

DanTox – ein BMBF-Verbundprojekt zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

Steffen Keiter · Sabrina Peddinghaus · Ute Feiler · Britta von der Goltz · Christoph Hafner · Nga Yu Ho · Sepand Rastegar · Jens C. Otte · Richard Ottermanns · Georg Reifferscheid · Uwe Strähle · Thomas Braunbeck · Monika Hammers-Wirtz · Henner Hollert

Eingegangen: 14. Februar 2010 / Akzeptiert: 15. Februar 2010 / Online veröffentlicht: 10. März 2010
© Springer-Verlag 2010

Zusammenfassung In diesem Verbundvorhaben soll ein eukaryontisches Testkonzept entwickelt und bewertet werden, welches ökotoxikologisch messbare Effekte schadstoffbelasteter Sedimente in verschiedenen spezifischen biologischen Endpunkten (Teratogenität, Gentoxizität, Mutagenität, Ah-Rezeptor-vermittelte Toxizität, Neurotoxizität und Histopathologie) und auf dem Level der Genexpression (DNA-Arrays und RT-PCR) untersucht, um molekulares und phy-

siologisches Grundlagenwissen über die Mechanismen der Schädigung in Embryonen des Zebrafisches zu erlangen. Über eine umfangreiche Metaanalyse (Vergleich der Befunde dieses Projektes mit DNA-Array-Daten zu zahlreichen Monosubstanzen und eine Identifizierung der wirksamen Schadstoffgruppen mittels effektdirigierter Fraktionierung) soll die Kausalität der Effekte geklärt werden. Bisherige Biotestverfahren haben die Bioverfügbarkeit toxischer Schadstoffe nur unzureichend berücksichtigt. Dagegen besitzen Sedimentkontakttests höchste Relevanz für das Ökosystem, da sie realistische Expositionsszenarien simulieren. Insbesondere vor dem Hintergrund der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie besteht daher ein großer Forschungsbedarf hinsichtlich der Entwicklung von Sedimentkontakttests und Genexpressionsanalysen zum Nachweis mechanismusspezifischer Toxizität. Durch die Einbindung von zwei Praxispartnern aus der Industrie und der Wasser- und Schifffahrtsverwaltung wird ein direkter Praxis- und Anwendungsbezug der stark grundlagenorientierten Forschungsarbeiten zur Entwicklung neuer Methoden gewährleistet.

Verantwortlicher Herausgeber: Henner Hollert

S. Keiter (✉) · S. Peddinghaus · H. Hollert (✉)
Institut für Umweltforschung (Biologie V), Lehr- und
Forschungsgebiet Ökosystemanalyse, RWTH Aachen Universität,
Worringerweg 1, 52074 Aachen, Deutschland
E-Mail: steffen.keiter@bio5.rwth-aachen.de

H. Hollert
E-Mail: henner.hollert@bio5.rwth-aachen.de

U. Feiler · G. Reifferscheid
Bundesanstalt für Gewässerkunde,
Am Mainzer Tor 1, 56068 Koblenz, Deutschland

B. v. d. Goltz · T. Braunbeck
Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie,
Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 230, 69120 Heidelberg, Deutschland

C. Hafner
Hydrotox GmbH,
Bölzinger Str. 29, 79111 Freiburg, Deutschland

R. Ottermanns · M. Hammers-Wirtz
GAIAC – Forschungsinstitut für Ökosystemanalyse
und -bewertung e. V., RWTH Aachen Universität,
Worringerweg 1, 52074 Aachen, Deutschland

J. C. Otte · N. Y. Ho · S. Rastegar · U. Strähle
Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Toxicology
and Genetics (ITG),
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1,
76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

Schlüsselwörter Sedimente · *Danio rerio* · Toxizität · Genomics

1 Einleitung und Hintergründe

Die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) schreibt als zu erreichendes Qualitätsziel den guten ökologischen Zustand von Gewässern bis 2015 vor. Die Sedimenttoxikologie spielt bei diesen Bestrebungen eine entscheidende Rolle, da gerade Schwebstoffe und Sedimente als sekundäre Quellen für partikulär gebundene Schadstoffe eine große Bedeutung haben (Hollert et al. 2007). Durch die von der Europäischen Kommission veröffentlichte Tochterdirektive

der WRRL wird nun das Monitoring der Sedimentqualität reguliert und deren Bedeutung für die Erreichung des „guten ökologischen Zustandes“ hervorgehoben. Der neue Artikel 2 fordert, dass die Mitgliedstaaten dafür Sorge tragen, dass die Konzentrationen von 33 prioritären Schadstoffen in Sedimenten und Biota nicht ansteigen (EC 2006).

Vergangene Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Liste der prioritären Schadstoffe insbesondere aufgrund des Klimawandels und der geänderten Schadstoffspektren ständig fortgeschrieben werden muss und biologische Wirktests sowie wirkungsorientierte Analytik in der Wasserforschung unbedingt weiterentwickelt werden müssen (Hollert et al. 2009b). Daher sind ökotoxikologische Tests notwendig, die eine Abschätzung der von diesen Chemikalien ausgehenden Umweltgefährdung ermöglichen und deren potenzielle Mobilisierung aus Sedimenten und Schwebstoffen eingehend untersuchen.

Bei Untersuchungen mit umfassenden In-vitro-Biotestbatterien konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl der organischen Sedimentextrakte aus dem Einzugsgebiet des Neckars, des Rheins und der Donau ein zum Teil deutliches mutagenes, gentoxisches, endokrines und dioxinähnliches Schädigungspotenzial besitzen (Braunbeck et al. 2009; Hollert et al. 2009a; Keiter et al. 2009). Vergleichbare Befunde zur Wirkung kontaminierter Sedimente in anderen aquatischen Ökosystemen wurden auch von weiteren Arbeitsgruppen ermittelt (z. B. Blaise et al. 2004; Chen und White 2004; Hallare et al. 2005; Kammann et al. 2004; Kilemade et al. 2004; Urban et al. 2010; Verweij et al. 2004), was die Unterschätzung der Problematik der Sedimentbelastungen als globales Phänomen deutlich macht.

In der Sedimenttoxikologie wird, wie allgemein in der Ökotoxikologie, ein Übergang von Problemen, die aus akut toxischen Konzentrationen von Schadstoffen erwachsen, hin zu Problemen in Folge einer chronischen Belastung mit niedrigen Konzentrationen einer meist komplexen Mischung aus zahlreichen Schadstoffen beobachtet. Eine Folgerung aus dieser Erkenntnis besteht darin, spezifische Schädwirkungen in der Wasserforschung, aber auch in nationalen Regelwerken und in der WRRL, zu berücksichtigen (Ahlf et al. 2002; Hollert et al. 2007).

Zukunftsweisende Konzepte im Umweltschutz sehen spezifische toxische Wirkungen als zunehmend wichtig an (Chen und White 2004). Zu spezifischen Wirkmechanismen werden beispielsweise Teratogenität, Neurotoxizität, Ah-Rezeptor-vermittelte bzw. -assoziierte Toxizität, Gentoxizität, Mutagenität und Karzinogenität gezählt. Bisher ist, von wenigen Ausnahmen abgesehen, die Messung spezifischer, in diesem Falle möglicherweise irreversibler Schädigungsqualitäten in konventionellen Richtlinien bzw. gesetzlichen Verordnungen jedoch nicht implementiert. Detaillierte Charakterisierungen des Schadstoffpotenzials von Sedimenten lassen sich über die Verwendung verschiedener Expositi-

onsphasen in mehreren Biotests erhalten (Ahlf et al. 2002). Während Assays mit Extrakten unbestritten eine gute Eignung als Indikatortests besitzen und zweifelsohne eine hohe Bedeutung bei der Simulation einer langfristigen Expositionssituation besitzen (Ahlf et al. 2002; Cote et al. 1998; Hollert et al. 1999), kann der eindeutige Nachweis über die tatsächlich bioverfügbare toxische Wirkung im Sinne eines „Weight of Evidence“ nur mit Biotests an nativen Proben ermittelt werden (Burton 1991, 1995; Chapman und Hollert 2006; Chapman et al. 2002).

Da Fachverbände und internationale Netzwerke (etwa die Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), das europäische Netzwerk SedNet und die European SETAC/SedNet-Sediment Advisory-Group) einen großen Handlungsbedarf hinsichtlich der Implementierung von Ökotoxizitätstests für spezifische Effekte in Untersuchungsstrategien und Regelwerken sehen (Brils 2004; Heise und Ahlf 2002), besteht derzeit ein hoher Forschungsbedarf hinsichtlich der Entwicklung von Sedimentkontakttests für spezifische Wirkungen. In diesem Kontext konnte bereits der Fischeitest mit *Danio rerio* an die Untersuchung von nativen Sedimenten angepasst werden, um deren embryotoxische und teratogene Wirkung zu prüfen (Hollert et al. 2003). So wird seit einiger Zeit die Strategie verfolgt, nach Exposition von *Danio-rerio*-Embryonen mit nativen Sedimenten nicht nur die akute Toxizität zu ermitteln, sondern auch die spezifischen toxischen Wirkungen zu bestimmen (Hollert et al. 2003; Kosmehl et al. 2006). Neue Studien konnten zeigen, dass native Sedimente auch benutzt werden können, um Zebrafischembryonen zu exponieren und z. B. deren Einzelzellen auf den Grad ihrer DNA-Fragmentierung hin zu untersuchen (Kosmehl et al. 2008; Kosmehl et al. 2006; Seitz et al. 2008). Dadurch kann spezifisch der bioverfügbare Anteil des gentoxischen Potenzials sedimentgebundener Schadstoffe bestimmt werden, indem der bereits etablierte Comet-Assay zur Untersuchung der Fischzellen eingesetzt wird (Kosmehl et al. 2007).

Große Lücken in der Forschung bestehen sowohl hinsichtlich des Verständnisses grundlegender molekularer Mechanismen, die zu toxischen Effekten führen, als auch hinsichtlich der Kenntnisse um Art und Ausmaß physiologischer Anpassung, die in den Embryonen zur Adaption an veränderte Umweltbedingungen oder Kompensation einer Belastung während der Exposition führen. Dieses Wissen ist aber dringend nötig, da nach der WRRL letztendlich die Artenzusammensetzungen und die Abundanz von Fischen (letztlich die Folge von Anpassung und Kompensation) als wichtigstes Kriterium zum Erreichen des guten ökologischen Zustandes herangezogen werden. Da inzwischen akute Toxizität in den meisten deutschen Gewässern nicht mehr von großer Bedeutung ist, ist es für die Umsetzung der WRRL zielführend, eine Methodik zu entwickeln, die es mit empfindlichen spezifischen und molekularen Tests erlaubt, prospektiv eine Aus-

sage über mögliche Umweltfolgen der Schadstoffquellen zu treffen. Gerade über die Kombination von wirkungsorientierter Analytik und entsprechenden mechanismusspezifischen und molekularen Tests kann nicht nur eine „Toxicity Identification Evaluation“, sondern auch eine „Toxicity Reduction Evaluation“ erreicht werden. In angelsächsischen und skandinavischen Ländern wurden mit dieser Strategie sehr große Erfolge hinsichtlich einer Verbesserung der Gewässerqualität erreicht (z. B. Engwall et al. 1998; USEPA 2007).

2 Ziele

Da einerseits nur unzureichendes molekulares und physiologisches Wissen über Mechanismen spezifischer Schädwirkungen vorhanden ist und andererseits Behörden einen großen Handlungsbedarf hinsichtlich der Implementierung von spezifischen Schädwirkungen in Regelwerken sehen, besteht ein hoher Forschungsbedarf bezüglich der Entwicklung von Sedimentkontakttests für spezifische Wirkungen. Übergeordnetes Ziel dieses BMBF-Forschungsprojektes ist es daher, über die Entwicklung eines kombinierten Sedimentkontakttests für die Untersuchung von Teratogenität, Neurotoxizität, Gentoxizität, Mutagenität und Ah-Rezeptor-Agonisten sowie eines Sedimentkontakttests für Genexpressionsanalysen mit *Danio-erio*-Embryonen einen Beitrag für (i) die Entwicklung geeigneter Testsysteme zur Bewertung der bioverfügbaren, spezifischen Toxizität von Sedimenten, (ii) für das Verständnis der beteiligten zellulären Mechanismen und (iii) für die Klärung der Kausalität der biologischen Effekte zu leisten.

Langfristiges Ziel soll die Entwicklung eines DNA-Chips sein, der eine Auswahl hochspezifischer Gene enthält und sich zum Einsatz für Umweltscreenings eignet. Im Einzelnen sollen folgende Ziele erreicht werden:

- Die molekularen und physiologischen Grundlagen verschiedener ökotoxikologischer Endpunkte (Embryotoxizität, Neurotoxizität, Gentoxizität, dioxinähnliche Wirkung) von nativen Sediment- und Schwebstoffproben in einem wirbeltierbasierten Testsystem sollen besser verstanden werden. Das Projekt wird in diesem Kontext klären, ob und wann toxische Einflüsse partikelassoziierter Schadstoffe in Embryonen nachzuweisen sind und wie sie die molekularen Mechanismen und die zeitliche Entwicklung des Biotransformationssystems in *Danio rerio* beeinflussen. Durch Expressionsanalysen können zeitabhängig die Anpassungs- und Entgiftungsmechanismen der Embryonen untersucht und die Schädwirkungen auf molekularer Ebene erklärt werden.
- Die wissenschaftliche Klärung dieser Fragestellungen ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis und die Entwicklung entsprechender Sedimentkontakttests. Am Ende des Projektes soll ein routinetaugliches Testkonzept

zur Verfügung stehen, mit dem übertragbare Aussagen über das bioverfügbare, ökotoxikologische Potenzial von Feststoffpartikeln auf eukaryontische Systeme getroffen werden können.

- Des Weiteren soll untersucht werden, ob über den Vergleich der Genexpressionsmuster von umweltrelevanten Chemikalien und von komplexen Sedimentproben eine Art „Sediment-Profilings“ erreicht wird, das Rückschlüsse auf Substanzklassen mit hoher Wirkung hinsichtlich der Genexpressionsänderungen erlaubt.
- Kann über den Vergleich der biologischen Wirkdaten aus diesem Projekt mit Daten aus effektdirigierten Fraktionierungen ein Beitrag hinsichtlich der Klärung der Kausalität der biologischen Effekte für ein identisches Sediment geleistet werden?
- Durch die Verwendung von nativen Sedimenten und organischen Extrakten in den Biomarkeruntersuchungen und den DNA-Microarray- bzw. RT-PCR-Analysen wird geklärt, wie hoch der Anteil der bioverfügbaren Wirkung am gesamten ökotoxikologischen Schädigungspotenzial ist. Diese Information ist grundlegend für die wissenschaftliche Bewertung der Aussagekraft von gewöhnlichen Gentoxizitätstests mit organischen Extrakten.
- Durch eine Belastung in den Kontakttests zur spezifischen Wirkung und in den Genexpressionsanalysen mit nativen Proben kann das tatsächlich bioverfügbare Schädigungspotenzial erfasst werden, sodass eine hohe Übertragbarkeit der Laborbefunde auf die Situation im Freiland angenommen werden kann. Durch die Nutzung von Sedimentprobenmaterial aus anderen Studien (mit umfassenden Biotestbatterien, chemischen Analysen und In-situ-Untersuchungen) soll die Frage geklärt werden, (i) ob die Sedimentkontakttests und Genexpressionsanalysen mit anderen Parametern korrelieren und (ii) ob diese Untersuchungen für ein holistisches Verständnis der Belastungssituation von aquatischen Systemen – wie es die Europäische Wasserrahmenrichtlinie fordert – einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn bedeuten.
- Ein Vorteil des hier vorgestellten Testverfahrens gegenüber bisherigen In-vitro-Biotests zur gentoxischen und dioxinähnlichen Wirksamkeit mit wässrigen Expositionspfaden ist zweifelsohne, dass Interpretationsschwierigkeiten hinsichtlich der Bioverfügbarkeit und damit der ökologischen Relevanz der partikelgebundenen Toxizität minimiert werden können. Daher soll hinterfragt werden, ob die Kontakttests und die Genexpressionsanalysen einen Beitrag hinsichtlich einer höheren Justiziabilität in Regelwerken des Wasservollzugs leisten können.

Langfristig sollen durch die Umwelt-Genomik weitreichende Fragen im Sinne einer Stressökologie bearbeitet werden, wie beispielsweise: Welche Gene werden durch anthropogene Stressoren exprimiert und wofür sind sie gut? Sind diese Änderungen adaptive Prozesse der Organismen? Was

sind die Konsequenzen dieser Genänderungen auf dem Level des Ökosystems, der Biozönose und der Fischpopulation?

3 Arbeitspakete

Die Ziele dieses Verbundprojektes sind in vier Modulen mit verschiedenen Arbeitspaketen integriert:

- **Modul Bioassay – spezifische Toxizität in Embryonen von *Danio rerio*:** In diesem Modul werden die spezifischen Effekte (Embryotoxizität, Teratogenität, Genotoxizität, Mutagenität, AhR-vermittelte Toxizität, Neurotoxizität, Calciomoszillation und Histopathologie) der Sedimentextrakte, der nativen Sedimentproben aber auch der Monosubstanzen in unterschiedlichen Biotests mit *Danio rerio* geprüft.
- **Modul Genexpression – molekulare und physiologische Wirkmechanismen von Sedimentschadstoffen:** Mittels DNA-Microarrays werden nach Exposition mit Sedimenten, Sedimentextrakten und Fraktionen einer effektdirigierten Analyse relevante Gene identifiziert. Durch den Einsatz einer RT-PCR sollen diese Kandidatengene verifiziert werden, um letztlich einen speziellen Array zu entwickeln, der es ermöglichen soll, ein Profiling kontaminierter Sedimente zu erstellen. In einem weiteren Validierungsschritt werden, nach Exposition mit künstlichem Sediment, dotiert mit Monosubstanzen, Veränderungen im Genexpressionsmuster detektiert.
- **Modul Auswertung:** Ziel dieses Moduls ist es, die Daten statistisch zu vergleichen und zu bewerten sowie umfangreiche Metaanalyse durchzuführen. Weiterhin sollen anhand des Genexpressionsprofils und der Biomarkerantworten bestimmte Schadstoffklassen in komplexen Sedimentproben verifiziert werden. Hierfür werden die Ergebnisse aus den Biotestverfahren und den Genexpressionsstudien mittels Principle-Component- und Cluster-Analysen analysiert.
- **Modul Praxistransfer und Markteinführung:** Durch die Einbindung des KMU „Hydrotox – Labor für Ökotoxikologie und Gewässerschutz GmbH“ (HYDRO) und die assoziierte Mitarbeit der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) wird ein direkter Praxis- und Anwendungsbezug der stark grundlagenorientierten Forschungsarbeiten zur Entwicklung neuer Methoden gewährleistet. HYDRO wird Teile der entwickelten Methodik im eigenen Methodenrepertoire integrieren, im Kontext anderer Projekte auf seine Praxistauglichkeit und letztendlich auf seine Marktfähigkeit im Sinne von German Waters überprüfen. Die Bundesanstalt für Gewässerkunde überprüft die Methodik auf die Anwendbarkeit und Implementierung innerhalb der Regelwerke und Monitoringstrategien der Bundesschiffahrtsverwaltung sowie der Maßnahmenpläne der WRRL.

4 Das DanTox-Konsortium

Das DanTox-Konsortium besteht aus sechs Partnern, repräsentiert durch zwei Universitäten, ein Helmholtz-Forschungszentrum, zwei KMUs und einer Bundesoberbehörde (asoziiierter Partner).

- **Institut für Umweltforschung, Lehr- und Forschungsgebiet Ökosystemanalyse, RWTH Aachen University** (Dr. Steffen Keiter, Sabrina Peddinghaus und Prof. Dr. Henner Hollert): Koordination, Embryotoxizität, Teratogenität, Genotoxizität, Mutagenität, AhR-vermittelte Toxizität, RT-PCR und „Sediment-Profilings“,
- **Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität Heidelberg** (Britta von der Goltz und Prof. Dr. Thomas Braunbeck): Live Imaging der EROD-Induktion, Neurotoxizität, Genotoxizität und Histopathologie,
- **Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Toxicology and Genetics (ITG)** (Jens Otte, Nga Yu Ho, Dr. Sepand Rastegar und Prof. Dr. Uwe Strähle): DNA-Microarrays und RT-PCR, Datenauswertung und „Sediment-Profilings“,
- **Forschungsinstitut für Ökosystemanalyse und -bewertung e.V., GAIAC** (Dr. Richard Ottermanns und Dr. Monika Hammers-Wirtz): statistische Bewertung der Daten und Begleitung des Projektes, Metaanalyse,
- **Hydrotox GmbH** (Dr. Christoph Hafner): Standardisierte aquatische Testbatterie, Fischeitests und Praxistransfer und
- **Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG)** als assoziierter Partner (Dr. Ute Feiler und Dr. Georg Reifferscheid): Überprüfung der im Projekt erarbeiteten Produkte auf deren Tauglichkeit für eine Implementierung in Regelwerke der Wasser- und Schifffahrtsverwaltung und Maßnahmenpläne der WRRL. Die BfG unterstützt das Projekt als beratender Partner und bei der Sediment-Probennahme.

Literatur

- Ahlf W, Hollert H, Neumann-Hensel H, Ricking M (2002) A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: A german approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J Soils Sediments* 2:37–42
- Blaise C, Gagné F, Chevre N, Harwood M, Lee K, Lappalainen J, Chial B, Persoone G, Doe K (2004) Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. *Environ Toxicol* 19:267–273
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P (2009) Fish populations under stress – the example of the Lower Neckar River. *Umweltwiss Schadst Forsch* 21:197–211
- Brils J (2004) Sediment Monitoring under the EU Water Framework Directive. *J Soils Sediments* 4:72–73
- Burton GA (1991) Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 10:1587–1627
- Burton GA (1995) Sediment toxicity testing issues and methods. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J (Hrsg) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis-Publishers, Boca Raton, S 70–103

- 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
- Chapman PM, Wang F, Germano JD, Batley G (2002) Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Mar Pollut Bull* 44:359–366
- Chen G, White PA (2004) The mutagenic hazards of aquatic sediments: A review. *Mutat Res* 567:151–225
- Cote C, Blaise C, Michaud JR, Ménard L, Trottier S, Gagne F, Lifshitz R (1998) Comparisons between microscale and whole-sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment. *Environ Toxicol Water Qual* 13:93–110
- EC (2006) Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. European Commission, Brussels
- Engwall M, Naf C, Broman D, Brunström B (1998) Biological and chemical determination of contaminant levels in settling particulate matter and sediments. A Swedish river system before, during and after dredging of PCB-contaminated lake sediments. *Ambio* 27:403–410
- Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Kohler HR, Triebkorn R (2005) Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science Total Environ* 347:254–271
- Heise S, Ahlf W (2002) The need for new concepts in risk management of sediments: Historical developments, future perspectives and new approaches. *J Soils Sediments* 2:4–8
- Hollert H, Dürr M, Geier V, Erdinger L, Braunbeck T (1999) Ökotoxikologie *in vitro*: Gefährdungspotential von Neckarsedimenten. In: Oehlmann J, Markert B (Hrsg) Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Ecomed-Verlag, Landsberg/Lech, S 444–462
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*). *J Soils Sediments* 3:197–207
- Hollert H, Heise S, Keiter S, Heinrich H, Förstner U (2007) Wasser-rahmenrichtlinie – Fortschritte und Defizite. *Umweltwiss Schadst Forsch* 19:58–70
- Hollert H, Bluhm K, Keiter S, Böttcher M, Grund S, Seitz N, Otte J, Braunbeck T, Hecker M, Higley E, Giesy J, Takner H, van Bavel B, Engwall M, Reifferscheid G, Manz W, Erdinger L, Schulze T, Luebcke-van Varel U, Brack W, Kammann U, Schöneberger R, Suter M, Strähle U (2009a) Eine Weight-of-Evidence-Studie zur Bewertung der Sedimentbelastung und des Fischrückgangs in der Oberen Donau. *Umweltwiss Schadst Forsch* 21:260–263
- Hollert H, Hudjetz S, Claus E, Manz W, Reifferscheid G, Heininger P, Schwarzbauer J, Ahlf W, Braunbeck T, Brack W, Schulze T, Schäffer A, Ratte T (2009b) Über die Notwendigkeit der wirkungsorientierten Analytik in einer umfassenden Wasserforschung. *Umweltwiss Schadst Forsch* 21:235–237
- Kammann U, Biselli S, Huhnerfuss H, Reineke N, Theobald N, Vobach M, Wosniok W (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ Pollution* 132:279–287
- Keiter S, Böttcher M, Grund S, Seitz N, Braunbeck T, Hollert H (2009) Der Fischrückgang in der oberen Donau. *Umweltwiss Schadst Forsch* 21:186–196
- Kilemade MF, Hartl MG, Sheehan D, Mothersill C, Van Pelt FN, O'Halloran J, O'Brien NM (2004) Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environ Molec Mutag* 44:56–64
- Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2006) A novel contact assay for testing genotoxic of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem* 25:2097–2106
- Kosmehl T, Krebs F, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2007) Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with Zebrafish embryos. *J Soils Sediments* 7:377–387
- Kosmehl T, Hallare AV, Braunbeck T (2008) DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat Res* 650:1–15
- Seitz N, Böttcher M, Keiter S, Kosmehl T, Manz W, Hollert H, Braunbeck T (2008) A novel index to evaluate genotoxicity data from dose-response curves in the comet assay. *Mutat Res* 652:38–45
- Urban SR, Corréa AXR, Schettini CAF, Schwingel PR, Sperb RM, Radetski CM (2010) Physicochemical and ecotoxicological evaluation of estuarine water quality during a dredging operation. *J Soils Sediments* 10:65–76
- USEPA (2007) Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) – Phases I, II, and III Guidance Document. US EPA – Office of Research and Development, Washington
- Verweij F, Booij K, Satumalay K, van der Molen N, van der Oost R (2004) Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. *Chemosphere* 54:1675–1689