testkonzentrationen unerlässlich sind. Da in den Vorstudien wenige tote L4-Larven sowie tote Puppen gefunden werden, sind vermutlich hauptsächlich die jüngeren Larvalstadien durch die Substanzexposition beeinflusst. Erhöhte Mortalitäten sind auf Effekte in diesen Entwicklungsphasen zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse werden auch von



PASCOE et al. (1989) beschrieben, wobei die jüngeren Larvalstadien empfindlicher gegenüber Cadmium sind.

In den Vorexperimenten tritt keine Abweichung des Weibchenanteils auf. Ähnliche Ergebnisse werden in einer Studie mit Cd und *C. riparius* ermittelt (WATTS & PASCOE, 2000a). Der Weibchenanteil scheint für diese Art kein sensitiver Parameter zu sein.

Weiterhin wird der mittlere Emergenzzeitpunkt für beide Geschlechter berechnet, wobei dieser für die Lösemittelkontrollen beider Experimente gleich ist (Abb. 6). Die Männchen schlüpfen am 20. und die Weibchen am 24. Versuchstag, so dass eine klassische Form der Protandrie beobachtet wird, da die Männchen stets eher als die Weibchen schlüpfen. Dieses natürliche Phänomen (ARMITAGE et al., 1995) wird in zahlreichen Laborstudien (PASCOE et al., 1989; MCCAHERN & PASCOE, 1991) beobachtet. Bis heute sind keine Experimente bekannt, in denen ein abweichendes Schlupfverhalten durch Chemikalien induziert wird. Deutliche Effekte auf den EmT_{50} -Wert werden bei den TBT-Konzentrationen von 5,58 und 11,2 $\mu\text{g Sn/kg TG}$ beobachtet. In diesen Behandlungen schlüpfen die Tiere beider Geschlechter signifikant später. Eine Inhibition des Wachstums tritt ebenfalls im Experiment mit Cd auf, wobei allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Lösemittelkontrolle vorliegen. Dieses kann auf die niedrige Replikanzahl zurückgeführt werden. Für Cadmium kann eine Verzögerung des Schlupfes auch in zahlreichen weiteren Untersuchungen mit Chironomiden bestätigt werden (PASCOE et al., 1989; MCCAHERN & PASCOE, 1991; SILDANCHANDRA & CRANE, 2000; MILANI et al., 2003). Neben dem EmT_{50} wird auch das Hauptschlupfintervall beeinflusst. In den TBT-Ansätzen schlüpfen die Tiere zwar später, aber konzentrationsunabhängig über einen annähernd gleichen Zeitraum. Die verminderte Reproduktion kann deshalb nicht durch ein eventuell fehlendes Zusammentreffen von Weibchen und Männchen erklärt werden. Im Gegensatz dazu sind nach Cd-Exposition, neben einer signifikanten Verzögerung des Schlupfes auch deutliche Effekte auf das Hauptschlupfintervall zu erkennen. Die Tiere in den Expositionsgruppen schlüpfen über einen längeren Zeitraum. Die daraus resultierende Verringerung der effektiven Schwarmgrößen könnte einen indirekten Einfluss der Substanz auf die Reproduktion darstellen.

In den Vorexperimenten wird die OECD-Richtlinie 218 um reproduktionsrelevante Parametern erweitert, um die Durchführbarkeit der Multigenerationsstudien abschätzen zu können. Dabei ist die in Anlehnung an BENOIT et al. (1997) gewählte Methode zur Abschätzung der Gelegegröße gut geeignet (Abb. 7). Beide Substanzen scheinen



die Reproduktion bei höheren Konzentrationen negativ zu beeinflussen, allerdings werden aufgrund der einfachen Replikation keine signifikanten Unterschiede ermittelt (Tab. 12). Das Phänomen der Inhibition der Reproduktion wurde auch von PEDINA (2001) beobachtet. In diesen Experimenten verminderte sich die Gelegegröße von ca. 330 Eiern/Gelege in der Kontrolle auf 200 Eier/Gelege bei einer Cd-Konzentration von 3 mg Cd/kg TG. In den Experimenten mit TBT werden allerdings keine Effekt auf die Gelegegröße ermittelt. Außerdem wird bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG eine geringere Schlupfrate der produzierten Gelege mit nur 40% beobachtet. Ähnliche Effekte konnten bei *C. riparius* nach Exposition gegenüber dem Insektizid ¹⁴C-Cypermethrin ermittelt werden (HOOPER et al., 2003). Für die Anzahl an Gelegen, die nicht die regelmäßige spiralförmige Form aufweisen, wird kein Substanzeffekt vermutet, da dieses Phänomen sowohl in den Behandlungen als auch in den Kontrollen und Lösemittelkontrollen auftritt.

Ein weiterer wichtiger Endpunkt ist die Larvenzahl in der F1-Generation. Ist diese zu gering, können die Multigenerationsstudien nicht erfolgreich durchgeführt werden. Hinsichtlich dieses Endpunktes wird eine klare Konzentrations-Wirkungsbeziehung festgestellt (Tab. 12). Bei hohen Konzentrationen vermindert sich die Anzahl an F1-Larven deutlich. Die exponierten Populationen sind bei höheren Konzentrationen einem höheren Aussterberisiko ausgesetzt.

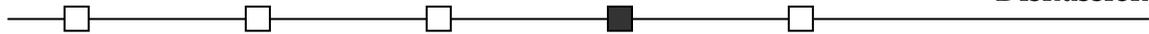
Weiterhin wird im Vorexperiment mit TBT das Trockengewicht der adulten Imagines ermittelt. Die Männchen sind stets signifikant ($p < 0,001$, t-Test) leichter als die Weibchen. Diese Tatsache kann mit der Eiablage der Weibchen erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass nicht alle Weibchen erfolgreich ein Gelege produzieren und nach dem Tod noch unabgelegte Gelege das Gewicht erhöhen. Das Trockengewicht der Tiere wird nur in der höchsten TBT-Konzentration beeinflusst, und die Männchen sind signifikant leichter ($p < 0,05$, t-Test) als in der Lösemittelkontrolle. Diese Tatsache scheint auf generelle Toxizitäten hinzuweisen, da die adulten Tiere von Nahrungsdepots der Larven profitieren und diese bei höherer Schadstoffbelastung vermutlich mehr Energie in die Schadstoffelimination als in den Aufbau von Biomasse investieren. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Larvengewichtes werden für belastete Freiland sedimente (WENTSEL et al., 1977) und bei Cd-Exposition (PASCOE et al., 1989; WATTS & PASCOE, 2000a) berichtet. Im Gegensatz dazu zeigen Studien mit ¹⁴C-Cypermethrin (HOOPER et al., 2003) und Cd (MCCAHOON & PASCOE, 1991) erhöhte Trockengewichte der Tiere. Die



Aussagekraft dieses Parameters ist kritisch zu betrachten, und vieles deutet darauf hin, dass der Konzentrationsbereich der Testsubstanzen entscheidend ist.

Neben zahlreichen Einzelparametern wird auch die Populationswachstumsrate (PWR) in Anlehnung an FORBES und COLD (2005) und SIBLEY et al. (1997) berechnet, um Aussagen der Substanzexposition vom Einzelindividuum auf die Populationsebene ableiten zu können (HOMMEN, 2005). Für die beiden Lösemittelkontrollen des TBT- und Cd-Experimentes werden hohe PWR von $1,22 \text{ d}^{-1}$ (TBT) und $1,26 \text{ d}^{-1}$ (Cd) ermittelt (Abb. 8). Ähnlich hohe PWR mit $1,28 \text{ d}^{-1}$ werden für *C. riparius* bei der Anwendung des DEBtox-Models von LOPES et al. (2005) ermittelt. In niedrigen Konzentrationen führt TBT zu einer leichten Steigerung der PWR, während höhere Konzentrationen in deutlich niedrigeren PWR resultieren. Für beide Substanzen kann eine signifikante Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$) ermittelt werden, wobei höhere Konzentration stets zu niedrigeren PWR führen. Diese Tatsache wird auch in weiteren Studien ermittelt, z.B. bei der Exposition gegenüber Pestiziden (HOOPER et al., 2003; FORBES & COLD, 2005; LOPES et al., 2005). Trotz der deutlichen Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Entwicklung und Reproduktion sind die berechneten PWR stets über $1,0 \text{ d}^{-1}$ und unter den gewählten Standardbedingungen wachsen daher die Populationen sogar in den höchsten Konzentrationen weiter. Als Erklärung kann die hohe Eizahl pro Gelege herangezogen werden, was besonders gut in der höchsten TBT-Konzentration zu sehen ist. In dieser Behandlung wird insgesamt nur ein Gelege produziert, wobei die Gelegegröße mit 495 Eier geschätzt wird (Tab. 12). Folglich kann sich die nächste Generation aus potentiell 495 L1-Larven entwickeln, und die Anzahl an Tieren hat sich im Vergleich zum Versuchsbeginn (100 Larven eingesetzt) deutlich erhöht. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gewählten Konzentrationen zu deutlichen Effekten, aber nicht zu einem akuten Aussterberisiko unter Laborbedingungen führen, sofern nicht andere Faktoren (z.B. Prädation, Nahrungsmangel, Pathogene) berücksichtigt werden, die unter Freilandbedingungen zu einer erhöhten Mortalität der Larven beitragen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen werden für die folgenden Experimente TBT-Nominalkonzentrationen ausgewählt, die im Bereich des LC_{50} -Wertes ($116 \mu\text{g Sn/kg TG}$) liegen (80, 120 und $160 \mu\text{g Sn/kg TG}$). Für die Zweitstressorstudien mit Cadmium wird eine Nominalkonzentration im Bereich des LC_{50} -Wertes eingesetzt ($1,2 \text{ mg/kg TG}$).



4.2 Einfluss des Testdesigns in den Multigenerationsstudien

Aufgrund der umfangreichen Datengrundlage können für das gewählte Testsystem generelle Aussagen abgeleitet werden. Zum Ersten wird überprüft, ob Auswirkungen des Testdesigns auf die Entwicklung und Reproduktion von *Chironomus riparius* vorliegen und ob es im Life-Cycle-Test generelle Zusammenhänge zwischen einzelnen Parametern gibt. Weiterhin wird im Rahmen der MGS III ein eventueller jahreszeitlicher Einfluss und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse näher betrachtet.

Einfluss des Testdesigns unter Kontrollbedingungen

In den Multigenerationsstudien werden große Schwankungen einzelner Life-Cycle-Parameter festgestellt (Kap. 3.3). Davon sind vor allem die Mortalität und der mittlere Schlupfzeitpunkt betroffen. Im Vergleich dazu ist die Variation des Weibchenanteils, der reproduktionsrelevanten Endpunkte und der abgeleiteten Populationswachstumsrate deutlich niedriger. Schwankungen werden unabhängig von der Exposition (LMK & TBT) in beiden Populationen (GEN+ & GEN-) aller drei Mehrgenerationenstudien beobachtet.

Die Mortalität variiert in den Kontrollgruppen beider Populationen (GEN+LMK & GEN-LMK) in allen drei MGS zwischen 6 und 70%, wobei eine durchschnittliche Mortalität von 25,2% (SD \pm 18,2%) berechnet wird (Kap. 3.3). Laut der OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a) ist der Life-Cycle-Test mit *C. riparius* nur valide, wenn die Kontrollmortalität niedriger als 30% ist. Das Validitätskriterium wird in 19 der 62 untersuchten Generationen nicht eingehalten. Diese Generationen dürften für die Chemikalienbewertung im Rahmen des TGD nicht berücksichtigt werden (EU, 2003). Da eine Risikobewertung für TBT jedoch nicht Ziel dieser Studie war, werden nicht valide Generationen trotzdem für die Auswertung herangezogen.

Starke Schwankungen der Mortalität scheinen im Verlauf von Mehrgenerationenstudien für *C. riparius* ein normales Phänomen zu sein. Ähnlich große Variationen werden beispielsweise auch von DE BISTHOVEN et al. (2001) in einer Multigenerationsstudie über 10 Generationen festgestellt. In dieser Studie beträgt die Mortalität innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen 10 und 80%. Auch POSTMA und DAVIDS (1995) zeigen in Mehrgenerationenstudien starke Schwankungen der Mortalität von *C. riparius* auf. Bezüglich hoher Kontrollmortalitäten gibt es allerdings wenige Vergleichsstudien in der Literatur, da nicht valide Experimente zumeist unveröffentlicht bleiben.



Aufgrund der in allen Kontrollgruppen hohen durchschnittlichen Mortalität von 25,2% (SD \pm 18,2%) liegt die Vermutung nahe, dass die Larven unter suboptimalen Hälterungsbedingungen aufgezogen wurden. Als Hauptursache wird das nicht OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a) konforme Sediment und das Futterregime angenommen. Laut OECD-Richtlinie 218 setzt sich das Testsediment für Life-Cycle-Experimente mit *C. riparius* aus 5% organischem Material (Torf), 20% Lehm und 75% Sand zusammen (bzgl. Massen-%). Im Gegensatz zu der von der OECD vorgeschlagenen Sedimentzusammensetzung werden die MGS mit reinem Quarzsand durchgeführt. So können mögliche Pilzinfektionen ausgeschlossen und eine leichtere Durchführbarkeit der MGS gewährleistet werden (Kap. 2.4). Chironomiden ernähren sich in natürlichen Sedimenten größtenteils von Detritus (PINDER, 1986; ARMITAGE et al., 1995) und der im OECD Sediment vorhandene Torf stellt eine zusätzliche Nahrungsquelle für die Tiere dar. Zusätzlich wird in den OECD-konformen Experimenten mit 0,25 bzw. 0,5 mg/Larve/Tag Fischfutter bis zum zehnten Tag zugefüttert. Anschließend wird die Futtermenge bis zum Schlupf der Imagines weiter erhöht. Deshalb ist die Futterversorgung besser als in den MGS. Die Nahrungslimitierung wirkt sich möglicherweise negativ auf die Fitness der Tiere aus, und deshalb kann es zu erhöhten Mortalitäten kommen (POSTMA et al., 1994).

Des Weiteren fördert das OECD-Sediment aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften den Bau von Wohnröhren, die die Tiere unter natürlichen Bedingungen vor Fraßfeinden schützen (ARMITAGE et al., 1995). Im reinen Quarzsand scheint es den Larven nur schwer möglich, Wohnröhren zu bauen, und frühe Entwicklungsstadien sind dadurch vermutlich einem zusätzlichen Stress ausgesetzt, welcher ebenfalls zu einer höheren Kontrollmortalität führen kann.

Ein weiterer Hinweis für suboptimale Hälterungsbedingungen ist der mittlere Schlupfzeitpunkt der Tiere. Die Imagines schlüpfen in allen Kontrollgruppen nach durchschnittlich 20,6 d (SD \pm 1,57 d). Im Rahmen der von der OECD-Richtlinie 218 geforderten Schlupfperiode sollte der Hauptschlupf der Tiere zwischen dem 12. und 23. Versuchstag stattfinden. Die ermittelten Schlupfzeitpunkte befinden sich, ähnlich wie die Mortalität, am oberen Toleranzbereich der OECD-Richtlinie 218. Dieser Sachverhalt wird auch anhand der Verteilung der absoluten Häufigkeiten deutlich (Abb. 23). In zahlreichen Kontrollgruppen erfolgt die Emergenz zwischen dem 19. und 21. Tag. Allerdings werden in sieben Generationen auch spätere Schlupfzeitpunkte

zwischen dem 23. und 25. Tag festgestellt. In Vergleichsstudien mit *C. riparius*, die mit OECD-konformem Sediment durchgeführt wurden, schlüpfen die Tiere zumeist früher, so in Studien von WATTS und PASCOE (1996, 2000b) nach ca. 15-17 Tagen. Auch die relativ späten Schlupfzeitpunkte sind vermutlich auf die Futterversorgung zurückzuführen (PERY et al., 2002).

Die Verschiebung des Emergenzzeitpunktes erfolgt geschlechtsunabhängig. So schlüpfen die Weibchen immer dann signifikant später, wenn auch die Männchen später schlüpfen (Pearson-Korrelation, $p < 0,001$). Die natürliche Protandrie wird in allen Kontrollgruppen beobachtet und ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (ARMITAGE et al., 1995). Der Weibchenanteil beträgt im Durchschnitt in allen Kontrollgruppen $0,50$ ($SD \pm 0,03$).

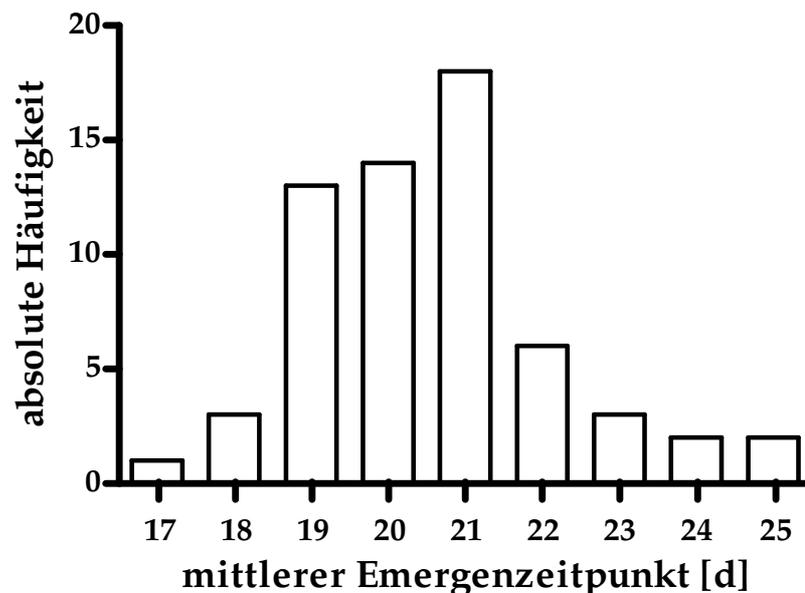


Abb. 23: Absolute Häufigkeit der mittleren Emergenzzeitpunkte in den drei Multigenerationsstudien mit *Chironomus riparius*. Dargestellt sind die Kontrollpopulationen von GEN+ und GEN- zusammen ($n = 62$).

Für reproduktionsrelevante Endpunkte werden keine Validitätsvorgaben durch die OECD-Richtlinie 218 festgelegt. Zur Zeit gibt es allerdings Bestrebungen, die bestehende Richtlinie zu einem vollen Life-Cycle-Test (alle Entwicklungsstadien, inkl. Reproduktion) für die Ermittlung von endokrinen Substanzeffekten weiter zu entwickeln (TAENZLER et al., 2007).



Da *Chironomus riparius* im Labor gut zu haltem ist und die Reproduktion nicht an ein großes Schwarmvolumen gebunden ist (STRELOKE & KÖPP, 1995; VOGT, 2003), findet die Reproduktion der Tiere auch in den relativ kleinen Reproduktionsbehalttern sehr erfolgreich statt. Jedes Weibchen der Kontrollgruppen produziert im Durchschnitt 1,07 Gelege (SD \pm 0,20), wovon stets ein hoher Anteil (durchschnittlich 85,3%, SD \pm 10,2%) fruchtbar ist. Somit produziert jedes Weibchen im Durchschnitt 0,92 fruchtbare Gelege (SD \pm 0,22). Die Gelege beinhalten im Mittel 457 Eier (SD \pm 51,3), und jedes Weibchen produziert ca. 379 fruchtbare Eier (SD \pm 103). Diese Werte stimmen gut mit der Literatur überein (DUCROT et al., 2004; FORBES & COLD, 2005; PERY & GARRIC, 2006; TAENZLER et al., 2007). POSTMA et al. (1994) geben z.B. die Eizahl pro *C. riparius*-Weibchen bei *ad libitum* Futterbedingungen mit 400 an. Diese Tatsache steht im Gegensatz zur angenommenen Futterlimitierung in den Versuchen, da sich diese ebenfalls negativ auf die Gelegegröße auswirkt. Weibchen die zwischen dem Ende des larvalen Langenzwachstums und dem Beginn der Emergenz mit weniger als 0,5 mg/Larve/d gefuttet wurden produzieren deutlich kleinere Gelege (PERY et al., 2002).

Die durchschnittliche Populationswachstumsrate in den Kontrollpopulationen beträgt 1,26 d⁻¹ (SD \pm 0,04 d⁻¹). Dieser hohe Wert kommt zustande, da sich die Larven trotz der suboptimalen Sedimentzusammensetzung gut entwickeln und die Weibchen große Gelege produzieren. Außerdem wird bei der Berechnung von einer stabilen Altersklassenverteilung ausgegangen (HOMMEN, 2005). Die ermittelte PWR stimmt mit anderen in der Literatur angegebenen Werten überein (1,28 d⁻¹, LOPES et al., 2005).

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

In der MGS III kann die Reproduzierbarkeit der Life-Cycle-Parameter aufgrund der doppelten Replikation bewertet werden (Kap. 2.4). Im Allgemeinen wirken sich die stark schwankenden Life-Cycle-Parameter negativ auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die generelle Aussagekraft der Studien aus. In mehreren Generationen ist die Mortalität und der mittlere Schlupfzeitpunkt sowohl in beiden GEN+LMK (4x) als auch in beiden GEN+TBT (7x) zwischen beiden Replikaten signifikant ($p < 0,05$, t-Test) unterschiedlich (Daten nicht dargestellt). Für die statistische Auswertung hätten in diesen Fällen die beiden jeweiligen Replikaten nicht zusammengefasst werden dürfen (Kap. 2.9). Um die MGS trotzdem einheitlich auswerten zu können, wurde dieses jedoch ignoriert.

Bezüglich der reproduktionsrelevanten Parameter werden zwischen den jeweiligen Populationen kaum signifikante Unterschiede festgestellt, da für die Berechnung der Gelegeanzahl pro Weibchen nur ein Replikat zur Verfügung stand (Kap. 2.4). Bezüglich der Gelegegrößen werden ebenfalls kaum Unterschiede zwischen den jeweiligen Populationen festgestellt, was durch die große Schwankung innerhalb des Datensatzes zu erklären ist. Als Variationsquelle für die Schwankungen wird eine zeitliche Abhängigkeit identifiziert, wobei die Weibchen zu Beginn der Eiablageperiode größere Gelege produzieren als am Ende (Abb. 24). Zum Ende der Eiablageperiode nimmt auch die Variation der Gelegegröße zu. Die Gelegegrößen weisen deshalb eine zweigipflige Verteilungsfunktion und keine Gaußsche Normalverteilung auf (VOGT, 2003).

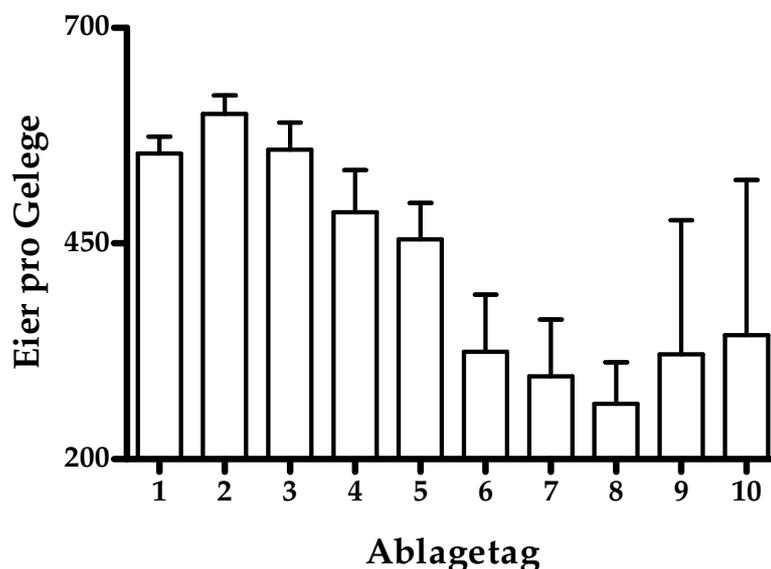


Abb. 24: Durchschnittliche Gelegegröße (\pm SD) von *Chironomus riparius* in Abhängigkeit vom Ablagetag.

Im Gegensatz zu den schwankenden Life-Cycle-Parametern ist die Populationswachstumsrate als integrierter Parameter relativ konstant reproduzierbar (Abb. 25). Nur in wenigen Generationen werden unabhängig von der Exposition deutliche Abweichungen festgestellt. Die gute Reproduzierbarkeit der PWR ist vermutlich durch die Berücksichtigung von Entwicklungs- und Reproduktionsparametern zu erklären. So ist bekannt, dass Chironomidenlarven über ein gewisses Energiebudget verfügen (PERY et al., 2002; DUCROT et al., 2004), das die Larven möglicherweise verstärkt in ein schnelleres Wachstum investieren, um z.B. der Schadstoffexposition zu entgehen. Deshalb kommt es zu kürzeren Larvalentwicklungs-

zeiten und zu höheren Mortalitäten. Zusätzlich findet die Reifung der Gonaden und die Vitellogenese der Weibchen bereits während der späteren Larvalstadien statt (HOFFMANN, 1995), so dass die Weibchen weniger Energie in Wachstumsprozesse investieren und verstärkt Energie für die Vitellogenese aufwenden. Durch unterschiedliche Strategien kommt es zwischen den jeweiligen Replikaten zu signifikanten Unterschieden der Einzelparameter (z.B. EmT_{50} -Wert), aber nicht zu unterschiedlichen PWR.

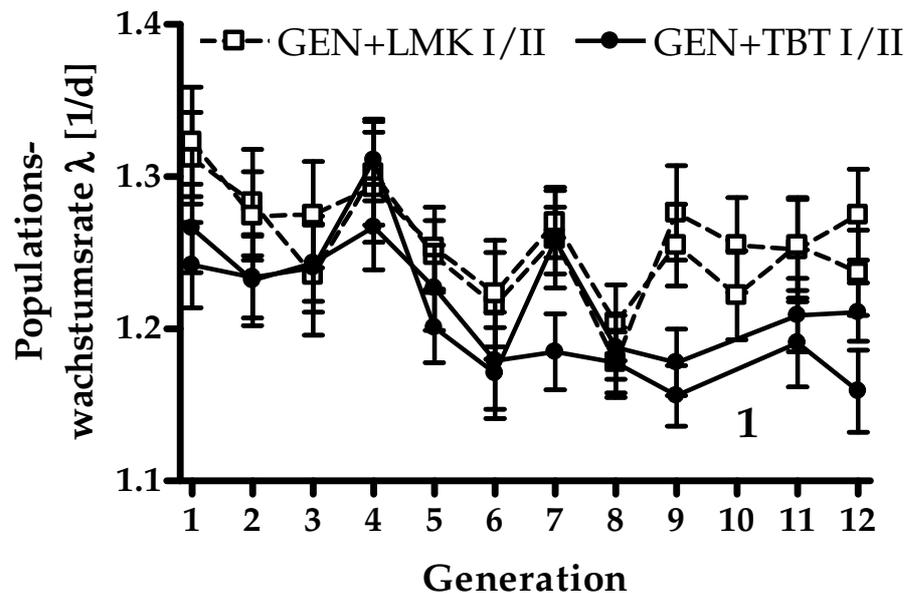


Abb. 25: Populationswachstumsrate (\pm SD, in d^{-1}) in der MGS III (gestrichelte Linie, offenes Viereck – GEN+LMK I/II, geschlossener Punkt, durchgezogene Linie GEN+ TBT I/II, ¹ PWR aufgrund von zu hoher Mortalität (100%) nicht kalkulierbar.

Unterschiede zwischen den PWR der beiden Replikate deuten auf systemimmanente Variationsquellen hin. So beeinflussen zufällige und systemische Fehler die Reproduzierbarkeit entscheidend. Eine Variationsquelle ist die Auswahl der Gelege, aus denen die nächste Generation aufgebaut wird (Kap. 2.4). Obwohl der Auswahlzeitraum definiert ist, variiert die absolute Anzahl an Gelegen, aus denen die nächste Generation angesetzt wird (Abb. 26). Die Gelegezahl spiegelt sich ebenfalls in der Anzahl an Larven wider, die für den Aufbau der nächsten Generation zur Verfügung standen ($n = 350$, Kap. 2.4). So wird z.B. in einigen Generation (z.B. GEN+LMK I, Generation drei) fast jede zehnte L1-Larve für die nächste Generation eingesetzt. Da bekannt ist, dass die Anzahl an Nachkommen einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der

genetische Drift hat (FRANKHAM et al., 2002), sollte das variable Auswahlverfahren in zukünftigen MGS durch eine definierte Gelegeanzahl für den Aufbau der nächsten Generation ersetzt werden. Dadurch kann die Vergleichbarkeit der jeweiligen Populationen verbessert werden. Bei der Auswahl der Larven für die nächste Generation wird darauf geachtet, eine repräsentative Stichprobe für die nächste Generation zu selektieren. Die Auswahl erfolgt nach festgesetzten Kriterien (z.B. Fitness bzw. Größe der Larven, Kap. 2.4). Allerdings kann dies in einigen Generationen, besonders bei wenigen Nachkommen, nicht immer gewährleistet werden.

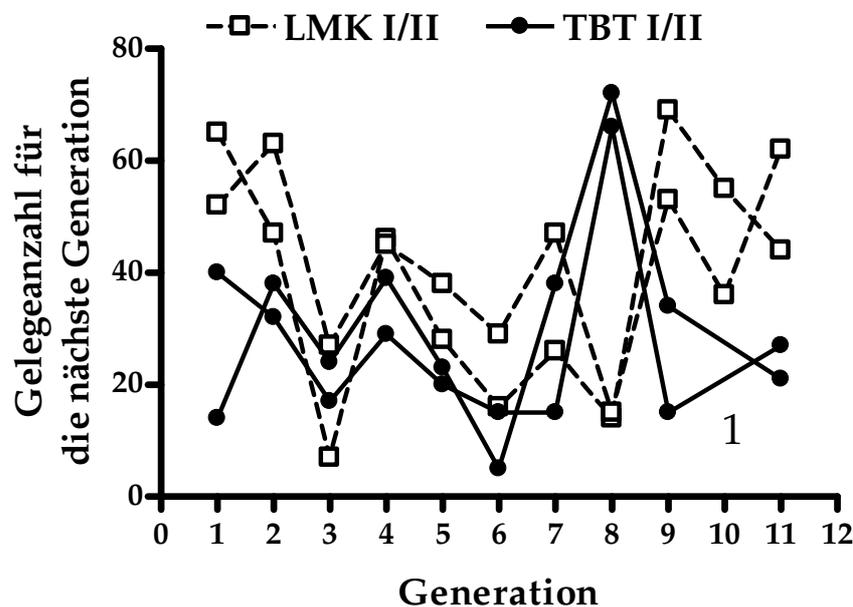


Abb. 26: Gelegezahl, die für den Aufbau der nächsten Generation in der MGS III ausgewählt wurden (gestrichelte Linie, offenes Viereck – GEN+LMK I/II, geschlossener Punkt, durchgezogene Linie GEN+ TBT I/II, ¹ – ausgefallene Generation aufgrund von zu hoher Mortalität).

Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist der Zeitpunkt, an dem die Gelege für die nächste Generation entnommen werden (Abb. 27, Kap. 2.4). So führt die Auswahl der Gelege im Maximalablegezeitraum zu einer gerichteten Selektion auf Gelege, die im mittleren Zeitfenster der Eiablage produziert werden. Die Merkmale von besonders zeitig geschlüpften Männchen bzw. besonders spät geschlüpften Weibchen werden deshalb nicht an die Folgegeneration weiter gegeben. Um diesen Effekt abschätzen zu können, wird ein Life-Cycle-Experiment über eine Generation (MGS III – Generation 8) mit Gelegen aus der Haupt- sowie einer verfrühten Eiablageperiode unter Kontrollbedingungen durchgeführt.

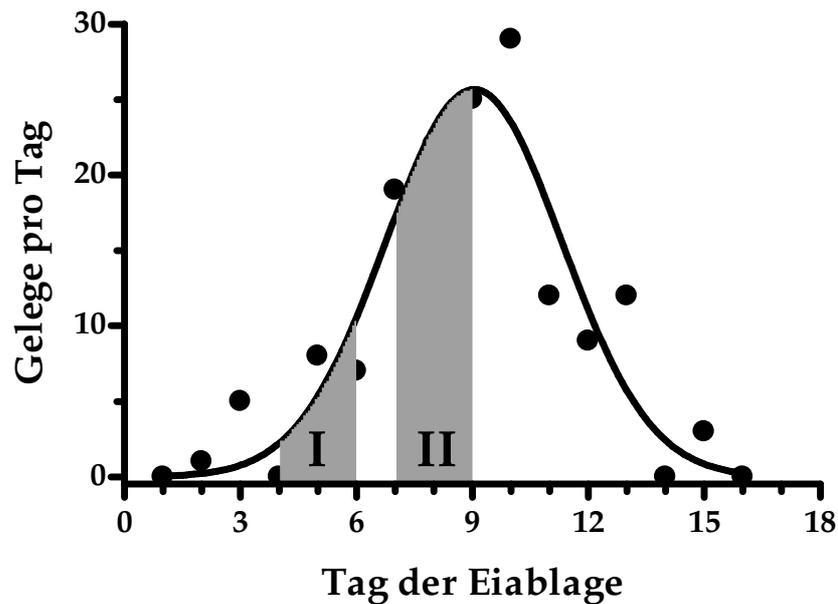


Abb. 27: Gaußsche Verteilungsfunktion der Eiablage der Weibchen und Auswahlzeitraum der Gelege für das Experiment (I verfrühte und II Haupteiablageperiode)

Die Ergebnisse dieser beiden Life-Cycle-Experimente weisen keinen signifikanten Unterschied einzelner Life-Cycle-Parameter auf. Die Auswirkungen solcher Selektionsprozesse sind demzufolge nicht stark genug, um bereits nach einer Generation Effekte hervor zu rufen. Es kann allerdings angenommen werden, dass es über zahlreiche Generationen zu signifikanten Unterschieden kommt.

Das Trockengewicht der Imagines wurde in einer Generation doppelt bestimmt (Generation drei, MGS I), um die Zuverlässigkeit der Messmethode zu überprüfen. Die Doppelwägung der Imagines bestätigt die Ergebnisse der Messung, und es werden keine signifikanten Unterschiede ermittelt ($p > 0,05$, t-Test). Demzufolge lässt sich das Trockengewicht der Tiere auch in einem so niedrigen Gewichtsbereich zuverlässig bestimmen. Außerdem ist die Trocknungsdauer von 72 h ausreichend (bei 34°C), da nach weiteren 24 h keine signifikanten Gewichtsunterschiede aus dem Verlust von Körperflüssigkeit resultieren.

Jahreszeitliche Einflüsse

Neben Variationsquellen, die durch das Testdesign verursacht werden, können auch jahreszeitliche Einflüsse auf einzelne Life-Cycle-Parameter von *C. riparius* vermutet werden. In einigen Studien wurde bereits eine jahreszeitliche Abhängigkeit einiger

Einzelparameter von Freilandpopulationen beschrieben (GROENENDIJK et al., 1998, 1999b, 2002). Die beiden für die MGS verwendeten Populationen wurden allerdings bereits über einen längeren Zeitraum im Labor gehalten, und jahreszeitliche Einflüsse erscheinen daher auf den ersten Blick als eher unwahrscheinlich. Da der Klimaraum allerdings nicht komplett vom jahreszeitlichen Rhythmus isoliert ist (z.B. Tageslichtzutritt über Fenster), können trotzdem Abhängigkeiten vom Jahreszyklus vermutet werden. Die Mortalität ist in beiden Populationen über die Winter und Frühlingsmonate (Oktober - Mai) relativ niedrig (Abb. 28A) und beträgt stets weniger als 25% mit relativ geringen Variationen. In den Sommermonaten (Juni - September) steigt die Mortalität in beiden Population bis auf 50% an, und es werden deutlich größere Variationen festgestellt.

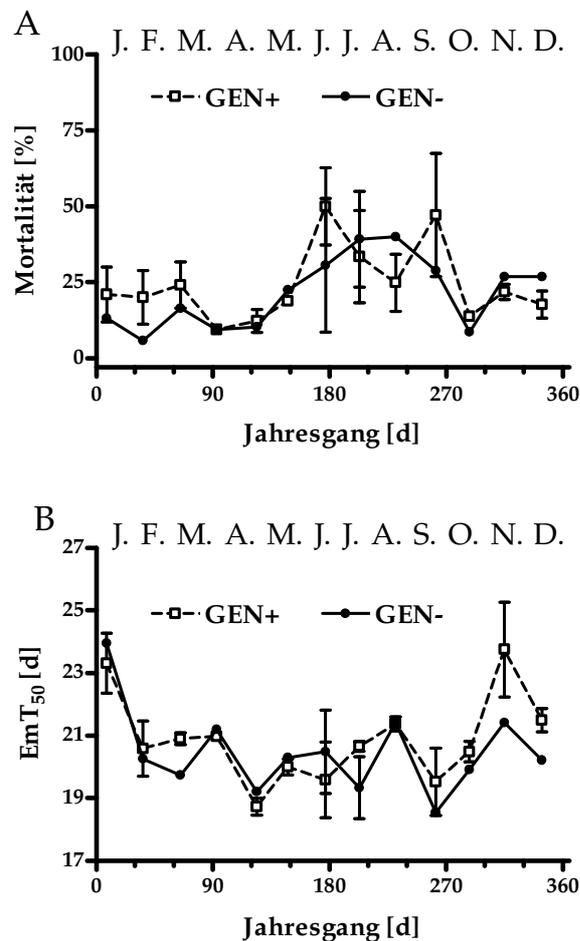


Abb. 28: *Chironomus riparius*. Mortalität (MW \pm SD in %, n = 1-2) (A) und mittlerer Emergenzzeitpunkt (MW \pm SD in d, n = 1-2) (B) der GEN+ (offenes Viereck, gestrichelte Linie) und der GEN- (geschlossener Kreis, durchgezogene Linie) über den Jahresgang (dargestellt in Tagen, Abkürzungen über den Grafiken entsprechen den jeweiligen Monaten).



In den Monaten Februar bis Oktober schlüpfen die Tiere beider Populationen zwischen dem 19. und 22. Versuchstag (Abb. 28B). Im Januar und November werden hingegen deutlich spätere mittlere Schlupfzeitpunkte beobachtet. Für die reproduktionsrelevanten Parameter und die PWR werden keine klaren Hinweise für jahreszeitliche Abhängigkeiten gefunden (Daten nicht dargestellt). Abschließend kann festgehalten werden, dass die Mortalität und der mittlere Schlupfzeitpunkt nur zwischen den jeweiligen Replikaten zum selben Zeitpunkt verglichen werden sollten.

Zusammenhänge zwischen einzelnen Life-Cycle-Parametern

Bei der Betrachtung aller Kontrollgruppen werden generelle Zusammenhänge einzelner Life-Cycle-Parameter deutlich (Tab. 24). So wird eine signifikante (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$) negative Korrelation zwischen der Mortalität und dem Emergenzzeitpunkt der Weibchen festgestellt, was mit dichteabhängigen Effekten und einem verbesserten Futterregime begründet werden kann (HOOPER et al., 2003). RISTOLA et al. (1999) zeigen in einer Studie mit *C. riparius* eine ähnliche Korrelation auf. Dabei wachsen Larven bei einer konstanten Futtermenge schneller bei niedrigen als bei hohen Larvendichten. Ein weiterer interessanter Zusammenhang liegt in der Tatsache, dass die Weibchen bei einer höheren durchschnittlichen Mortalität signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$) größere Gelege produzieren. Auch dieser Effekt kann indirekt durch eine geringe Larvendichte und das verbesserte Futterregime erklärt werden (PERY et al., 2002; HOOPER et al., 2003). Bemerkenswerterweise besteht auch ein signifikanter (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$) Zusammenhang zwischen dem Schlupfzeitpunkt der Weibchen und der Gelegegröße. Je früher die Weibchen schlüpfen, desto größer sind die Gelege. Diese Tatsache deutet drauf hin, dass es einen Optimalbereich gibt, in dem die weiblichen Tiere schlüpfen, um möglichst große Gelege zu produzieren.

Weiterhin existiert ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Abstand der mittleren Schlupfzeitpunkte und der Gelegezahl pro Weibchen. Je näher die männliche und die weibliche Emergenz zusammentreffen, desto mehr Gelege produzieren die Weibchen. Dieses ist durch die erhöhte Chance des Aufeinandertreffens von Weibchen und Männchen zu erklären.

Tab. 24: Signifikante Zusammenhänge einzelner Life-Cycle-Parameter in den Kontrollgruppen der drei Multigenerationsstudien (signifikante Zusammenhänge werden mittels Pearson-Korrelation bestimmt, ★ p < 0,05, ★★ p < 0,01, ★★★ p < 0,001, EmT₅₀ – mittlerer Schlupfzeitpunkt, ♂- Männchen, ♀ - Weibchen, n.c. – kein signifikanter Zusammenhang, (+) positive bzw. (-) negative Korrelation, n = 62).

Parameter	Mortalität [%]	EmT ₅₀ ♂ [d]	EmT ₅₀ ♀ [d]	Fruchtbarkeit pro ♀	Eier pro fruchtbar. Gelege	Fruchtbarkeit pro ♀	EmT ₅₀ ♀ - EmT ₅₀ ♂ [d]
Mortalität [%]		n.c.	★(-)	n.c.	★★(+)	n.c.	★★(-)
EmT ₅₀ ♂ [d]	n.c.		★★★(+)	n.c.	★★★(-)	n.c.	n.c.
EmT ₅₀ ♀ [d]	★(-)	★★★(+)		n.c.	★★★(-)	★(-)	★★★(+)
Fruchtbarkeit pro ♀	n.c.	n.c.	n.c.		n.c.	★★★(+)	★★(-)
Eier pro fruchtbar. Gelege	★★(+)	★★★(-)	★★★(-)	n.c.		★★(+)	n.c.
Fruchtbarkeit pro ♀	n.c.	n.c.	★(-)	★★★(+)	★★(+)		n.c.
EmT ₅₀ ♀ - EmT ₅₀ ♂ [d]	★★(-)	n.c.	★★★(+)	★★(-)	n.c.	n.c.	

Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass einzelne Life-Cycle-Parameter eingeschränkt reproduziert werden können, wobei dies besonders für die Mortalität und den mittleren Schlupfzeitpunkt zutrifft. Die reproduktiven Parameter sind davon nicht im selben Ausmaß betroffen. Deshalb sollte für die Auswertung der Experimente der integrative Parameter der Populationswachstumsrate herangezogen werden. Diese ist im Vergleich zu den anderen Life-Cycle-Parametern gut reproduzierbar (Abb. 25). In den Studien werden zahlreiche systemimmanente (z.B. Anzahl Gelege für die nächste Generation) und zufällig Variationsquellen identifiziert. Außerdem werden zahlreiche signifikante Zusammenhänge einzelner Life-Cycle-Parameter festgestellt (Tab. 24). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird im nächsten Abschnitt der Einfluss der TBT-Exposition auf die Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius*, vornehmlich anhand der Populationswachstumsraten, diskutiert und bewertet.



4.3 Effekte der TBT-Exposition in den Multigenerationsstudien

Obwohl die Variation zwischen den einzelnen Testgefäßen in einigen Endpunkten und den beiden Behandlungsgruppen groß ist, kann bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der Populationswachstumsraten eine Veränderung des Lebenszyklus von *C. riparius* vermutet werden. Diese wurde in der Literatur als eine mögliche Stressreaktion gegenüber Schadstoffen bereits aufgezeigt (POSTMA & DAVIDS, 1995; RISTOLA et al., 2001). Derartige Veränderungen können in Einzelgenerationenstudien nicht nachgewiesen werden.

In der ersten Generation der MGS I werden für GEN+TBT deutlich niedrigere Populationswachstumsraten im Vergleich zu GEN+LMK berechnet (Abb. 12A). Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Vorstudie mit TBT überein (VOGT et al., 2007a) und ist auf eine Verzögerung des mittleren Schlupfzeitpunktes zurückzuführen. Nach weiteren sechs Generationen, bei denen die PWR der GEN+LMK und der GEN+TBT annähernd gleich sind, steigt die PWR in der GEN+TBT sowohl absolut als auch relativ zur GEN+LMK an (Abb. 12A). Der Anstieg der PWR in den TBT-Behandlungsgruppen ist zum größten Teil auf die gesteigerte Reproduktion zurückzuführen. Im Vergleich zu GEN+LMK produzieren die Weibchen der GEN+TBT mehr Gelege, die in den letzten Generation auch noch signifikant ($p < 0,05$, U-Test) größer sind.

Vergleichbare Ergebnisse werden von RISTOLA et al. (2001) in einer Mehrgenerationsstudie mit *C. riparius* und 2,4,5-Trichlorophenol (0 - 505 $\mu\text{mol/kg}$) aufgezeigt. In dieser Studie werden nach chronischer Substanzexposition über drei Generationen keine unterschiedlichen Mortalitäten, allerdings ebenfalls Veränderungen des Lebenszyklus festgestellt. Die Weibchen weisen auch in dieser Studie einen erhöhten reproduktiven Output auf. Ähnliche Effekte auf den Lebenszyklus von *C. riparius* werden von POSTMA und DAVIDS (1995) in Multigenerationsstudien mit Cadmium ermittelt. In diesen Experimenten verringert sich die Gelegegröße bei relativ geringen Cd-Konzentrationen im Wasser (54,2 und 159,6 nM) in den ersten Generationen, während im Vergleich dazu nach sechs Generation deutlich größere Gelege festgestellt werden. Chironomiden sind somit in der Lage, ihren Lebenszyklus bei moderatem Schadstoffstress zu modifizieren. Dieses scheint eine generelle Stressreaktion zu sein, mit dem Ziel das Aussterberisiko für die exponierte Population zu minimieren. Die Geschwin-



digkeit der Reaktion wird dabei entscheidend von der Intensität des Stressors bzw. der Konzentration des Schadstoffs bestimmt.

In der GEN- wird das Phänomen eines veränderten Lebenszyklus in der MGS I nicht im selben Umfang beobachtet wie bei der genetisch variablen Population (Kap. 3.3.1). In den ersten Generationen hat die GEN- sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter TBT-Stress Schwierigkeiten, sich erfolgreich zu reproduzieren. Mit dem Auftreten von heterozygot vorliegenden Allelen verbessert sich die allgemeine Fitness der Population, und es werden langsam ansteigende PWR festgestellt.

Bei einer TBT-Konzentration von 4,46 µg Sn/kg TG wird anhand zahlreicher Life-Cycle-Parameter der Einfluss der genetischen Diversität deutlich. So produzieren die Weibchen mit einer höheren genetischen Diversität signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$) mehr Gelege (total und fruchtbar) als genetisch ärmere Weibchen. Weiterhin sind die Gelege signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$) größer und in genetisch variablen Population werden signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,001$) mehr Eier pro Weibchen produziert, als in genetisch verarmten. Darüber hinaus wird ein signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,001$) positiver Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität und dem Anteil an fruchtbaren Gelegen unter Schadstoffstress ermittelt und auch der integrative Parameter der PWR ist signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,001$) positiv mit der genetischen Variabilität korreliert. Anhand dieser zahlreichen Zusammenhänge wird deutlich, welche entscheidende Rolle die genetische Diversität bereits bei einer niedrigen TBT-Konzentration für die Fitness der Population spielt.

Neben den TBT-Effekten auf die Reproduktion und Entwicklung von *C. riparius* im Multigenerationsansatz wurde ebenfalls das Anpassungspotential an den Stressor untersucht (Kap. 3.4). Da jedoch bei den gewählten niedrigen TBT-Konzentrationen nicht primär mit Selektionsprozessen gerechnet wurde, wurde für die Bestimmung von genetischen Anpassungsprozessen kein umfassendes Testdesign etabliert. Für die Ermittlung von genetischen Anpassungsprozessen hätte das Testsystem leicht modifiziert werden müssen. So hätten die Tiere der TBT-exponierten Populationen für eine Generation unter Kontrollbedingungen gehalten werden müssen. Anschließend hätte die TBT-Toleranz der F2-Generation überprüft werden müssen (FRANKHAM et al., 2002). Eine höhere Toleranz gegenüber dem Stressor TBT kann deshalb auch aus einer gesteigerten physiologischen Toleranz (GILLIS et al., 2002; KAROUNA-RENIER & ZEHR, 2003; LEE et al., 2006) resultieren, die maternal an die Nachkommen übertragen wird (BELFI-



ORE & ANDERSON, 2001). Die beobachteten Effekte sind daher lediglich als Hinweise auf Selektionsprozesse zu verstehen.

Die im Rahmen der MGS I durchgeführten Anpassungsexperimente für GEN+ zeigen, dass eine Anpassung an den Stressor erst nach zahlreichen Generationen erfolgt (Tab. 17). In den Akutttests mit L1-Larven werden erst in den letzten Generationen signifikant ($p < 0,001$, t-Test) geringere TBT-Sensitivitäten beobachtet. Die relativ niedrige TBT-Konzentration wirkt offensichtlich nur einen geringen Selektionsdruck auf die exponierte Population aus, und es dauert zahlreiche Generationszyklen, ehe Selektionsprozesse vermutet werden können. Auch die beobachtete Veränderung des Lebenszyklus kann als Hinweis für Selektionsresultate demonstriert werden. Ein weiteres Indiz für gerichtete Selektionsprozesse sind die beobachteten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die vor allem in der exponierten GEN+ auftreten (Tab. 15).

In den Kontrollen der GEN- werden ähnliche absolute LC_{50} -Werte wie in der GEN+LMK festgestellt. Allerdings treten in den letzten Generationen der GEN-TBT keine signifikant unterschiedlichen Sensitivitäten im Vergleich zur Kontrollpopulation auf (Tab. 17). Die genetisch ärmere Population scheint nicht in der Lage zu sein, sich im selben Zeitraum an TBT anzupassen wie GEN+. Die Tatsache, dass die genetische Diversität eine wichtige Rolle bei der Anpassung an neue Umweltbedingungen spielt, wurde bereits in anderen Studien publiziert (FRANKHAM et al., 2002; REED et al., 2003; FRANKHAM, 2005a). Im chronischen Life-Cycle-Experiment werden am Ende der MGS I keine unterschiedlichen LC_{50} -Werte in den beiden Behandlungsgruppen der GEN+ und der GEN- beobachtet (Tab. 17). Diese befinden sich in etwa auf dem Niveau der Vorstudie.

In der MGS II kann aufgrund der Kürze der Studie kein veränderter Lebenszyklus der Tiere vermutet werden. Diese Studie stellt allerdings ein wichtiges Bindeglied zwischen den beiden anderen MGS dar, da unter anderem die Durchführbarkeit des Experimentes in doppelter Replikation überprüft wurde.

Ähnlich wie in der MGS I, schwanken einzelne Parameter in der MGS III stark. Auch in dieser Studie wird in den ersten Generationen eine Veränderung des Lebenszyklus anhand der PWR beobachtet. In beiden Populationen ist die PWR in den ersten beiden Generationen bei TBT-Stress signifikant ($p < 0,05$, t-Test) niedriger als unter Kontrollbedingungen (Abb. 17). Dieses ist auf die Toxizität des TBT zurückzuführen, aufgrund



derer die Tiere signifikant ($p < 0,05$, t-Test) später schlüpfen (Abb. 16). Anschließend verändert sich der Lebenszyklus der Tiere, und die PWR sind in beiden Populationen unter TBT-Stress gleich hoch wie unter Kontrollbedingungen. GEN+TBT weist ab der fünften Generation der MGS III deutlich niedrigere PWR im Vergleich zu GEN+LMK auf. Dieses geht mit der Verminderung des Anteils an heterozygot vorliegenden Mikrosatellitengenorten einher (Abb. 18, Tab. 21), und es wird ein signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$) positiver Zusammenhang zwischen genetischer Diversität und PWR festgestellt. Infolgedessen ist auch in dieser Studie ein deutlicher Effekt der genetischen Diversität auf die Fitness der Tiere festzustellen. In den letzten Generationen der MGS III werden in den Anpassungsexperimenten keine Hinweise auf eine erhöhte Toleranz gegenüber TBT gefunden.

Im Hinblick auf den Zusammenhang einzelner Life-Cycle-Parameter und der genetischen Diversität stellt sich ein bei einer höheren Konzentration anderes Bild als bei der relativ niedrigen Konzentration in der MGS I dar. Da für GEN- in dieser Studie keine genetischen Analysen durchgeführt wurden, treffen die Aussagen nur für GEN+ zu (Kap. 2.4). Die genetische Diversität hat in der MGS III keinen so entscheidenden Einfluss wie in der MGS I. So wird nur ein einziger signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,01$) positiver Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität und der PWR festgestellt. Weiterhin wird ein positiver Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität und der Anzahl an nicht zählbaren Gelegen festgestellt. Genetisch ärmere Weibchen legen bei erhöhtem Schadstoffstress offensichtlich öfter unregelmäßig geformte Gelege ab.

In den Akutttests in der dritten Generation der MGS III werden für GEN+TBT tendenziell höhere LC_{50} -Werte beobachtet als für GEN+LMK (Tab. 22). Dieses Ergebnis wird durch den chronischen Life-Cycle-Test nach der vierten Generation bekräftigt, wobei GEN+TBT signifikant ($p < 0,05$, t-Test) unempfindlicher gegenüber TBT reagiert als GEN+LMK (Tab. 22). In der MGS III wird eine Anpassung an den Stressor vermutlich aufgrund des höheren Selektionsdrucks, bedingt durch die höhere TBT-Konzentration, bereits nach weniger Generationen als in der MGS I beobachtet. Auffällig ist allerdings, dass die höhere TBT-Toleranz in den Akutttests der späteren Generationen nicht mehr festzustellen ist. Vermutlich geht die Eigenschaft im Verlauf der MGS III mit dem Verlust an genetischer Diversität verloren. In den späteren Generationen sind scheinbar unempfindlichere Genotypen nicht mehr in der Population vorhanden. Der Verlust



von Allelen kann unter anderem am Verlust der genetischen Variabilität an den Mikrosatellitenmarker vier und fünf beobachtet werden (Tab. 21). Diese treten in den letzten Generationen der MGS III nur noch homozygot auf. Zwar sind Mikrosatellitenmarker selektionsneutrale Marker, können allerdings auch eng mit funktionellen Genomabschnitten gekoppelt sein (LI et al., 2002; SELKOE & TOONEN, 2006).

In den Akuttests mit GEN- werden hinsichtlich der TBT-Sensitivität keine Unterschiede zwischen beiden Populationen (GEN-LMK & GEN-TBT) beobachtet (Tab. 22). Da jedoch in der MGS III nur zwei Akuttests mit GEN- durchgeführt wurden, ist die Aussagekraft der Experimente stark begrenzt. Das chronische Life-Cycle-Experiment nach der vierten Generation ist aufgrund von zu hohen Kontrollmortalitäten nicht valide. Diese können auch im chronischen Anpassungstest auf die suboptimalen Hälterungsbedingungen zurück geführt werden (Kap. 4.2).

Die Ergebnisse der Multigenerationsstudien deuten darauf hin, dass *C. riparius* relativ schnell in der Lage ist, sich an neue biotische und abiotische Umweltbedingungen anzupassen. Dies kann über eine Veränderung des Lebenszyklus oder über eine Verminderung der Sensitivität gegenüber dem Schadstoffstress geschehen. GROENENDIJK et al. (1999b) zeigen ebenfalls für *C. riparius*-Freilandpopulationen, dass eine Verringerung der Sensitivität gegenüber Schwermetallstress möglich ist. Auch Laborstudien belegen diese Tatsache (POSTMA & DAVIDS, 1995; DE BISTHOVEN et al., 2001). Anpassungsprozesse hängen von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Generationsdauer und Anzahl an fertilen Nachkommen, ab (DARWIN, 1859). Chironomiden weisen aufgrund der kurzen Generationszeit und der großen Anzahl an Nachkommen ein hohes Potential auf, sich an neue Umweltbedingungen anzupassen. Sie kommen deshalb in fast allen Süßwasserhabitaten vor und gehören zu einer der verbreitetsten Familien des Tierreichs (PINDER, 1986; ARMITAGE et al., 1995). Neben den bereits genannten Faktoren hat auch die genetische Diversität einen großen Einfluss auf Anpassungsprozesse, da sie die Ressource für unempfindlichere Genotypen darstellt (FRANKHAM et al., 2002; FRANKHAM, 2005a). Darüber hinaus werden Anpassungsprozesse vom Selektionsdruck (z.B. der Höhe der Schadstoffkonzentration) beeinflusst. Je höher der tolerierbare Selektionsdruck ist, desto schneller passen sich die Tiere an neue Umweltbedingungen an.

4.4 Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress

Die genetische Diversität der GEN+ wird in der MGS I durch die TBT-Exposition nicht beeinflusst (Abb. 13A). Für GEN+TBT werden jedoch zahlreiche signifikante ($p < 0.05$, χ^2 -Test) Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) beobachtet (Tab. 15). Bei GEN+LMK wird im Vergleich dazu nur in der achten Generation eine signifikante ($p < 0.05$, χ^2 -Test) Abweichung von HWG am ersten Mikrosatellitenloкус beobachtet. Mit Ausnahme der ersten Generation, in der die Abweichungen vom HWG wahrscheinlich durch eine unvollständige Durchmischung der Ausgangspopulation (GEN+) zu erklären sind, häufen sich die Abweichungen in den späteren Generationen an den Mikrosatellitenorten I und II. Da die Populationsgrößen in beiden Behandlungsgruppen annähernd gleich sind, können die Abweichungen vom HWG nicht mit diesem Parameter erklärt werden. Vermutlich sind die Abweichungen durch Selektionsprozesse zu erklären (Kap. 4.3). Obwohl Mikrosatellitenmarker generell als neutrale Marker betrachtet werden, ist es möglich, dass sie auf dem Chromosom nah an kodierenden, nicht selektionsneutralen DNA-Abschnitten liegen und damit gekoppelt mit diesen vererbt werden (LI et al., 2002). Somit können Selektionsprozesse durchaus für die gemessenen HWG-Abweichungen verantwortlich gemacht werden, insbesondere, da sich diese auf nur zwei Genorte konzentrieren. Neutrale Prozesse, wie genetische Drift, sollten dagegen theoretisch alle Loci gleichmäßig betreffen (SELKOE & TOONEN, 2006).

Für GEN- werden in der Ausgangspopulation an den untersuchten Mikrosatelliten keine heterozygoten Genorte festgestellt (Abb. 13B). Im Verlauf der Studie steigt der Anteil an heterozygot vorliegenden Mikrosatellitenorten bei GEN-LMK in der dritten und bei GEN-TBT in der fünften Generation sprunghaft an. Dieser Anstieg kann unter anderem dadurch begründet werden, dass seltene Allele bei der Ermittlung der genetischen Diversität der Ausgangspopulation nicht mit aufgenommen wurden. Sie liegen äußerst selten in der Population vor und werden bei der genetischen Analyse von 36 Tieren zufällig nicht mit erfasst. Im Verlauf der Studie weist GEN- besonders in den ersten Generationen eine extrem verminderte Fitness auf, und es besteht die Möglichkeit, dass eine extreme Selektion gegenüber Heterozygoten stattfindet. Es ist bekannt, dass ein höherer Anteil an heterozygot vorliegenden Allelen einen Fitnessvorteil bedeutet und somit einen Selektionsvorteil darstellen kann (FRANKHAM et al., 2002; HANSSON & WESTERBERG, 2002; KELLER & WALLER, 2002). Es besteht demzufolge die



Möglichkeit, dass heterozygot vorliegende Allele sich schnell in der Population etablieren und deren Anteil ansteigt. Außerdem durchläuft GEN- in den ersten Generationen extreme Flaschenhalse („*bottlenecks*“) (Kap. 3.2, 3.3). Dies ist eine weitere Erklärung für den Anstieg der genetischen Diversität, die durch erhöhte Drifteffekte aufgrund der kleineren effektiven Populationsgröße entstehen kann (FRANKHAM et al., 2002). So wird z.B. die dritte und vierte Generation der GEN-TBT aus nur jeweils zwei Gelegen angesetzt. Gegen diese These spricht allerdings, dass GEN- bereits über eine längere Zeit (> 5 a) im Labor gehältert wurde und deshalb die Chance für das Vorliegen von seltenen Allelen relativ niedrig ist.

Eine weitere Ursache für den Anstieg der genetischen Diversität von GEN-TBT sind durch die TBT-Exposition eventuell verursachte Mutationen. Mutationen treten etwa durch Fehler bei der DNA-Replikation auf und werden z.B. durch kanzerogene oder radioaktive Substanzen induziert (KNIPPERS, 2001), führen jedoch nicht immer zu negativen Folgen für den Organismus, da sie meist über zelleigene Reparaturmechanismen ausgeglichen werden oder neutral sind. Entsprechend bewirken sie entweder keine Veränderungen in der Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins oder kommen gar in nicht-codierenden DNA-Bereichen vor. Wenn sich Mutationen negativ auf die Fitness von Organismen auswirken, werden sie durch Selektion meist relativ schnell wieder aus dem Genpool der betreffenden Population verschwinden (FRANKHAM et al., 2002). Da für TBT kein mutagenes Potential bei den gewählten umweltrelevanten Konzentrationen in der Literatur nachgewiesen ist (BUA, 2003), kann dieser Aspekt mit hoher Wahrscheinlichkeit vernachlässigt werden. Auch der Anstieg der genetischen Diversität in der unbelasteten GEN-LMK spricht gegen diese These. Des Weiteren sind Mutationen allgemein zu selten, um das Auftreten neuer Allele innerhalb weniger Generationen erklären zu können.

Als weitere Ursache für die Erhöhung des Anteils an heterozygoten Allelen in GEN- ist ein unbeabsichtigter Genfluss mit GEN+. Da die Experimente mit den beiden genetisch unterschiedlichen Population im selben Klimaraum und von wechselnden Bearbeitern durchgeführt wurden, kann Genfluss zwischen den Populationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dadurch könnten zusätzliche Allele in die zu Beginn genetisch verarmte GEN- eingebracht worden sein und sich aufgrund des Heterozygotenvorteils in der Population relativ schnell etabliert haben (SPIELMAN & FRANKHAM, 1992).



In der MGS III ist die genetische Diversität der GEN+LMK relativ konstant. Allerdings wird nicht mehr das Niveau der MGS I erreicht. Diese Tatsache ist auf fortschreitende genetische Drift zurückzuführen. Ab der sechsten Generation ist der Anteil an heterozygot vorliegenden Allelen in der GEN+TBT niedriger als in der GEN+LMK, und es wird ein signifikanter ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Unterschied in den Generationen sechs und 12 festgestellt (Abb. 18). Die Verminderung der genetischen Diversität resultiert dabei besonders aus dem Verlust der genetischen Variabilität an den Mikrosatellitengenen vier und fünf (Tab. 21). Diese liegen in den späteren Generationen der MGS III nur noch homozygot vor. Im Vergleich zur MGS I werden in der MGS III kaum Abweichungen vom HWG festgestellt.

Wie bereits oben beschrieben, kann die Verminderung der genetischen Diversität wie folgt erklärt werden: TBT führt durch toxische Wirkungen zu Entwicklungsstörungen und zu einer reduzierten Vitalität von *C. riparius*. Dadurch erhöht sich die durchschnittliche Mortalität in der GEN+TBT signifikant ($p < 0,05$, t-Test). Außerdem produzieren die Weibchen signifikant ($p < 0,01$, t-Test) weniger Gelege, und es kommt zu einer Verkleinerung der effektiven Populationsgröße (Flaschenhalseffekt). Diese Tatsache spiegelt sich auch in der Anzahl an Gelegen, aus denen die nächste Generation entsteht, wider. Während für den Aufbau der nächsten Generation in der GEN+LMK im Durchschnitt jeweils 40 Gelege zu Verfügung stehen, wird die nächste Generation der GEN+TBT im Durchschnitt aus nur 30 Gelegen angesetzt (Abb. 26). In der MGS III werden außerdem einzelne Populationen aus sehr wenigen Gelegen gebildet, so wird z.B. die fünfte Generation der GEN+TBT nur aus fünf Gelegen aufgebaut. Wie stark sich die Verringerung der effektiven Populationsgröße auf die genetische Diversität auswirkt, ist neben anderen Faktoren von der absoluten Populationsgröße und dem Reproduktionserfolg abhängig (BICKHAM et al., 2000; VAN STRAALLEN & TIMMERMANS, 2002). Wenn der Schadstoffstress wegfällt, erhöht sich die Individuenzahl wieder. Die genetische Diversität erreicht das Niveau vor dem Flaschenhals allerdings nicht mehr und verbleibt auf einem niedrigen Niveau (Abb. 29; FRANKHAM et al., 1999; BIJLSMA et al., 2000).

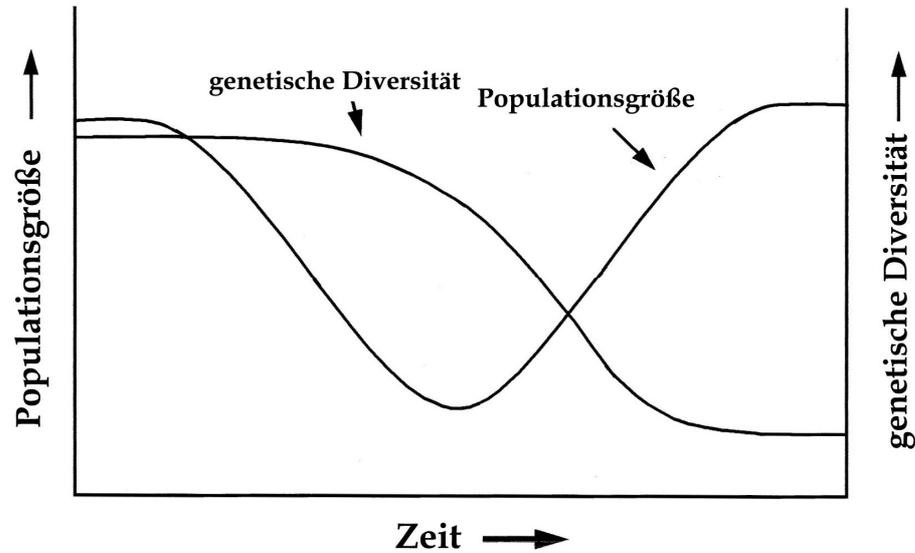


Abb. 29: Zusammenhang zwischen genetischer Diversität und Populationsgröße nach BICKHAM et al. (2000).

Ein weiterer möglicher TBT-Effekt, der zu einer Verringerung der genetischen Diversität führen kann, ist gerichtete Selektion. Hierbei werden sensitive Genotypen ausgelesen und sind nicht mehr in der Population zu finden (STATON et al., 2001; GRIFFITH et al., 2002). Die Population verfügt folglich über eine geringere genetische Variabilität. In der MGS III werden Anpassungsprozesse in der dritten Generation anhand der Akuttests und in der vierten Generation aufgrund des chronischen Life-Cycle-Tests vermutet (Kap. 4.3). Diese Anpassungsprozesse resultieren allerdings nicht in Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und werden in den späteren Generationen nicht mehr nachgewiesen. Es ist trotzdem nicht ausgeschlossen, dass im Hintergrund Selektionsprozesse auftreten. Es ist daher auch möglich, dass die Verminderung der genetischen Diversität in der GEN+TBT, besonders von der vierten hin zur sechsten Generation, durch gerichtete Selektion verursacht wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine niedrige TBT-Konzentration nicht zu einer Verminderung der genetischen Diversität führt. In der GEN- können sich neue oder zumindest vorher sehr seltene Allele etablieren. Allerdings laufen im Hintergrund Prozesse ab, die zu signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht führen. Bei einer höheren Konzentration kommt es aufgrund toxischer Effekte zu einer Verminderung der effektiven Populationsgröße, die zu verstärkter genetischer Drift und damit zu einer messbaren genetischen Verarmung der Populationen innerhalb weniger Generationen führt.



4.5 Zweitstressorstudien mit Cadmium

Bevor generelle Aussagen bezüglich der Fragestellung getroffen werden, inwieweit die Vorexposition an einen Stressor die Reaktion auf einen zweiten Stressor beeinflusst, werden zuerst die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen der beiden Zweitstressorstudien vorgestellt.

Ausgangsbedingungen nach unterschiedlicher Art und Dauer der Vorbelastung

Das Hauptinteresse der Zweitstressorstudien (ZSS) liegt in der Fragestellung, ob sich die Effekte von Cd auf TBT-vorexponierte Tiere gegenüber den Effekten auf nicht-vorbelastete Tiere unterscheiden.

Für die Life-Cycle-Parameter werden in der MGS I bis zur sechsten Generation kaum Unterschiede zwischen GEN+LMK und GEN+TBT festgestellt (Kap. 3.3.1). Die Populationswachstumsraten weisen in der sechsten Generation in beiden Behandlungsgruppen annähernd gleiche Werte auf (Abb. 12A). Weiterhin werden zu diesem Zeitpunkt noch keine Hinweise auf eine TBT-Anpassung festgestellt, wie das in den späteren Generationen (neun und zehn) der MGS I der Fall ist (Tab. 17). Die Mikrosatellitenanalysen zeigen außerdem keine Effekte der TBT-Exposition auf die genetische Diversität der exponierten GEN+TBT (Abb. 13A). Allerdings können bei GEN+TBT zahlreiche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) an den einzelnen Mikrosatellitengenen beobachtet werden (Tab. 15).

In der MGS III verhält es sich mit den Ausgangsbedingungen der beiden Populationen GEN+LMK und GEN+TBT deutlich anders. So werden die Tiere der GEN+TBT länger (über neun Generation) und gegenüber einer höheren TBT-Belastung vorexponiert. Es werden signifikante Unterschiede zwischen den Life-Cycle-Parametern (z.B. Mortalität, EmT_{50} , Gelege pro Weibchen) der GEN+LMK und der GEN+TBT festgestellt (Kap. 3.3.3). Außerdem ist eine signifikante Abnahme der genetischen Diversität bei GEN+TBT im Vergleich zur GEN+LMK zu beobachten (Abb. 18). Für GEN+TBT werden ebenfalls Hinweise auf eine Anpassung an den Stressor TBT im chronischen Life-Cycle-Experiment nach der vierten Generation ermittelt (Tab. 22).

Die Ausgangsbedingungen der beiden Zweitstressorstudien unterscheiden sich deshalb deutlich voneinander.



Cadmium als Zweitstressor

Bei beiden ZSS können in den jeweiligen Cadmium-exponierten Populationen (LMK+Cd, TBT+Cd) die bereits im Kapitel 3.2 beschriebenen negativen Effekte auf Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius* beobachtet werden.

In der ZSS I ist die vorbelastete GEN+TBT in der Lage, den Stressorwechsel auf Cadmium ohne größere Effekte auf Entwicklung und Reproduktion zu tolerieren (Kap. 3.4). Zwar wirkt sich Cadmium signifikant auf das Überleben und den Schlupfzeitpunkt der Tiere aus, aber ein Unterschied in der Reaktion der vorbelasteten und der nicht vorbelasteten Population ist nicht zu erkennen (Abb. 19A, 20A). Hinsichtlich der reproduktionsrelevanten Parameter werden in der LMK+Cd signifikant ($p < 0,05$, t-Test) kleinere Gelege als in der LMK+LMK produziert und die Ergebnisse des Vorexperimentes bestätigt (Tab. 23). Außerdem produzieren die TBT-vorexponierten Weibchen der TBT+Cd signifikant ($p < 0,05$, t-Test) mehr Gelege als jene der Referenzpopulation (TBT+LMK, Tab. 23). Anhand der PWR wird ein deutlicher Cadmium-Effekt beobachtet, wobei die PWR in den cadmiumbelasteten Populationen (LMK+Cd, TBT+Cd) signifikant ($p < 0,001$, t-Test) niedriger sind als in den jeweiligen Referenzgruppen (Abb. 21A). Allerdings werden keine signifikanten Unterschiede der PWR zwischen der LMK+Cd und der TBT+Cd festgestellt.

Die vorexponierte Population hat demzufolge zu diesem Zeitpunkt der MGS I noch keine Mechanismen entwickelt, um eine höhere Toleranz gegenüber dem Stressor Cadmium zu entwickeln (Kap. 4.3). Dies könnte beispielsweise durch Selektion auf Tiere mit einer gesteigerten Synthese von Stressproteinen (GILLIS et al., 2002; KAROUNA-RENIER & ZEHR, 2003; LEE et al., 2006) oder mit niedrigerem Grundstoffwechsel geschehen (KOEHN & BAYNE, 1989). Die TBT-Vorbelastung ist vermutlich zu gering und von zu kurzer Dauer, um Veränderungen innerhalb der Populationsstruktur hin zu mehr schadstofftoleranten Organismen hervorzurufen. Diese Tatsache wird auch durch die Ergebnisse der Anpassungsstudien gestützt (Kap. 4.3).

In der ZSS III werden im Vergleich zur ZSS I in der LMK+Cd und in der TBT+Cd höhere absolute Mortalitäten festgestellt (Abb. 19B). Außerdem weist GEN+ signifikant ($p < 0,05$, t-Test) unterschiedliche EmT_{50} -Werte zwischen der nicht vorbelasteten LMK+Cd und der TBT-vorbelasteten TBT+Cd auf (Abb. 20B). Im Hinblick auf die reproduktionsrelevanten Parameter werden die Ergebnisse des Vorexperimentes nicht bestätigt (Kap. 3.2, Tab. 12). Die berechneten PWR spiegeln den signifikant ($p < 0,001$,



t-Test) negativen Cadmiumeffekt auf die Entwicklung und Reproduktion wider, wobei dieser stärker ausfällt als in der ZSS I (Abb. 21B). Allerdings unterscheiden sich die PWR der vorbelasteten TBT+Cd von der PWR der nicht vorbelasteten LMK+Cd signifikant ($p < 0,05$, t-Test). Die GEN+TBT scheint durch die TBT-Vorexposition negativ beeinflusst worden sein und ist nur eingeschränkt in der Lage, sich an neue Umweltbedingungen anzupassen. Die Vorexposition gegenüber dem Stressor TBT führt zu einer Einschränkung der genetischen Variabilität (Kap. 4.3). Dadurch ist das Potential der Population, auf einen weiteren Stressor, also einen neuen Selektionsdruck, zu reagieren, eingeschränkt (BICKHAM et al., 2000; FRANKHAM, 2005b). Somit kommt es zu einer stärkeren phänotypischen Reaktion auf Cadmium als Zweitstressor. Eine weitere Erklärung für die verringerte Fitness der TBT-vorexponierten Population bei Stressorwechsel kann die Tatsache sein, dass GEN+TBT bereits irreparabel vorgeschädigt ist und deshalb nicht die Möglichkeit hat, mit der neuen Stresssituation umzugehen.

Während der beiden Zweitstressorstudien werden keine Hinweise auf Anpassungsprozesse an Cadmium beobachtet. So verändern sich die Life-Cycle-Parameter der Tiere nicht, wie es z.B. in den letzten Generationen der Multigenerationsstudie I (GEN+TBT) beobachtet wird (Kap. 4.3). Dabei schlüpfen die Tiere früher und produzieren mehr Nachkommen. Die Möglichkeit einer weiteren Anpassung an den Zweitstressor Cadmium ist aufgrund der Kürze der ZSS nicht gegeben.

Beim Vergleich der beiden Zweitstressorstudien wird das Ausmaß der anschließenden Cd-Exposition offensichtlich. Bei höheren Konzentrationen der Vorexposition treten Effekte auf die Population auf, welche die genetische Vielfalt und die Fitness der Population negativ beeinflussen. Scheinbar verstärken sich die negativen Effekte der Vorexposition bei Schadstoffwechsel. Durch die Verringerung der genetischen Variabilität wird auch die Möglichkeit, sich an neue Verhältnisse anzupassen, dramatisch vermindert (BICKHAM et al., 2000; AMOS & BALMFORD, 2001; FRANKHAM et al., 2002; FRANKHAM, 2005b).

Interessant ist allerdings, dass die Population trotz des Stressorwechsels auf Cadmium weiterhin in der Lage ist zu wachsen. Dieses kann auf die optimalen Lebensbedingungen unter Standardlaborbedingungen zurückgeführt werden.



5 Zusammenfassung

Obwohl für eine Vielzahl von Chemikalien Ergebnisse aus Standardtest vorliegen, gibt es relativ wenige Erkenntnisse über generationsübergreifende Substanzeffekte und die Auswirkungen von Chemikalien auf die genetische Diversität. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation werden generationsübergreifende Effekte des Modellschadstoffes Tributylzinn (TBT) bei drei subakuten Konzentrationen (4,46; 6,69 und 8,93 $\mu\text{g Sn/kg TG}$) auf Life-Cycle-Parameter und genetische Diversität der Zuckmücke *Chironomus riparius* untersucht. Dabei wird eine genetisch variable (GEN+) und eine genetisch verarmte (GEN-) Populationen betrachtet. Darüber hinaus wird das Anpassungspotential an den Stressor TBT abgeschätzt.

Die genetische Variabilität von *C. riparius* wird mittels neu entwickelter Mikrosatellitenmarker bestimmt. Dabei werden geringfügige Längenunterschiede zwischen hochvariablen DNA-Fragmenten detektiert. Weiterhin werden Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bestimmt. Für die Ermittlung von potentiellen Anpassungsprozessen an den Stressor TBT werden nach ausgewählten Generationen akute und chronische Anpassungstest durchgeführt.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob eine TBT-Vorexposition zu einer veränderten Sensitivität gegenüber einem Zweitstressor führt, werden Experimente mit Cadmium durchgeführt. Auch in den Zweitstressorstudien wird der Multigenerationsansatz gewählt, und es werden Life-Cycle-Experimente über drei weitere Generationen durchgeführt. Für die Experimente werden die mit 4,46 und 8,93 $\mu\text{g Sn/kg TG}$ vorexponierten Tiere anschließend nach unterschiedlicher Generationenzahl einer umweltrelevanten Cadmiumkonzentration (1,2 mg/kg TG) ausgesetzt.

Im Verlauf der Multigenerationsstudie mit 4,46 $\mu\text{g Sn/kg TG}$ werden in beiden Populationen signifikante Effekte auf die Entwicklung und Reproduktion beobachtet. In den ersten Generationen ist der Schlupfzeitpunkt der Larven bei TBT-Exposition signifikant ($p < 0,05$, t-Test) verzögert. Die Reproduktion scheint ebenso ein sensitiver Parameter zu sein, wobei die Weibchen der genetisch variableren Population signifikant ($p < 0,05$, t-Test) größere Gelege in den späteren Generationen produzieren. Die niedrige TBT-Konzentration hat in beiden Populationen keinen signifikanten Effekt auf die durchschnittliche Populationswachstumsrate. In den letzten Generationen der Studie wird für die genetisch variabelere Population eine Veränderung des Lebenszyklus fest-



gestellt, wobei die Weibchen eine erhöhte Reproduktionsleistung aufweisen. Es werden keine Effekte auf die Heterozygotie festgestellt. Allerdings treten in beiden Populationen zahlreiche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf. Weiterhin werden signifikante (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$) Effekte der genetischen Diversität auf zahlreiche Life-Cycle-Parameter (Gelegeanzahl pro Weibchen, Gelegegröße) ermittelt. In den chronischen und akuten Anpassungsexperimenten gibt es deutliche Hinweise auf Adaptationsprozesse gegenüber dem Stressor TBT.

In der TBT-Studie mit $8,93 \mu\text{g Sn/kg TG}$ werden in beiden Populationen signifikante Effekte auf zahlreiche Life-Cycle-Parameter festgestellt, wobei die Entwicklung und Reproduktion der Tiere negativ beeinflusst wird. Darüber hinaus werden in der genetisch variableren Population signifikante ($p < 0,05$, χ^2 -Test) Effekte von TBT auf die genetische Diversität beobachtet. Diese nimmt im Verlauf der Studie ab. Nach der vierten Generation gibt es in der genetisch variableren Population Hinweise auf Anpassungsprozesse, die allerdings in den letzten Generationen nicht mehr nachzuweisen sind. Ähnlich wie in der ersten Multigenerationsstudie wird auch in dieser Studie ein signifikant (Pearson-Korrelation, $p < 0,05$) positiver Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität und der Populationswachstumsrate bei TBT-Exposition festgestellt.

In den Zweitstressorexperimenten wird der Effekt der Vorbelastung bei der genetisch variableren Population deutlich. Die mit $8,93 \mu\text{g Sn/kg TG}$ über neun Generationen exponierte Population reagiert dabei empfindlicher auf den Stressorwechsel als die dazugehörige Referenzpopulation.

Innerhalb der Multigenerationsstudien werden zahlreiche Effekte der Organozinnverbindung TBT auf Life-Cycle-Parameter und die genetische Diversität von *C. riparius* deutlich. Diese Dissertation zeigt die hohe Bedeutung von Mehrgenerationenstudien für die Abschätzung und Bewertung eines Risikopotentials von Schadstoffen.

6 Literaturverzeichnis

- Amos, W.; Balmford, A. (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* 87, 257-265.
- Anderson, S.; Sadinski, W.; Shugart, L.; Brussard, P.; Depledge, M.; Ford, T.; Hose, J.; Stegemann, J.; Suk, W.; Wirgin, I.; Wogan, G. (1994) Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. *Environ. Health Persp.* 102, 3-8.
- Arambarri, I.; Garcia, R.; Millan, E. (2003) Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere* 51, 643-649.
- ARGE Elbe – Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe (2005) Gewässergütebericht der Elbe 2005. <http://www.arge-elbe./wge/Download/Berichte/05Guetebericht.pdf> [26.01.2007].
- Armbruster, P.; Reed, D.H. (2005) Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity* 95, 235-242.
- Armitage, P.D.; Cranston, P.S.; Pinder, L.C.V. (1995) *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 195-224.
- Baird, D.J.; Barber, I.; Calow, P. (1990) Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Funct. Ecol.* 4, 399-407.
- Barjaktarovic, L.; Bendell-Young, L.I. (2001) Accumulation of ¹⁰⁹Cd by second-generation *Chironominae* propagated from wild populations sampled from low-, mid-, and high-saline environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 339-344.
- Belden, J.B.; Lydy, M. (2006) Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 623-629.
- Belfiore, N.M.; Anderson, S.L. (1998) Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: The example of genetic ecotoxicology. *Environ. Monitor. Assess.* 51, 465-479.
- Belfiore, N.M.; Anderson, S.L. (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review. *Mutat. Res.* 489, 97-122.
- Benoit, D.A.; Sibley, P.K.; Juenemann, J.L.; Ankley, G.T. (1997) *Chironomus tentans* life-cycle test: Design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1165-1176.
- Bervoets, L.; Wils, C.; Verheyen, R. (1996) Tolerance of *Chironomus riparius* larvae (Diptera: Chironomidae) to salinity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 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, 443–454.
- Bettin, C.; Oehlmann, J.; Stroben, E. (1996) TBT induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresunters.* 50, 299-317.
- Bhosle, N.B.; Garg, A.; Jadhav, S.; Harjee, R.; Sawant, S.S.; Venkat, K.; Anil, A.C. (2004) Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. *Chemosphere* 57, 897–907.
- Bickham, J.W.; Sandhu, S.; Herbert, P.D.N; Chikhi, L.; Athwal, R. (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 463, 33-51.
- Bijlsma, R.; Bundgaard, J.; Boerema, A.C. (2000) Does inbreeding affect the extinction risk of small populations? Predictions from *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 13, 502–514.
- Bliefert, C. (2002) *Umweltchemie. 3. Auflage*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, Deutschland.
- BUA - Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.) (1988) Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid). BUA Stoffbericht 36. VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.
- BUA - Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.) (2003) BUA Stoffbericht 238 (Ergänzungsberichte IX): Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid) (Nr. 36). S. Hirzel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland.
- Burton, E.D.; Phillips, I.R.; Hawker, D.W. (2005) In-situ partitioning of butyltin compounds in estuarine sediments. *Chemosphere* 59, 585–592.
- Carew, M.E.; Pettigrove, V.; Hoffmann, A.A. (2003) Identifying chironomids (Diptera: Chironomidae) for biological monitoring with PCR-RFLP. *B. Entomol. Res.* 93, 483-490.
- Carew, M.E.; Pettigrove, V.; Hoffmann, A.A. (2005) The utility of DNA markers in classical taxonomy: Using cytochrome oxidase I markers to differentiate Australian *Cladopelma* (Diptera: Chironomidae) midges. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 587-594.
- CBD - Convention on Biological Biodiversity (1992) <http://www.biodiv.org/convention/articles.asp?lg=0&a=cbd-02> [10.01.2007].

- Charlesworth, D.; Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 237-268.
- Crouau, Y.; Chenon, P.; Gisclard, C. (1999) The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Appl. Soil Ecol.* 12, 103-111.
- Czeikowitz, A. (2006) Einfluss von genetischer Diversität und Differenzierung auf die Schadstoffsensitivität von *Chironomus riparius*-Zuchten. Diplomarbeit, Fachbereich Biowissenschaften, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Dahlgaard, J.; Hoffmann, A.A. (2000) Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conserv. Biol.* 14, 1187-1192.
- Darwin, C. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London, UK.
- De Bisthoven, J.L.; Postma, J.; Vermeulen, A.; Goemans, G.; Ollivier, F. (2001) Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water Air Soil Poll.* 129, 167-179.
- De Lange, H.J.; De Haas, E.M.; Maas, H.; Peeters, E.H.T.M. (2005) Contaminated sediments and bioassay responses of three macroinvertebrates, the midge larva *Chironomus riparius*, the water louse *Asellus aquaticus* and the mayfly nymph *Ephoron virgo*. *Chemosphere* 61, 1700-1709.
- Dimoski, P.; Toth, G.P. (2001) Development of DNA-based microsatellite marker for studies of genetic diversity in stressor impacted populations. *Ecotoxicology* 10, 229-232.
- DIN 19744, 2003. Identifizierung und Quantifizierung von Organozinnverbindungen in Feststoffen - Entwurf (Böden, Sedimente, Abfälle). Beuth Verlag, Berlin, Deutschland.
- Duan, Y.; Guttman, S.I.; Oris, J.T. (1997) Genetic differentiation among laboratory populations of 262 *Hyalella azteca*: Implications for toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 691-695.
- Ducrot, V.; Pery, A.R.R.; Mons, R.L.; Garric, J. (2004) Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge (*Chironomus riparius*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 225-231.
- Duft, M.; Schulte-Oehlmann, U.; Weltje, L.; Tillmann, M.; Oehlmann, J. (2003) Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquat. Toxicol.* 64, 437-449.

- EU – European Union (2003) Technical guidance document on risk assessment in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 1009 pp.
- Fargasova, A. (1998) Comparison of tributyltin compound effects on the alga *Scenedesmus quadricauda* and the benthic organisms *Tubifex tubifex* and *Chironomus plumosus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 41, 222-230.
- Fent, K. (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1-117.
- Fent, K. (1998) Ökotoxikologie – Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie. Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Fent, K.; Looser, P.W. (1995) Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: Influence of pH and humic acids. *Wat. Res.* 29, 1631-1637.
- Forbes, V.E.; 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, 78-86.
- Frankham, R. (2005a) Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.* 18, 750-755
- Frankham, R. (2005b) Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131-140.
- Frankham, R.; Lees, K.; Montgomery, M.E.; England, P.R.; Lowe, E.; Briscoe, D.A. (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim. Conserv.* 2, 255–260.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frouz, J.; Ali, A.; Lobinske, R.J. (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, 699-705.
- Gerhardt, A.; Orendt, C.; Dettinger-Klemm, P.M.A.; De Bisthoven, L.J.; Michiels, S.; Otto, C.J.; Vogt, C. (DGL-AK "Chironomiden als Bioindikatoren") (2006) Chironomiden: Potential und Einsatzmöglichkeiten im Biomonitoring von Gewässern - ein Überblick. *DGL-Mitteilungen I/2006*, 49-57.

- 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.
- Gillis, P.; Diener, L.C.; Reynoldson, T.B.; Dixon, D.G. (2002) Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): Correlation with reproduction and growth. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1836-1844.
- Goddeeris, B.R.; Vermeulen, A.C.; De Geest, E.; Jacobs, H.; Baert, B.; Ollevier, F. (2001) Diapause induction in the third and fourth instar of *Chironomus riparius* (Diptera) from Belgian lowland brooks. Arch. Hydrobiol. 150, 307-327.
- Gower, A.M.; Buckland, P.J. (1978) Water quality and the occurrence of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) in a stream receiving sewage effluent. Freshwater Biol. 8, 153-164.
- Griffith, A.J.F.; Gelbart, W.M.; Lewontin, R.C.; Miller, J.H. (2002) Modern genetic analysis. Second edition. W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Groenendijk, D.; Postma, J.F.; Kraak, M.H.S.; Admiraal, W. (1998) Seasonal dynamics and larval drift of *Chironomus riparius* (Diptera) in a metal contaminated lowland river. Aquat. Ecol. 32, 341-351.
- Groenendijk, D.; Kraak, M.H.S.; Admiraal, W. (1999a) Efficient shedding of accumulated metals during the metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1225-1231.
- Groenendijk, D.; Van Opzeeland, B.; Dionisio-Pires, L.M.; Postma, J.F. (1999b) Fluctuating life history parameters indicating temporal variability in metal adaptation in riverine chironomids. Arch. Environ. Cont. Tox. 37, 175-181.
- Groenendijk, D.; Lückner, S.M.G.; Plans, M.; Kraak, M.H.S.; Admiraal, W. (2002) Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. Environ. Pollut. 117, 101-109.
- 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, 1052-1057.
- Han, F.X.; Banin, A.; Su, Y.; Monts, D.L.; Plodinec, M.J.; Kingery, W.L.; Triplett, G.E. (2002) Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. Naturwissenschaften 89, 497-504.
- Hansson, B.; Westerberg, L. (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. Mol. Ecol. 11, 2467-2474.

- Havas, M.; Hutchinson, T.C. (1982) Aquatic invertebrates from the Smoking Hills, Northwest Territories: Effect of pH and metals on mortality. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39, 890-903.
- Hebert, P.D.N.; Luiker, M.M. (1996) Genetic effects of contaminant exposure - towards an assessment of impacts on animal populations. *Sci. Total Environ.* 191, 23-58.
- Heß, M. (2005) Genetische und ökotoxikologische Charakterisierung von TBT-vorexponierten Zuckmücken (*Chironomus riparius*) unter dem Einfluss des chemischen Stressors Cadmium. Diplomarbeit, Fachbereich Biowissenschaften, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Hirthe, G.; Fisher, T.C.; Crane, M.; Callaghan, A. (2001) Short-term exposure to sublethal doses of lindane affects development parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. *Chemosphere* 44, 583-589.
- Hoffmann, K.H. (1995) Fortpflanzung und Entwicklung. In Gewecke, M. (Hrsg.) (1995) *Physiologie der Insekten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Hommen, U. (2005) Ableitung von Populationswachstumsraten aus Lebensdatenstudien mit *Chironomus riparius*. Fraunhofer IME, Schmallenberg, Deutschland.
- Hooper, H.L.; Sibly, R.M.; Maund, S.J.; Hutchinson, T. (2003) The joint effects of larval density and ¹⁴C-cypermethrin on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *J. Appl. Ecol.* 40, 1049-1059.
- IMO - International Maritime Organisation (2002) Anti-fouling systems. Focus on IMO, 31 pp., www.imo.org. [03.07.2006].
- Jensen, A.; Forbes, V.E. (2001) Interclonal variation in the acute and delayed toxicity of cadmium to the European prosobranch gastropod *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Arch. Environ. Con. Tox.* 40, 230-235.
- Jha, A.N. (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: A review. *Mutat. Res.* 552, 1-17.
- Jost, D. (2006) Einfluss genetischer Diversität auf die Fitness von *Chironomus riparius* unter Cadmium-Stress. Diplomarbeit, Fachbereich Biowissenschaften, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Kahl, M.D.; Makynen, E.A.; Kosian, P.A.; Ankley, G.T. (1997) Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotox. Environ. Safe.* 38, 155-160.

- Kalbfus, W.; Zellner, A.; Frey, S.; Stanner, E. (1991) Gewässergefährdung durch organozinnhaltige Antifoulinganstriche. Bayrische Landesamt für Wasserwirtschaft – Institut für Wasserforschung. Forschungsvorhaben 126 05 010 des UBA, Berlin, UBA Berichts-Nummer 91-072, September 1991.
- Karouna-Renier, N.K.; Zehr, J.P. (2003) Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in midge larvae (*Chironomus tentans*). *Sci. Total Environ.* 312, 267-272.
- Kelce, W.R.; Monosson, E.; Gamcsik, M.P.; Laws, S.C.; Gray, L.E. (1994) Environmental hormone disruptors: Evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharm.* 126, 276-285.
- Keller, L.F.; Waller, D.M. (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230-241.
- Kley, C. (2005) Artenzusammensetzung innerhalb der Gattung *Chironomus* in unterschiedlich belasteten Freilandsedimenten. Diplomarbeit, Fachbereich Biowissenschaften, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Knippers, R. (2001) Molekulare Genetik. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Koehn, R.K.; Bayne, B.L. (1989) Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biol. J. Linn. Soc.* 37, 157-171.
- Kuballa, J.; Hempel, M.; Jantzen, E.; Hintelmann, H.; Steffen, D. (1995) Methylquecksilber- und Organozinn-Spezies in Sedimenten niedersächsischer Flüsse. *Vom Wasser* 83, 35-45.
- 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.
- Langton, P.H. (1991) A Key to pupal exuviae of west palearctic Chironomidae. Huntingdon, Cambridgeshire, UK.
- Lee, S.E.; Yoo, D.H.; Son, J.; Cho, K. (2006) Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics* 6, 945-957.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. (2002) Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.

- Looser, P.; Fent, K.; Berg, M.; Goudsmit, G.H.; Schwarzenbach, R. (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, 5165-5171.
- Lopes, C.; Pery, A.R.R.; Chaumot, A.; Charles, S. (2005) Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. Ecol. Model. 188, 30-40.
- Lowe, A.J.; Moule, C.; Trick, M.; Edwards, K.J. (2004) Efficient large-scale development of microsatellite marker and mapping applications in *Brassica* crop species. Theor. Appl. Genet. 108, 1103-1112.
- McCahon, C.P.; Pascoe, D. (1991) Brief-exposure of first and fourth instar *Chironomus riparius* larvae to equivalent assumed doses of cadmium: Effects on adult emergence. Water Air Soil Poll. 60, 395-403.
- Merck Schuchardt OHG (2006a) Sicherheitsdatenblatt Tributylzinnchlorid zur Synthese gemäß EG-Richtlinie 91/155/EWG. www.merck.de [03.07.2006].
- Merck Schuchardt OHG (2006b) Sicherheitsdatenblatt Cadmiumsulfat-Hydrat zur Analyse ACS gemäß EG-Richtlinie 91/155/EWG. www.merck.de [03.07.2006].
- Milani, D.; Reynoldson, T.B.; Borgmann, U.; Kolasa, J. (2003) The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposure and applications to contaminated field sediment. Environ. Toxicol. Chem. 22, 845-854.
- Montgomery, M.E.; Woodworth, L.M.; Nurthen, R.K.; Gilligan, D.M.; Briscoe, D.A.; Frankham, R. (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: Comparisons of experimental results with theoretical predictions. Conserv. Genet. 1, 33-43.
- Mortimer, C.E. (1996) Chemie. 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Motulsky, H.; Christopoulos, A. (2004) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. Oxford University Press, New York, USA.
- Mukhopadhyay, J.; Rangel, E.F.; Gosh, K.; Munstermann, L.E. (1997) Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J. Trop. Med. Hyg. 57, 216-221.
- Muyssen, B.T.A.; Janssen, C.R. (2004) Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. Environ. Pollut. 130, 309-316.
- Navio, J.A.; Marchena, F.J.; Cerrilos, C.; Pablos, F. (1993) UV photolytic degradation of butyltin chlorides in water. J. Photoch. Photobio. A 71, 97-102.

- Norris, D.E.; Shurtleff, A.C.; Toure, Y.T.; Lanzaro, G.C. (2001) Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 38, 336-340.
- Nowak, C.; Hankeln, T.; Schmidt, E.R.; Schwenk, K. (2006) Development and localization of microsatellite markers for the sibling species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* (Diptera: Chironomidae). Mol. Ecol. Notes 6, 915-917.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Schwenk, K. (2007) Genetic impoverishment in *Chironomus* cultures. Environ. Toxicol. Chem., im Druck.
- Nowak, C.; Jost, D.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (eingereicht) Effects of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*.
- Oehlmann, J.; Markert, B. (1997) Humantoxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Bachmann, J.; Oetken, M.; Lutz, I.; Kloas, W.; Ternes, T.A. (2006) Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. Environ. Health Persp. 114, 127-133.
- Oetken, M.; Stachel, B.; Pfenninger, M.; Oehlmann, J. (2005a) Impact of a flood disaster on sediment toxicity in a major river system - the Elbe flood 2002 as a case study. Environ. Pollut. 134, 87-95.
- Oetken, M.; Nentwig, G.; Löffler, D.; Ternes, T.; Oehlmann, J. (2005b) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Arch. Environ. Con. Tox. 49, 353-361.
- Oetken, M.; Vogt, C.; Novak, C.; Pfenninger, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2006) Abschlussbericht: Genetische Verarmung als Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen - Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung. Landsanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Deutschland.
- OECD - Organisation for Economic Development and Cooperation (1998) Guideline for testing of chemicals no. 211. *Daphnia magna* reproduction test, adopted September 1998, Paris, Frankreich.
- 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.
- Oliver, D.R. (1971) Life history of the Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* 16, 211–230.
- Oliver, M.A. (1997) Soil and human health: A review. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 573-592.
- Parma, S.; Krebs, B.P.M. (1977) The distribution of chironomid larvae in relation to chloride concentration in a brackish water region of the Netherlands. *Hydrobiologia* 52, 117-126.
- Pascoe, D.; Williams, K.A.; Green, D.J.G. (1989) Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen: Effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia* 175, 109-115.
- Pedina, A. (2001) Vergleichende Sensitivitätsuntersuchungen mit ausgewählten organischen und anorganischen Kontaminanten im Sedimentbiotest (Dosis-Wirkungsbeziehung). Diplomarbeit, Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften, Fachhochschule Zittau-Görlitz, Deutschland.
- Pery, A.R.R.; 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, 59-66.
- Pery, A.R.R.; Mons, R.; Flammarion, P.; Lagadic, L.; Garric, J. (2002) A modelling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2507-2513.
- Pfenninger, M.; Nowak, C.; Kley, C.; Steinke, D.; Streit, B. (2007) Utility of DNA-taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Mol. Ecol.*, im Druck.
- Pinder, L.C.V. (1986) Biology of freshwater Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* 31, 1-23.
- Postma, J.; Davids, C. (1995) Tolerance induction and life-cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotox. Environ. Safe.* 30, 195-200.
- Postma, J.F.; Buckert-de Jong, M.C.; Staats, N.; Davids, C. (1994) Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 143-148.

- Postma, J.; Van Nugteren, P.; Buckert de-Jong, M.B. (1996) Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 332-339.
- Pupp, A. (2005) Genetische Diversität beim Testorganismus *Chironomus riparius* Meigen 1804 unter Temperaturstress und Exposition mit Tributylzinn (TBT). Diplomarbeit, Fachbereich Biowissenschaften, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Rasmussen, J.B. (1984) The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. Hydrobiologia 119, 65-72.
- Raymond, M.; Rousset, F. (1995) Genepop (version 1.2): Population-genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86, 248-249.
- Razzoli, M.; Papa, R.; Valsecchi, P.; Marzano, F.N. (2003) AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). J. Hered. 94, 507-511.
- Reed, D.H.; Lowe, E.H.; Briscoe, D.A.; Frankham, R. (2003) Fitness and adaptation in a novel environment: Effect of inbreeding, prior environment, and lineage. Evolution 57, 1822-1828.
- Ristola, T.; Pellinen, J.; Roukolainen, M.; Kostamo, A.; Kukkonen, J.V.K. (1999) Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). Environ. Toxicol. Chem. 18, 756-764.
- Ristola, T.; Parker, D.; Kukkonen, J.V.K. (2001) Life-cycle effects of sediment associated 2,4,5-trichlorophenol on two groups of the midge *Chironomus riparius* with different exposure histories. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1772-1777.
- Sarradin, P.M.; Lapaquellerie, Y.; Astruc, A.; Latouche, C.; Astruc, M. (1995) Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. Sci. Total Environ. 170, 59-70.
- Sattelberger, R. (2002) Organozinnverbindungen in der aquatischen Umwelt. BE-214. Umweltbundesamt GmbH, Wien, Österreich.
- Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide for using and evaluating microsatellite markers. Ecol. Lett. 9, 615-629.
- Sibley, P.K.; Benoit, D.A.; Ankley, G.T. (1997) The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity test: Relationship to reproduction and demographic endpoints. Environ. Toxicol. Chem. 16, 336-345.
- Sildanchandra, W.; Crane, M. (2000) Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* Meigen on toxic effects of cadmium. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2309-2313.

- Spielman, D.; Frankham, R. (1992) Modelling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: improvement of reproductive fitness due to immigration of one individual into small partially inbred populations. *Zoo Biol.* 11, 343–351.
- Staton, J.L.; Schizas, N.V.; Chandler, G.T.; Coull, B.C.; Quattro, J.M. (2001) Ecotoxicology and population genetics: The emergence of “phylogeographic and evolutionary ecotoxicology”. *Ecotoxicology* 10, 217-222.
- Stevens, M.M. (1998) Development and survival of *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera: Chironomidae) at a range of constant temperatures. *Aquat. Insect.* 20, 181-188.
- Stewart, C.; De Mora, S.J. (1990) A review of the degradation of tri(n-butyl)tin in the marine environment. *Environ. Technol.* 11, 565-570.
- Stohler, R.A.; Curtis, J.; Minchella, D.J. (2004) A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 34, 595-601.
- Stoeppler, M. (1991) Cadmium. In: *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance* (E. Merian, Hrgs.), pp. 804-851. VCH, Weinheim.
- Streloke, M.; Köpp, H. (Hrgs.) (1995) Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- and Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Ausgabe 315*.
- Surakarn, R.; Yano, K. (1995) Development of a paddy-dwelling chironomid, *Chironomus kiiensis* (Diptera, Chironomidae) under different temperatures. *Jpn. J. Entomol.* 63, 389-398.
- Taenzler, V.; Bruns, E.; Dorgerloh, M.; Pfeifle, V.; Weltje, L. (2007) Chironomids: suitable test organisms on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology*, im Druck.
- Taylor, S.R.; McLennan, S.M. (1985) *The continental crust: Its composition and evolution*. Blackwell, Oxford, U.K.
- Triffault-Bouchet, G.L.; Clement, B.; Blake, G. (2005) Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/sediment microcosm assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2243-2253.
- UBA - Umweltbundesamt (2001) *Organische Zinnverbindungen, Alkylphenole und Bisphenol A in marinen und limnischen Biota der Umweltprobenbank*. Texte 06/01, Berlin, Deutschland.

- UBA - Umweltbundesamt (2002) Daten zur TBT-Konzentrationen in Sedimenten und Schwebstoffen in Fließgewässern Deutschlands der ARGE Elbe und LAWA zur Berichterstattung gemäß EG-RL 76/464, Mail vom 25.09.2002 in BUA - Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.) (2003) BUA Stoffbericht 238 (Ergänzungsberichte IX) Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid) (Nr. 36). S. Hirzel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland.
- US-EPA – United States Environmental Protection Agency (2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, Washington DC, USA.
- Vallenduuk, H.J.; Morozova, E. (2005) *Cryptochironomus*. An identification key to the larvae and pupal exuviae in Europe. *Lauterbornia* 55, 1-22.
- Van Straalen, N.M.; Timmermans, M. (2002) Genetic variation in toxicant-stressed populations: An evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 983-1002.
- Vogt, C. (2003) Effekte von endokrin aktiven Arzneimitteln auf die Zuckmücke *Chironomus riparius* und die Wasserassel *Asellus aquaticus*. Diplomarbeit, Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften, Fachhochschule Zittau-Görlitz, Deutschland.
- Vogt, C.; Galluba, S.; Belz, D.; 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. Heal. A* 42, 1-9.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Barateiro Diogo, J.; 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*, im Druck.
- Vogt, C.; Pupp, A.; Nowak, C.; Jagodzinski, L.S.; Baumann, J.; Jost, D.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (akzeptiert) Interaction between genetic diversity and temperature stress on life-cycle parameters and genetic variability of *Chironomus riparius* populations. *Climate Res.*
- Watanabe, N.; Sakai, S.; Takatsuki, H. (1992) Examination for degradation paths of butyltin compounds in natural waters. *Water Sci. Technol.* 25, 117-124.

- Watts, M.M.; Pascoe, D. (1996) Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. *Water Sci. Technol.* 34, 101–107.
- Watts, M.; Pascoe, D. (2000a) Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1885-1892.
- Watts, M.M.; Pascoe, D. (2000b) A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 299–306.
- Wentzel, R.; McIntosh, A.; Atchison, G. (1977) Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on the midge larvae (*Chironomus tentans*). *Hydrobiologia* 6, 153-156.
- Whitehead, A.; Anderson, S.L.; Kuivila, K.M.; Roach, J.L.; May, B. (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: Implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol. Ecol.* 12, 2817-2833.
- Woods, P.E.; Paulauskis, J.D.; Weigt, L.A.; Romano, M.A.; Guttman, S.I. (1989) Genetic variation in laboratory and field populations of the midge, *Chironomus tentans* Fab.: Implications for toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1067-1074.

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Oehlmann für die Überlassung des Promotionsthemas, die kompetente und tageszeitunabhängige Betreuung. Er war mir ein wertvollen Ratgeber, moralische Stütze und stets zum Gedankenaustausch bereit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Schulz für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dem BW-Plus-Programm „Lebensgrundlage und ihre Sicherung“ danke ich für die finanzielle Unterstützung und die ausgesprochen gute Zusammenarbeit. Weiterhin gilt mein Dank der Mannschaft des Forschungsschiffs Max-Honsell, besonders Jens Stork, für die tatkräftige Unterstützung bei den Freilanduntersuchungen.

Dem Projektleiter des BW-Plus-Projektes Dr. Matthias Oetken möchte ich nicht nur für seine Bemühungen, die zahlreichen Hinweise und die ständige Diskussionsbereitschaft danken, sondern auch für die tatkräftige Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.

Ein weiterer Dank gilt den MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie. Bei Ihnen möchte ich mich für das gute Arbeitsklima, den stets heißen Kaffee und die vielen schönen Stunden bedanken.

Den vielen Helfern, die im Hintergrund mitgewirkt haben, möchte ich ebenfalls danken. Den DiplomandInnen Maren Heß, Annika Pupp, Christoph Kley, Daniel Jost und Andreas Czeikowitz, die ich zusammen mit Carsten Nowak betreuen durfte, danke ich für ihren Arbeitseinsatz und die gute Zusammenarbeit. Außerdem möchte ich mich bei den vielen studentischen Hilfskräften und PraktikantInnen, besonders bei Sylvia Schmidt, Stephanie Well, Dominic Kaiser, Jonas Baumann, Lucas Jagodzinski, Simone Galluba und Agnes Sieratowicz, ganz herzlich für die tatkräftigen und aufopferungsvollen Stunden bei der gefährlichen Mückenpflege bedanken.

Für die zahlreichen Elementanalysen möchte ich mich bei den Mitarbeitern des umweltanalytischen Labors des IHI in Zittau, Gerlinde Liepelt und Heike Heidenreich, bedanken. Außerdem sei dem Team des GALAB Labors Geesthacht für die umfangreichen TBT-Analysen gedankt.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Freund und Kollegen Carsten Nowak für die gute Kooperation, das stets offene Ohr und die vielen aufmunternden Worte. Mit ihm war es zu jeder Tageszeit möglich, endlose Ausflüge in das Reich der Populationsgenetik zu unternehmen. Außerdem bedanke ich mich dafür, dass er mir stets den Rücken gestärkt hat und für die Möglichkeit mit ihm durch dick und dünn zu gehen.

Olaf „St. Pauli“ Dittberner, Joao Barateiro Diogo und Stefan Nowak ein herzliches Dankeschön für wertvolle Ratschläge in anderen elementaren Fragen des Lebens. Sie waren mir eine große Hilfe, um ab und zu die Gedanken auf andere Spuren zu bringen.

Danken möchte ich auch Dr. Lennart Weltje für die Diskussionsbereitschaft und die vielen interessanten, wissenschaftlichen Anregungen. Mit ihm war es möglich, schier unendliche Datenkolonnen in geordnete Bahnen zu pressen.

Meinen Eltern und Geschwistern, Anne und Tobias danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung besonders beim Zusammenschreiben dieser Arbeit. Sie waren mir auch in schwierigen Stunden ein sicherer Rückhalt. Ihnen ist es zu verdanken, dass ich mich voll auf die Erstellung der Arbeit konzentrieren konnte.

Meiner Freundin Claudia danke ich für die wissenschaftliche Hilfe, die unzähligen Korrekturen, sowie das scheinbar grenzenlose Verständnis für meine physischen und psychischen Unzulänglichkeiten. Vor allem danke ich ihr für ihre Liebe und Zuneigung in schwierigen Stunden. Het was nooit gemakkelijk met mij.

Verzeichnis der Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Nowak, C.; Hankeln, T.; Schmidt, E.R.; Schwenk, K. (2006) Development and localization of microsatellite markers for the sibling species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* (Diptera: Chironomidae). Mol. Ecol. Not. 6, 915-917.
- Nowak, C.; Pupp, A.; Vogt, C. (2006) Reaktion genetisch verarmter Populationen der Zuckmücke *Chironomus riparius* auf anthropogen verursachten Umweltstress - Konsequenzen für den Artenschutz. In: Korn, H. and U. Feit (Hrsg.): Treffpunkt Biologische Vielfalt VI. BfN-Script 164, 199-204.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Schwenk, K. (2007) Genetic impoverishment in *Chironomus* cultures. Environ. Toxicol. Chem., im Druck.
- Oetken, M.; Vogt, C.; Novak, C.; Pfenninger, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2006) Abschlussbericht (BWR 22018) „Genetische Verarmung als Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen – ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung“. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Deutschland.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2006) Umweltschadstoffe und genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen - Ergebnisse einer Multigenerationsstudie mit *Chironomus riparius*. In: Erweiterte Zusammenfassung der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) in Karlsruhe, 487-491. Weissenseeverlag, Berlin, Deutschland.
- Vogt, C.; Galluba, S.; Belz, D.; Nowak, C.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2007) 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. Heal. A 42, 1-9.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Barateiro Diogo, J.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2007) Multi-generation studies with *Chironomus riparius* - Effects of low tributyltin concentrations on life-history parameters and genetic diversity. Chemosphere, im Druck.

In Vorbereitung

- Barateiro Diogo, J.; Natal da Luz, T.; Sousa, P.; Vogt, C.; Nowak, C. (eingereicht) Reaction of genetically differentiated populations of the collembolan *Folsomia candida* to phenmedipham exposure.
- Nowak, C.; Jost, D.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (eingereicht) Effects of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Pfenninger, M.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (in Bearbeitung) Genetic impoverishment in tributyltin exposed strains of the midge *Chironomus riparius* (Meigen).
- Vogt, C.; Pupp, A.; Nowak, C.; Jagodzinski, L.S.; Baumann, J.; Jost, D.; Oetken, M.; Oehlmann J. (akzeptiert) Interaction between genetic diversity and temperature stress on life-cycle parameters and genetic variability of *Chironomus riparius* populations. *Climate Res.*

Weitere Publikationen

- Gerhardt, A.; Orendt, C.; Dettinger-Klemm, P.M.A.; De Bisthoven, L.J.; Michiels, S.; Otto, C.J.; Vogt, C. (DGL-AK "Chironomiden als Bioindikatoren") (2006) Chironomiden: Potential und Einsatzmöglichkeiten im Biomonitoring von Gewässern - ein Überblick. *DGL-Mitteilungen I/2006*, 49-57.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2006) Umweltschadstoffe und genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen - Ergebnisse einer Multigenerationsstudie mit *C. riparius*. In: Erweiterter Tagungsband der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL), Karlsruhe, 487-491.

Abstracts

- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2004) Genetic impoverishment on invertebrates caused by environmental pollutants. In: Abstract-Band, SETAC-GLB-Tagung in Aachen, Deutschland, 86.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Schwenk, K. (2004) Determine the level of genetic impoverishment in laboratory cultures of *Chironomus riparius* (Meigen) using microsatellite markers. In: Abstract-Band, SETAC-GLB-Tagung in Aachen, Deutschland, 177.

- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2004) Genetic impoverishment in invertebrates caused by environmental pollutants. In: Abstract-Band, Trilateraler Workshop der Euroregion Neiße in Zittau, Deutschland, 35.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Oetken, M.; Schwenk, K. (2005) Effects of pollution stress on the genetic diversity in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). In: Abstract-Band, 4. Internationales Symposium für Ökologische Genetik in Antwerpen, Belgien, 58.
- Nowak, C.; Pupp, A.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2005) Effects of temperature on *Chironomus riparius* populations with different levels of genetic diversity. In: Abstract-Band, SETAC-Europe-Tagung in Lille, Frankreich, 175.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2005) Genetic diversity of chironomid populations influences the effects of chronic TBT exposure. In: Abstract-Band, SETAC-Europe-Tagung in Lille, Frankreich, 176.
- Nowak, C.; Barateiro Diogo, J.; Vogt, C.; Schwenk, K. (2005) Development of microsatellite markers for *Chironomus riparius*: A tool to determine the effects of environmental stressor on genetic diversity. In: Abstract-Band, SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich, 286.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Genetic effects of population stress in *Chironomus riparius* populations. In: Abstract-Band, SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich, 176.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Pfenninger, M.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Umweltschadstoffe und genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen – Ergebnisse einer Multigenerationsstudie mit *C. riparius*. In: Abstract-Band, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) in Karlsruhe, Deutschland, 125.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Adaptation von *Chironomus riparius* an TBT – Ergebnisse einer Multigenerationsstudie. In: Abstract-Band, SETAC-GLB-Tagung in Basel, Schweiz, 84.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Pfenninger, M.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Die Rolle genetischer Diversität in der Ökotoxikologie am Beispiel von *Chironomus riparius*. In: Abstract-Band, SETAC-GLB-Tagung in Basel, Schweiz, 88.
- Pupp, A.; Nowak, C.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2005) Genetische Diversität beeinflusst die Reaktion auf Temperaturstress bei *Chironomus riparius*. In: Abstract-Band, SETAC-GLB-Tagung in Basel, Schweiz, 202.

- Nowak, C.; Jost, D.; Czeikowitz, A.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K. (2006) Consequences of inbreeding and reduced genetic variation on the sensitivity of cadmium stress in *Chironomus riparius*. In: Abstract-Band SETAC-GLB-Tagung, Landau, Deutschland, 68.
- Jost, D.; Nowak, C.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2006) Inbreeding reinforces sensitivity to Cd stress in *Chironomus riparius* populations. In: Abstract-Band SETAC-GLB-Tagung, Landau, Deutschland, 202.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Heß, M.; Baumann, J.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2006) Effects of TBT on the fitness and the genetic diversity of *Chironomus riparius* populations – results from two multi-generation studies. In: Abstract-Band SETAC-GLB-Tagung, Landau, Deutschland, 258.

Vorträge

- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2004) Genetic impoverishment on invertebrates caused by environmental pollutants. SETAC-GLB-Tagung in Aachen, Deutschland.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Pfenninger, M.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Umweltschadstoffe und genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen – Ergebnisse einer Multigenerationsstudie mit *C. riparius*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) in Karlsruhe, Deutschland.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2005) Adaptation von *Chironomus riparius* an TBT – Ergebnisse einer Multigenerationsstudie. SETAC-GLB-Tagung in Basel, Schweiz.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2006) Beeinflussen Umweltstressoren die genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen – Ergebnisse von Multigenerationsstudien mit *C. riparius*. Gastvortrag im Hydrobiologischen Seminar der TU Dresden.
- Vogt, C.; Heß, M.; Nowak, C. (2006) Auswirkungen des Pestizids TBT auf die Fitness und genetische Populationsstruktur von *Chironomus riparius*. Interdisziplinäres Expertentreffen für Biodiversität des Bundesamts für Naturschutz (BfN) auf der Insel Vilm, Deutschland.

Poster

- Nowak, C.; Vogt, C.; Schwenk, K. (2004) Determine the level of genetic impoverishment in laboratory cultures of *Chironomus riparius* Meigen using microsatellite markers. SETAC-GLB-Tagung in Aachen, Deutschland.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Oetken, M.; Schwenk, K. (2005) Effects of pollution stress on the genetic diversity in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). 4. Internationales Symposium für Ökologische Genetik in Antwerpen, Belgien.
- Pupp, A.; Nowak, C.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K. (2005) Interactions between genetic diversity and temperature stress in *Chironomus riparius* populations. SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Kley, C.; Pfenninger, M.; Oetken, M.; Streit, B.; Oehlmann, J.; Schwenk, K. (2005) Population genetic markers in ecotoxicology – the example of *Chironomus riparius*. SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich.
- Nowak, C.; Barateiro Diogo, J.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K. (2005) Comparing apples with oranges – genetic diversity of *Chironomus riparius* test cultures does not represent natural variation. SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2005) Genetic diversity of chironomid populations influences the effects of chronic TBT exposure. SETAC-Europa-Tagung in Lille, Frankreich.
- Pupp, A.; Nowak, C.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2005) Genetische Diversität beeinflusst die Reaktion auf Temperaturstress bei *Chironomus riparius*. SETAC-GLB-Tagung in Basel, Schweiz.
- Nowak, C.; Baumann, J.; Vogt, C. (2006) Genetische Vielfalt und Schadstoffstress - Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung. Erste Tagung des Netzwerkes-Biodiversität, Frankfurt, Deutschland.
- Jost, D.; Nowak, C.; Vogt, C.; Oetken, M.; Schwenk, K.; Oehlmann, J. (2006) Inbreeding reinforces sensitivity to Cd stress in *Chironomus riparius* Populations. SETAC-GLB-Tagung in Landau, Deutschland.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Hess, M.; Baumann, J.; Schwenk, K.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2006) Effects of TBT on the fitness and the genetic diversity of *Chironomus riparius* populations – results from two multi-generation studies. SETAC-GLB-Tagung in Landau, Deutschland.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Christian Vogt
Geburtsdatum	24.03.1979
Geburtsort	Zittau (Sachsen)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1985 – 1989	Erich Böhm Grundschule Jonsdorf
1989 – 1997	Richard von Schlieben Gymnasium Zittau (Abitur)
1997 – 1998	Wehrdienst
1998 – 2003	Studium an der Hochschule für Technik, Wirtschaft und Soziales Zittau/Görlitz im Studiengang Ökologie und Umweltschutz, Diplomarbeit: Effekte von hormonell wirksamen Arzneimitteln auf die Zuckmücke <i>Chironomus riparius</i> und die Wasserassel <i>Asellus aquaticus</i> (Prof. Ramm, Prof. Oehlmann); Abschluss Dipl.-Ing. für Ökologie und Umweltschutz (FH).
2003 – 2006	Promotionsstudium im Fachbereich Biowissenschaften der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main (Prof. Oehlmann).

Beruflicher Werdegang

2000	Praxissemesterarbeit im Projekt „Erstellung eines Landschaftsplanes für die Gemeinde Hainewalde (Sachsen)“.
2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt „Entwicklung und Implikation eines Rechtskatasters für die Klassmann-Deilmann AG, Geeste Groß-Hesepe“ in Kooperation mit der DEKRA Umwelt GmbH.
2003 -2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main: Bearbeitung des Projektes „Genetische Verarmung bei Wirbellosen in Folge von Schadstoffstress – Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung“.

Anhang

Sämtliche Rohdaten der Life-Cycle-Experimente mit *Chironomus riparius* und die physiko-chemischen Parameter des Testwassers/ -sediments können auf der beigefügten CD-Rom nachgelesen werden.