

# Eine Weight-of-Evidence-Studie zur Bewertung der Sedimentbelastung und des Fischrückgangs in der Oberen Donau

**Henner Hollert · Steffen Keiter · Melanie Böttcher · Steffi Grund · Nadja Seitz · Jens Otte · Kerstin Bluhm · Karl Wurm · Markus Hecker · Eric Higley · John Giesy · Helena Takner · Bert van Bavel · Magnus Engwall · Georg Reifferscheid · Werner Manz · Lothar Erdinger · Tobias Schulze · Urte Luebecke-van Varel · Ulrike Kammann · René Schöneberger · Marc Suter · Werner Brack · Uwe Strähle · Thomas Braunbeck**

Eingegangen: 15. April 2009/Akzeptiert: 29. April 2009/Online veröffentlicht: 16. Mai 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Zusammenfassung** *Hintergrund und Ziel der Studie* Die Fischbestände in der Donau sind seit Ende der 1980er-Jahre stark rückläufig. Trotz intensiver bestandsstützender Maßnahmen und einer verbesserten Wasserqualität entlang der Donau seit den 1970er-Jahren konnte diese Entwicklung nicht gestoppt werden. Ziel der umfassenden Weight-of-Evidence-Studie (WOE) mit verschiedenen Lines-of-Evidence war es, 1) mögliche kausale Verbindungen zwischen molekularen und zellbiologischen Endpunkten sowie ökologisch relevanten Effekten zu analysieren, und 2) zu überprüfen, ob die ökotoxikologischen Effekte für den Rückgang der Fische verantwortlich sein könnten. Dazu wurden Sedi-

mente und Fische an verschiedenen Standorten der Donau entnommen und in einem integrierten Ansatz untersucht. Das Ziel dieses Beitrages ist es, die Untersuchungsstrategie und den Stand der seit 2003 laufenden Studie vorzustellen. Wie kürzlich von Chapman und Hollert (2006) vorgestellt, wurde als Untersuchungsstrategie eine WOE-Studie mit zahlreichen Lines-of-Evidence eingesetzt. 1) Mit einer Bio-testbatterie wurde die akute und mechanismusspezifische Toxizität untersucht, 2) histologische Untersuchungen und der Mikroerntest mit Fischzellen wurden als In-situ-Studien durchgeführt. 3) Die Diversität und Abundanz von Makroinvertebraten und Fischen sowie 4) die Konzentrationen von ausgewählten persistenten organischen Verbindungen, endokrinen Disruptoren und Schwermetallen wurde be-

Verantwortliche Herausgeber: Jan Schwarzbauer · Peter Heininger · Evelyn Claus

H. Hollert (✉) · K. Bluhm  
Institut für Umweltforschung (Biologie V),  
Lehr- und Forschungsgebiet für Ökosystemanalyse,  
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen,  
Worringerweg 1, 52074 Aachen, Deutschland  
E-Mail: Henner.Hollert@bio5.rwth-aachen.de

H. Hollert · S. Keiter · M. Böttcher · S. Grund · N. Seitz · J. Otte ·  
K. Bluhm · T. Braunbeck  
Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie,  
Universität Heidelberg,  
Im Neuenheimer Feld 230, 69120 Heidelberg, Deutschland

M. Hecker · E. Higley · J. Giesy  
Toxicology Centre, University of Saskatchewan,  
44 Campus Drive, Saskatoon, SK S7N 5B3, Kanada

H. Takner · B. van Bavel · M. Engwall  
MTM Research Center, Örebro University,  
701 82 Örebro, Schweden

G. Reifferscheid · W. Manz  
Bundesanstalt für Gewässerkunde, Referat G3 Ökotoxikologie  
und Biochemie,  
Am Mainzer Tor 1, 56068 Koblenz, Deutschland

L. Erdinger  
Hygiene Institut der Universität Heidelberg, Abt. Hygiene  
und Med. Mikrobiologie,  
Im Neuenheimer Feld 324, 69120 Heidelberg, Deutschland

T. Schulze · U. Luebecke-van Varel · W. Brack  
Helmholtz Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Department  
für Wirkungsorientierte Analytik,  
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Deutschland

U. Kammann  
Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Bundesforschungsinstitut  
für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut  
für Fischereiökologie,  
Palmaille 9, 22767 Hamburg, Deutschland

R. Schöneberger · M. Suter  
Eawag,  
Ueberlandstrasse 133, Postfach 611, 8600 Dübendorf, Schweiz

U. Strähle  
Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft,  
Institut für Toxikologie und Genetik (ITG),  
Hermann-von Helmholtz-Platz 1,  
76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

stimmt. 5) Um die Substanzen zu identifizieren, die für die toxischen Effekte in den Sedimenten verantwortlich sind, wurden effektdirigierte Analysen durchgeführt.

**Schlüsselwörter** Donau · Effektdirigierte Analyse · Fischrückgang · Weight-of-Evidence · Wasserrahmenrichtlinie

### Assessing sediments and fish health using a weight-of-evidence approach – in search for the causes of fish decline in the Danube River

**Abstract** *Background and aim* Despite intensive and continuous stocking and improvement of water quality since the 1970s, fish populations, especially those of the grayling (*Thymallus thymallus*), have declined over the last two decades in the upper Danube River (Germany). In order to assess 1) possible links between molecular/biochemical responses and ecologically relevant effects, and 2) if ecotoxicological effects might be related to the decline in fish catches in the upper Danube river, sediment samples and fish were collected at different locations and analyzed using a weight-of-evidence (WOE) approach with several lines of evidence. The objective of the presentation is to introduce the conceptual framework and to review results of the ongoing study. As previously addressed by Chapman and Hollert (2006) a variety of lines of evidence can be used in WOE studies. Briefly, 1) a comprehensive battery of acute and mechanism-specific bioassays was used to characterize the ecotoxicological hazard potential. 2) Histopathological investigations and the micronucleus assay with erythrocytes were applied, analyzing *in situ* parameters. 3) Diversity and abundance of benthic macroinvertebrates and fish as well as 4) persistent organic pollutants, endocrine disrupting substances, limnochemical parameters and the concentration of heavy metals were recorded. To identify organic contaminants a potential causes of sediment toxicity assays, 5) effect directed analysis was applied.

**Keywords** Danube · Effect-directed analysis · European Water Framework Directive · Fish decline · Weight-of-evidence

## 1 Einleitung

In verschiedenen Flüssen in Europa und Nordamerika wird seit einigen Jahren ein Rückgang der Fischbestände beobachtet. Auch die Fischbestände in der oberen Donau zwischen Sigmaringen und Ulm sind seit Ende der 1980er-Jahre stark rückläufig. Insbesondere die Äsche (*Thymallus thymallus*) ist von diesem Rückgang betroffen, aber auch

Fischarten wie die Barbe (*Barbus barbus*) sind in ihren Beständen zurückgegangen. Trotz intensiver bestandsstützender Maßnahmen und einer deutlichen Verbesserung der Wasserqualität entlang der Donau seit den 1970er-Jahren konnte dieser Entwicklung nicht entgegengewirkt werden (Keiter et al. 2009).

## 2 Ziel

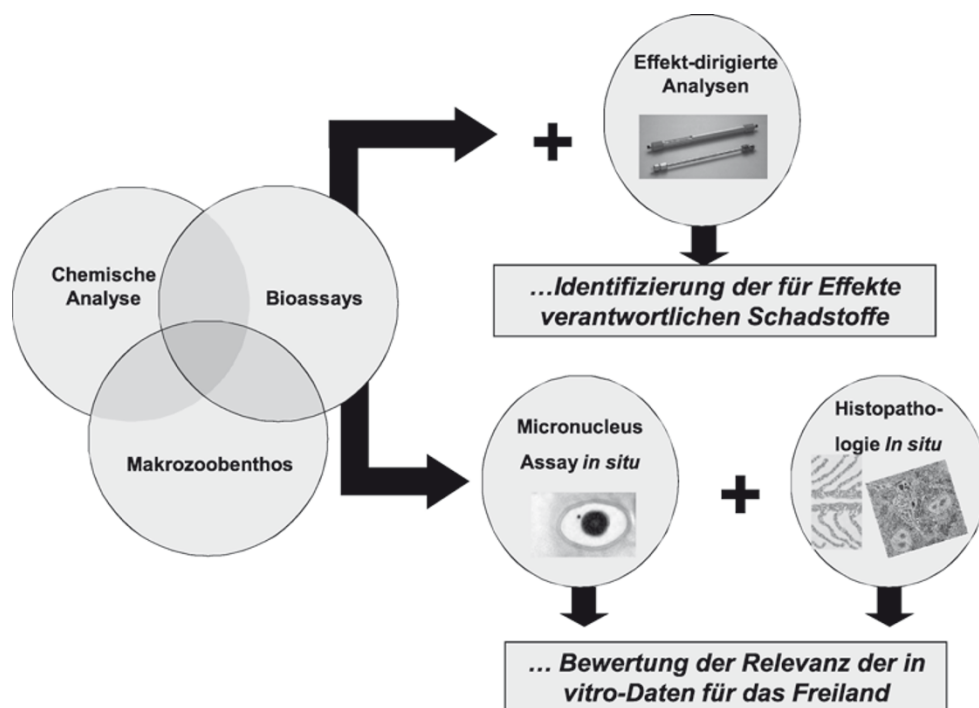
In diesem Übersichtsbeitrag soll ein Überblick über die verschiedenen Untersuchungen zum Rückgang der Fischbestände in der oberen Donau gegeben werden. Ein Schwerpunkt des Beitrages liegt auf der Vorstellung einer Weight-of-Evidence-Studie, die in den Jahren 2002 bis 2009 am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg durchgeführt wurde. In der integrierten Studie wurde das Triade-Konzept zu einer Weight-of-Evidence-Strategie mit unterschiedlichen Beweislinien (lines-of-Evidence) erweitert (Abb. 1, vgl. Chapman und Hollert 2006). Eine detailliertere Übersichtsdarstellung zu dieser Thematik geben Keiter et al. (2009).

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Die obere Donau wurde in den 1920er-Jahren in weiten Abschnitten begradigt und dadurch hydromorphologisch stark verändert. Das Makrozoobenthos als bedeutende Nahrungsquelle für viele Fischarten ist ebenfalls von Veränderungen in den morphologischen Verhältnissen in einem Gewässer betroffen, jedoch konnte bei entsprechenden Untersuchungen in den vergangenen Jahren keine gravierende Störung in der Makrozoobenthos-Zusammensetzung festgestellt werden. In den vergangenen Jahrzehnten wurden in der Donau hauptsächlich Untersuchungen zur Gewässergüte durchgeführt, die sich im Zuge von Aus- und Neubau zahlreicher Kläranlagen stetig verbessert hat. Untersuchungen zur Belastung mit prioritären organischen Schadstoffen in Sedimenten hingegen begannen erst Mitte der 1990er und zeigten zunächst eine deutliche Abnahme z. B. der Konzentrationen mehrkerniger aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAHs). Ergebnisse eigener Untersuchungen ergaben jedoch sehr hohe PAH-Konzentrationen in zwei Sedimentproben (Schwarzach  $\Sigma$  16 PAHs = 26,3 mg/kg; Öpfingen  $\Sigma$  16 PAHs = 5,3 mg/kg; Keiter et al. 2008).

Im Jahr 2002 wurde die obere Donau erstmals unter ökotoxikologischen Gesichtspunkten untersucht (Keiter et al. 2006). Dabei wurde für verschiedene Abschnitte der oberen Donau ein hohes ökotoxikologisches Belastungspotenzial festgestellt. Als direkte Folge dieser Studie wurde im Sinne des Weight-of-Evidence-Konzeptes eine umfassende Untersuchung der oberen Donau initiiert, um mögliche Ursachen für den Fischrückgang und Belastungsschwerpunkte zu

**Abb. 1** In dieser Studie wurde das Triade-Konzept zu einer Weight-of-Evidence-Strategie mit unterschiedlichen Beweislinien (Lines-of-Evidence) erweitert (vgl. Chapman und Hollert 2006)



identifizieren. Neben Untersuchungen zur ultrastrukturellen Organisation der Leber an der Barbe (*Barbus barbus*) wurde der Mikrokerntest als definitiver Mutagenitätstest an Erythrocyten und Leberproben von Barben aus dem Freiland und entsprechenden Kontrolltieren als In-situ-Test durchgeführt. Die verschiedenen In-vitro-Biotestbefunde (Seitz et al. 2008) korrelierten auch mit den Befunden aus den In-situ-Tests (Böttcher et al. 2009; Grund et al. 2009a).

Nachdem eine insgesamt hohe dioxinähnliche Aktivität nachgewiesen werden konnte (Keiter et al. 2008; Otte et al. 2008), wurden die Sedimentproben in drei Instituten parallel mit drei verschiedenen Biomarkern für Ah-Rezeptor-Agonisten untersucht (Keiter et al. 2008). Dabei wurden in allen eingesetzten Testverfahren sehr hohe TCDD-Äquivalenzkonzentrationen ermittelt, sodass die Donausedimente dieser Standorte im Vergleich zu anderen untersuchten Sedimenten deutscher Einzugsgebiete als hoch belastet klassifiziert werden müssen. Von der vergleichsweise hohen Aktivität der Sedimente im EROD-Assay (Biomarker für dioxinähnliche Substanzen) konnte in chemischen Analysen jedoch nur ein geringer Anteil durch prioritäre Schadstoffe erklärt werden. Mit einer einfachen effektdirigierten Analyse (Multilayerfraktionierung) konnte hingegen gezeigt werden, dass ein Großteil der dioxinähnlichen Aktivität an diesen Standorten von unbekanntem und mäßig persistenten Schadstoffen ausging. Eine Ausnahme stellte der Zufluss Schwarzach dar, für dessen Sedimente eine Summenkonzentration von 26,3 mg/kg für die EPA-PAHs ermittelt werden konnte, sodass sie mit dem ATV-Klassifikationsschema der ARGE Elbe in die Qualitätsklasse V (schlechteste Qua-

litätsklasse nach ATV) gruppiert wurden. In dieser Probe konnten etwa 50% der dioxinähnlichen Wirksamkeit im Biotest durch prioritäre PAHs und ca. 20% durch persistente Schadstoffe (u. a. PCBs und PCDD/Fs) erklärt werden (Keiter et al. 2008). Insgesamt verdeutlichen diese Befunde, dass in den meisten Fällen mit den Konzentrationen der chemisch quantifizierten organischen Schadstoffe (Liste der prioritären Stoffe aus dem Anhang der EU-WRRL sowie zusätzliche PCDD/Fs) die nachgewiesenen starken biologischen Effekte nicht erklärt werden können. Es liegt daher – analog zu anderen Untersuchungen in europäischen Flusseinzugsgebieten – der Schluss nahe, dass nicht-prioritäre organische Schadstoffe in den Sedimenten für die Effekte in den Biotests und möglicherweise auch für einen Großteil der Feldeffekte (Mikrokerntest *in situ*, histopathologische Veränderungen der Fische, Störungen der Altersstruktur der Fische) verantwortlich sind (Brack et al. 2007; Hollert et al. 2007; Keiter et al. 2009).

#### 4 Ausblick

Durch die in der Weight-of-Evidence-Studie verwendeten Tests konnte gezeigt werden, dass an der Donau eine erhebliche ökotoxikologische Belastungssituation vorliegt, die auch einen Einfluss auf die Fischpopulationen ausüben könnte. Jedoch werden noch weitere Untersuchungen notwendig sein, um letztlich die genauen Ursachen für den Rückgang der Fischpopulationen zu identifizieren. Derzeit wird hierzu eine effektdirigierte Analyse zur Identifizierung der beteilig-

ten Stoffe und deren mögliche Quellen durchgeführt, deren Befunde ebenfalls vorgestellt werden (Grund et al. 2009b, 2009c; Higley et al. 2009). Außerdem wird innerhalb dieser Studie das endokrine Belastungspotenzial der Donau mittels histopathologischer Untersuchungen an Gonaden aus Freilandfischen und verschiedener In-vitro-Testverfahren abgeschätzt. Des Weiteren sollen in einem geplanten Verbundprojekt COMPSEARCH durch vergleichende Untersuchungen verschiedene Eintragspfade auf ihr ökotoxikologisches Schädigungspotenzial sowie der potenzielle Einfluss des Wandels der Landnutzung überprüft werden.

## Literatur

- Böttcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Manz W, Seitz N, Reifferscheid G, Soares Rocha P, Hollert H, Braunbeck T (2009) Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* (in Revision)
- Brack W, Klamer HJ, Lopez de Alda M, Barcelo D (2007) Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins a review. *Environ Sci Pollut Res* 14:30–38
- Chapman PM, Hollert H (2006) Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *J Soils Sediments* 6:4–8
- Grund S, Keiter S, Böttcher M, Seitz N, Wurm K, Manz W, Hollert H, Braunbeck T (2009a) Assessment of fish health status in the Upper Danube river by investigation of ultrastructural alterations in the liver of barbel (*Barbus barbus*, L.) and its correlation to sediment quality. *Ecology of Freshwater Fish* (eingereicht)
- Grund S, Higley E, Schöneberger E, Suter M, Giesy J, Braunbeck T, Hecker M, Hollert H (2009b) Assessment of the endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) using a battery of receptor-based and non-receptor-based *in vitro* bioassays and bio-analytical methods. *Aquatic Toxicol* (eingereicht)
- Grund S, Schulze T, Luebcke-van Varel U, Braunbeck T, Brack W, Hollert H (2009c) Effect-directed analysis of ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in sediment samples from the Upper Danube River (Germany). Manuskript. *Environ Tox Chem* (eingereicht)
- Higley E, Grund S, Schulze T, Luebcke-van Varel U, Giesy J, Braunbeck T, Brack W, Hollert H, Hecker M (2009) Assessment of endocrine disrupting potentials of Danube River sediments with the H295R Steroidogenesis Assay using effect-directed analysis. *Aquatic Toxicol* (eingereicht)
- Hollert H, Heise S, Keiter S, Heining P, Förstner U (2007) Wasser-rahmenrichtlinie – Fortschritte und Defizite. *Umweltwiss Schadst Forsch* 19:58–70
- Keiter S, Rastall AC, Kosmehl T, Wurm K, Erdinger L, Braunbeck T, Hollert H (2006) Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube River – a pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environ Sci Pollut Res* 13:308–319
- Keiter S, Grund S, van Bavel B, Engwall M, Hagberg J, Kammann U, Klempt M, Manz W, Olsman H, Braunbeck T, Hollert H (2008) Activities and identification of Ah receptor agonists in sediments from the Danube River. *Anal Bioanal Chem* 390:2009–2020
- Keiter S, Böttcher M, Grund S, Seitz N, Braunbeck T, Hollert H (2009) Der Fischrückgang in der oberen Donau. *Umweltwiss Schadst Forsch* 20(2):186–196
- Otte JC, Andersson C, Abrahamson A, Olsman H, Keiter S, Engwall M, Hollert H, Brunstrom B (2008) A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River: ethoxyresorufin-O-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Environ Int* 34:1176–1184
- Seitz N, Böttcher M, Keiter S, Kosmehl T, Manz W, Hollert H, Braunbeck T (2008) A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. *Mutat Res* 652:38–45