

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

# **Genetische Verarmung als Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen - ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung**

von

Matthias Oetken, Christian Vogt, Carsten Novak, Markus Pfenninger, Klaus Schwenk und  
Jörg Oehlmann

Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität

Förderkennzeichen: BWR 22018

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2006

**Inhalt**

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
3.1 Testsubstanzen und Testorganismus .....	12
3.1.1 Tributylzinn (TBT).....	12
3.1.2 Cadmium .....	14
3.1.3 <i>Chironomus riparius</i> als Testorganismus.....	15
3.2 Datenauswertung.....	24
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>28</b>
4.1 Vorexperimente.....	28
4.1.1 Ermittlung geeigneter TBT- und Cd-Konzentrationen.....	28
4.1.2 Entwicklung der Mikrosatelliten .....	41
4.1.3 Rückstandsanalytik.....	44
4.2 Laborexperimente.....	45
4.2.1 Multigenerationsstudien (MGS).....	45
4.2.2 Cadmium als Zweit-Stressor .....	78
4.3 Freilandstudien .....	90
4.3.1 Artzusammensetzung und genetische Diversität bei <i>Chironomus</i> im Freiland .....	90
4.3.2 Biotests mit Freilandsedimenten .....	107
4.3.3 Monitoring von Organozinnverbindungen .....	115
4.4 Weitere Arbeiten .....	117
4.4.1 Einfluss verschiedener genetischer Diversität von <i>C. riparius</i> unter Cd-Exposition ....	117
4.4.2 Reaktion genetisch charakterisierter <i>C. riparius</i> -Populationen auf Cd-Streß .....	121
4.4.3 Temperaturexperimente mit verschiedenen Populationen.....	126
4.4.4 RNA/DNA Verhältnis bei Cadmium-exponierten <i>C. riparius</i> -Larven.....	134
<b>5 Praktische Verwertbarkeit der Ergebnisse.....</b>	<b>135</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>137</b>

## Abstract

While toxicological data are available for numerous chemicals from standard tests, little is known on 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 of 4.46, 6.69 and 8.93  $\mu\text{g as Sn kg}^{-1}$  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 structure can be determined, which are not predictable based solely on knowledge of the toxic mode of action of the chemical. Genetic variability was determined via microsatellite analysis, measuring individual length differences of highly variable satellite DNA fragments. 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 challenging the question if there is a different response of different preexposed populations to a shifted chemical stress. Therefore, preexposed animals of the multi-generation studies with TBT were exposed to an environmental relevant cadmium concentration of 1.2 mg/kg dw after different generations of preexposure and concentration.

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 ( $p < 0.05$ ) delayed under TBT exposure. Reproduction seems to be a sensitive parameter as well, whereby females laid significantly larger egg masses ( $p < 0.05$ ) in the latter generations. TBT did not affect the population growth rate or the genetic variability, while clear deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium appeared. The study also provides strong evidence for the acquirement of a higher tolerance towards the stressor in the TBT-exposed group.

The highest TBT concentration leads to significant effects on the life-cycle parameters in the multi-generation study, whereby development and reproduction was significantly inhibited. Furthermore significant effects on the genetic composition of the exposed population were observed. The heterozygosity significantly decreased during the study at TBT exposure and a lower level was observed than in the control group. In this study also evidences for an adaptation potential of *C. riparius* were determined after four generations.

In the second stressor experiments the effect of different preexposure scenarios was obviously, whereby the TBT preexposed population of the multi-generation with 8.93  $\mu\text{g Sn/kg dw}$  (longer and higher TBT exposure has a significantly increased sensitivity to cadmium stress).

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das BW-PLUS Projekt „Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen – Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung“ (BWR 22018) wurde von September 2003 bis August 2006 an der Universität Frankfurt/Main durchgeführt. Die wesentlichen Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens lassen sich wie folgt darstellen:

### *Methodenetablierung*

- Erfolgreiche Entwicklung von geeigneten Mikrosatellitenmarkern zur Erfassung genetischer Variabilität in belasteten und unbelasteten *Chironomus riparius* Populationen.
- Durchführung mehrerer Multigenerationsstudien (MGS) über bis zu 12 Generationen (MGS II und III mit mehreren Replikaten), Programmierung geeigneter Software zur Bestimmung von Populationswachstumsraten (PWR).
- Sichere Determinierung der Art *C. riparius* im Freiland mit Hilfe genetischer Analysen.

### *Multigenerationsstudien*

- Eine TBT-Exposition der Testorganismen über das Sediment von nominal 80 µg Sn/kg TG (gemessen 4,46 µg Sn/kg TG) über insgesamt 11 Generationen beeinflusste weder deren Populationswachstumsrate noch deren genetische Variabilität mit der Einschränkung, dass in der TBT-belasteten Population häufiger Abweichungen von der Hardy-Weinberg-Verteilung festzustellen waren im Vergleich zur unbelasteten Kontrollpopulation.
- Im Gegensatz dazu konnten *C. riparius* über 12 Generationen einer höheren TBT-Konzentration (nominal 160 µg Sn/kg TG, gemessen 8,93 µg Sn/kg TG) exponiert, signifikante Effekte auf einzelne Life-Cycle Parameter (und *in summa* auf die Populationswachstumsrate) festgestellt werden. Der Grad an Heterozygotie nahm in der TBT-belasteten Population stärker ab im Vergleich zur Kontrolle.

### *Effekte zusätzlicher Stressoren*

- Die Exposition gegenüber dem zweiten Stressor Cadmium führte dazu, die TBT-vorbelastete *C. riparius* Population eine signifikant niedrigere Populationswachstumsrate aufwies, als die nicht vorbelastete Population.

*Feldstudien*

- Die Artverteilung der Gattung *Chironomus* im Untersuchungsgebiet (Nordwesten Baden-Württemberg) hängt nicht von der Schadstoffbelastung im Sediment ab, sondern das lokale Klima hat vielmehr eine signifikante Bedeutung für die Artverteilung der Chironomiden.
- Die Sedimente kleinerer Fließgewässer im Nordwesten Baden-Württembergs sind lediglich gering mit TBT belastet. Die ermittelten Konzentrationen befinden sich im Bereich derjenigen TBT-Konzentrationen, die im Sediment der MGS im Labor gemessen worden sind. Allerdings sind diese Konzentrationen nicht direkt miteinander vergleichbar, da in den Laborversuchen nur Quarzsand verwendet wurde und sich somit die Bioverfügbarkeit des TBT unterscheiden kann.

Insgesamt liefern die Experimente deutliche Hinweise, dass chemischer Stress zu einer Abnahme genetischer Variabilität führen kann und dass vorbelastete, genetisch bereits verarmte Populationen möglicherweise weniger in der Lage sind, in Gegenwart eines weiteren Stressors stabile Populationen aufrecht zu erhalten. Vermutlich gelten diese Evidenzen jedoch nur bei Populationen, die in großflächig belasteten Arealen vorkommen und bei denen Genfluss durch zu und abwandernde Individuen nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Für derartige Populationen wäre es möglicherweise schwer, konstante Populationsgrößen aufzubauen, insbesondere dann, wenn weitere Stressoren diese Populationen belasten.

## 2 EINLEITUNG

Dass Umweltschadstoffe die Struktur von Lebensgemeinschaften und das Verbreitungsgebiet von Arten beeinflussen, ist in unzähligen Studien beschrieben worden (BELFIORE, 2001). Dagegen sind die Auswirkungen auf die genetische Struktur und Variabilität in Populationen bislang kaum erforscht (ROARK ET AL., 2001). Bisherige Untersuchungen zur „genetischen“ oder „evolutionären Ökotoxikologie“ beschäftigen sich im Allgemeinen mit der Reaktion genetisch voneinander differenzierter Individuen auf Schadstoffexposition, während ein weiterer verbreiteter Ansatz die genetische Diversität von Populationen im Freiland mit dem vorliegenden Schadstoffgehalt im Habitat zu korrelieren sucht. Beide Ansätze konnten bisher kaum zur Klärung bedeutender Fragen für den Erhalt von lokaler Biodiversität beitragen:

- Inwieweit beeinflussen Schadstoffe in umweltrelevanten Konzentrationen die genetische Struktur, insbesondere die genetische Diversität von Populationen? Können Umweltschadstoffe damit zu einer Abnahme der Biodiversität unterhalb unserer bisherigen Wahrnehmungsebene führen?
- Hat die genetische Struktur von Populationen Auswirkungen auf die Langzeitreaktion auf anthropogen verursachtem Schadstoffstress? Falls ja: Unterliegen genetisch verarmte Populationen unter Schadstoffstress einer erhöhten Aussterbenswahrscheinlichkeit als genetisch diverse Populationen?

Der Erhalt der genetischen Diversität innerhalb von Arten wird von Wissenschaft und Politik in immer stärkeren Maße als schützenswertes Gut erkannt (SRU, 2004). Der hauptsächliche Grund für die vielfachen Bemühungen um den Schutz der innerartlichen Variabilität („genetic conservation biology“) liegt im Zukunftspotenzial für das Überleben der betreffenden Populationen und Arten: Die Variabilität zwischen Individuen einer Art bildet deren Substrat für die Anpassung an sich ständig wechselnde Umweltbedingungen. Ein nachhaltiger Schutz der belebten Umwelt muss daher immer auch den Erhalt der genetischen Vielfalt innerhalb von Populationen und Arten berücksichtigen.

Um die oben genannten Fragen zu beantworten, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem sowohl die phänotypische Reaktion als auch die genetische Struktur von aquatischen Invertebraten im Rahmen mehrerer Multigenerationsstudien über bis zu 12 Generationen untersucht werden kann. Die interdisziplinären Experimente werden am Beispiel der bereits ökotoxikologisch und genetisch gut charakterisierten Zuckmücke *Chironomus riparius* durchgeführt. *C. riparius* wird als Stellvertreterorganismus eingesetzt, wobei die ermittelten Effekte auch für andere Invertebraten und nicht zuletzt für die gesamte aquatische Biozönose relevant sein

dürften. Stellvertretend für die Vielzahl von Umweltschadstoffen wird die Organozinnverbindung Tributylzinn (TBT) in umweltrelevanten Konzentrationen eingesetzt. Um einen direkten Bezug zum Freiland zu schaffen, werden weiterhin Biodiversitätsstudien innerhalb der Gattung *Chironomus* unter Berücksichtigung der Sedimenttoxizität durchgeführt. Ein chemisches Monitoring von Organozinnverbindungen in Sedimenten von Bächen und Flüssen Baden-Württembergs zeigt schließlich, dass die in den Multigenerationsstudien eingesetzten TBT-Konzentrationen umweltrelevant sind.

#### *Liste durchgeführter Promotions- und Diplomarbeiten*

Diese Studie wurde vom Land Baden-Württemberg gefördert (Projektnummer: BWR 22018) und an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Der Bearbeitungszeitraum des F+E-Projektes mit dem Arbeitstitel „Genetische Verarmung in Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen – Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung“ war vom 01.09.2003 bis zum 31.08.2006. Im Rahmen des Projektes werden zwei Promotionsvorhaben im Jahr 2007 abgeschlossen (Christian Vogt und Carsten Nowak). Außerdem wurden bereits folgende Diplomarbeiten erfolgreich durchgeführt:

- 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.*
- 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.*

#### *Liste publizierter Beiträge*

Die Ergebnisse des Projektes wurden in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht, sowie auf (inter-)nationalen wissenschaftlichen Tagungen und Workshops vorgestellt. Einzelne Kapitel und Themenschwerpunkte dieser Arbeit können weiterführend in folgenden Publikationen nachgelesen werden.



*Zeitschriftenpublikationen*

- 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). *Molecular Ecology Notes*, 6, 915-917.
- Nowak, C.; Vogt, C.; Barateiro Diogo, J.; Schwenk, K. (2007): Genetic impoverishment in laboratory cultures of the test organism *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26, 1018–1022.
- 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-. *Journal of Environmental Science and Health – Part 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*, 67, 2192-2200.
- 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. *Molecular Ecology*, in press.
- Jost, D., Nowak, C., Oetken, M., Vogt, C., Schwenk, K., Oehlmann, J.: Effects of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*, submitted.
- Vogt, C.; Pupp, A.; Nowak, C.; Jagodzinski, L.; Baumann, J.; Jost, D., Oetken, M., Oehlmann, J. (2007): Interaction between genetic diversity and temperature stress on life-cycle parameters and genetic variability of *Chironomus riparius* populations, *Climate Res.* 33, 207-214.
- Vogt, C.; Nowak, C.; Oetken, M.; Oehlmann, J. (2006): Umweltschadstoffe und genetische Variabilität bei aquatischen Wirbellosen - Ergebnisse einer Multigenerationsstudie mit *C. riparius*. *Tagungsbericht 2005 der Deutschen Gesellschaft für Limnologie e.V. (DGL) und der deutschsprachigen Sektion der Societas Internationalis Limnologiae (SIL)*, 487-491.
- NOWAK, C.; PUPP, A., VOGT, C. (2006): Reaktion genetisch verarmter Populationen der Zuckmücke *Chironomus riparius* auf anthropogen verursachten Umweltstress - Konsequenzen für den Artenschutz. In Horst Korn, Ute Veit (Bearb.): Treffpunkt Biologische Vielfalt 6. *BFN-Skripten* **164**: 199-204.

### Tagungsbeiträge

- Kley, C., Nowak, C., Oetken, M. & Pfenninger, M.: Beeinflußt der Faktor Sedimenttoxizität die Artzusammensetzung von *Chironomus*-Gemeinschaften? In: Abstracts of the 10<sup>th</sup> SETAC-GLB-Jahrestagung, Basel, Schweiz.
- Nowak, C., Barrateiro, J., Vogt, C., Oetken, M. & Schwenk, K.: Comparing Apples with Oranges. In: Abstracts of the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-Europe. Lille, France.
- Nowak, C., Vogt, C., Barateiro, J., Oetken, M. & Schwenk, K.: Tracing genetic variability under pollution stress over multiple generations. 4. International Symposium on "Ecological Genetics", Antwerpen, Belgium.
- Nowak, C., Heß, M., Vogt, C., Oetken, M., Schwenk, K. & Oehlmann, J.: Genetische Verarmung durch Cadmium-Stress bei *C. riparius*. In: Abstracts of the 10<sup>th</sup> SETAC-GLB-Jahrestagung, Basel, Schweiz.
- Pupp, A., Nowak, C., Vogt, C., Oetken, M. & Schwenk, K.: Interactions between Genetic Diversity and Temperature Stress in *Chironomus riparius* Populations. SETAC-Europe-Jahrestagung, Lille, France.
- Vogt, C., Nowak, C., Schwenk, K., Oetken, M. & Oehlmann, J.: Genetical diversity influences the effects of chronic TBT exposure on chironomid populations. In: Abstracts of the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-Europe. Lille, France.
- Vogt, C., Nowak, C., Schwenk, K., Oetken, M. & Oehlmann, J.: Genetische Verarmung bei Wirbellosen als Folge von Schadstoffstress? Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung. 2. Joint Annual Meeting (SETAC and GDCh), Aachen.

### Zusammenarbeit mit anderen Institutionen

- **Internationales Hochschulinstitut Zittau** (Dr. Gernot Kaiser, Gerlinde Liepelt): Schwermetallanalytik (Freilandsedimente)
- **GALAB Technologies GmbH**, Geesthacht: Analyse von Organozinnverbindungen (Freiland- und Laborsedimente)
- **IME Fraunhofer Institut**, Schmallenberg (Dr. Udo Hommen): Erstellen von Software zur Bestimmung von Populationswachstumsraten
- Landesanstalt für Umweltschutz (**LFU**) Baden-Württemberg (Jens Storck): Probenahme von Freilandsedimenten mit der „Max Honsell“
- **GENterprise GENOMICS** Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz (Prof. Erwin Schmidt, Prof. Thomas Hankeln): Mitarbeit bei der Mikrosatelliten-Analyse.

**Dank**

An dieser Stelle sei nicht nur dem Land Baden-Württemberg für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung des Forschungsvorhabens BWR 22018 innerhalb des Programms BWPLUS gedankt, sondern auch allen direkt und indirekt am Projekt beteiligten Personen und Institutionen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Testsubstanzen und Testorganismus

##### 3.1.1 Tributylzinn (TBT)

TBT gehört zu der Klasse der Organozinnverbindungen (OZV). Im Gegensatz zu anderen Elementen sind für Zinn zahlreiche organometallische Derivate bekannt. Bei TBT sind an das Zinn Zentralatom drei Butylgruppen gebunden, wodurch das Molekül insgesamt eine positive Ladung erhält.

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

molare Masse:	325,5 g/mol
chemische Formel:	$C_{12}H_{27}ClSn$
Sn-Gehalt/Cl-Gehalt (Gew.%):	36,47%/10,89%
Reinheit:	zur Synthese (> 97%)
Dichte bei (20 °C):	1,2 g/cm <sup>3</sup>
Löslichkeit in Wasser:	0,017 g/L
Log Pow:	4,76
Henry-Konstante (20 °C):	7719 Pa x m <sup>3</sup> /mol
Dampfdruck (20 °C):	< 0,01 hPa
Bezugsquelle:	Merck Schuchardt, Darmstadt, Deutschland

Aufgrund der freien Bindungsstelle kann sich ein weiteres anorganisches oder organisches Anion 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 Tributylzinnchlorid (TBT-Cl) 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 der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

TBT ist eine sehr toxische 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 t/a (UBA, 2001).

Auch nach 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 die Substanz aufgrund der hydrophoben Eigenschaften zum größten Teil an Schwebstoffe und ist nur 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 Muldezuflusses festgestellt. Besonders hohe Konzentrationen an TBT weisen Sedimente aus Hafenbecken auf (KALBFUS ET AL., 1991). 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) eine wichtige Rolle spielen. Zusätzlich ist ein geringer hydrolytischer Abbau unter Umweltbedingungen möglich (BUA, 2003). Die Halbwertszeit in marinem Wasser wird zwischen 2,25 bis 225 Tagen (STEWART & MORA, 1990) und im Sediment zwischen 162 und > 200 Tagen angegeben (BUA, 1988). Die Abbauraten im Sediment sind stark vom Sauerstoffmilieu, Temperaturregime und von der Sedimentzusammensetzung abhängig. Unter anaeroben Bedingungen wird nur noch ein geringer Anteil des TBTs abgebaut und solche Sedimente bleiben oft über mehrere Jahre hinweg belastet.

TBT ist hochtoxisch für aquatische Organismen. Es beeinflusst das Wachstum und kann Missbildungen hervorrufen, wobei insbesondere Juvenilstadien von Fischen und Muscheln, Krebstiere und deren Larven bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen gefährdet sind (SATTELBERGER, 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 80-er Jahren deutlich und während der letzten Jahre wurde die Anwendung in einigen Staaten eingeschränkt bzw. gänzlich verboten. In der Europäischen Union wurde bereits im Jahre 1989 der Einsatz von OZV in Antifoulinganstrichen für Schiffe unter 25 m Länge verboten. 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 Modellsubstanz ausgewählt. Weiterhin zeigten Studien mit *C. riparius* und TBT bereits im niedrigen Mikrogramm pro Liter Bereich deutliche akute Toxizitäten (FARGASOVA, 1998; HAHN & SCHULZ, 2002). Aufgrund dieser Studien können für TBT bereits bei den gemessenen Umweltkonzentrationen Effekte auf die Entwicklung und Reproduktion und dadurch auch auf die genetische Diversität vermutet werden.

### 3.1.2 Cadmium

Cadmium ist ein Schwermetall, welches zusammen mit den beiden anderen Übergangsmetallen Zink und Quecksilber die zweite Nebengruppe im Periodensystem bildet. 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, Stabilisator in Druckerfarben, 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 eingesetzt. 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 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 vorliegen kann. 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. 0,04-0,8 mg/kg. In belasteten Sedimenten wurden jedoch deutlich erhöhte Gehalte von bis zu 20 mg/kg TG (OETKEN, 1999) gemessen. Durch die Spezifizierung sowie Komplexierung wird auch die Bioverfügbarkeit entscheidend beeinflusst, wobei freie Cadmiumionen am leichtesten durch Organismen aufgenommen werden. Cadmium ist, neben vielen anderen Spurenelementen, essentiell für den Ablauf biochemischer Prozesse im Körper, wirkt allerdings in höheren Konzentrationen als Enzymgift, indem es funktionelle Gruppen der Enzyme, 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, 2000; PEDINA, 2001; MILANI ET AL., 2003; VOGT ET AL., 2007a). Außerdem wurde mit Cadmium bereits eine Multigenerationsstudie über zehn Generationen durchgeführt (POSTMA & DAVIDS, 1995; DE BISTHOVEN ET AL., 2001).

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

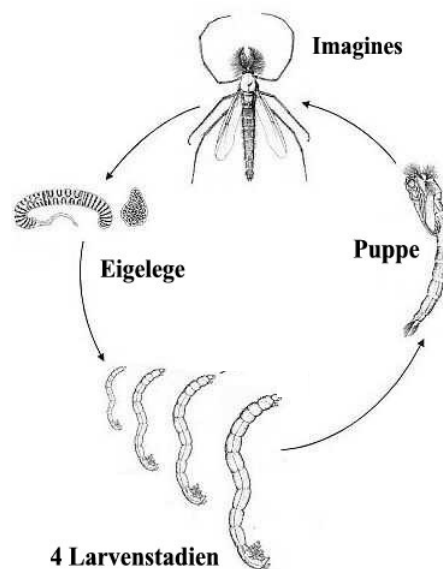
**Tabelle 2:** Physiko-chemische Eigenschaften von Cadmiumsulfat-Hydrat (MERCK SCHUCHARDT, 2006b)

molare Masse:	769,5 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 <sup>3</sup>
Löslichkeit in Wasser (20 °C):	1130 g/L
Bezugsquelle:	Merck Schuchardt, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.3 *Chironomus riparius* als Testorganismus

Chironomiden gehören zur Ordnung der Zweiflügler (Diptera) und bilden die Familie der Zuckmücken (Chironomidae), die eine der arten- und individuenreichsten Insektenfamilien

darstellt 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 verschiedenen Entwicklungsphasen. Beginnend mit dem Eistadium durchlaufen die Tiere vier Larvalstadien, welche eng an Häutungen gekoppelt sind. Nach dem L4-Stadium verpuppen sich die Larven (ARMITAGE ET AL., 1995). Aus den Puppen schlüpfen nach ca. einem Tag die Imagines. Sie leben im Gegensatz zu den ersten drei aquatischen Entwicklungsstadien rein terrestrisch (Abb. 1). Nach der Paarung, der das Schwärmen der Imagines 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.



**Abbildung 1:** Lebenszyklus der Zuckmücken.

Chironomiden sind an unterschiedlichste extreme 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* allerdings eher als eine 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 sowohl durch kurze Tageslängen als auch durch 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 die Larven unter Nahrungsmangel leiden, beschrieben. In den gemäßigten Zonen erreichen die Tiere allerdings bis zu fünf Lebenszyklen im Jahr (GOWER & BUCKLAND, 1978).

*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 kostengünstige und einfache 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. 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 (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).

#### *Eingesetzte Populationen*

Zu Beginn der Experimente wird eine möglichst genetisch diverse Population aus verschiedenen Laborstämmen erzeugt (NOWAK ET AL., 2007). Die Mischpopulation (GEN+) besteht aus elf verschiedenen Laborstämmen aus Europa und den U.S.A. (Tab. 3). Aus den einzelnen Populationen werden jeweils 13 Männchen und 13 Weibchen entnommen und gekreuzt. Um sicher zu gehen, dass die jeweiligen Einzelpopulationen gut durchmischt in der GEN+Population vorliegen, wird diese weiter bis zur F2-Generation unter Standardbedingungen gezüchtet. Insgesamt werden neun Laborpopulationen genetisch untersucht, zusätzlich wird das Diversitätsniveau von GEN+ (LKM, Generation 3 der MGS I) sowie zweier Freilandpopulationen ermittelt (die Mikrosatellitenanalysen werden in Kapitel 5.2 detailliert beschrieben). Im Vergleich zu der genetisch diverseren GEN+ Population wird auch die Laborzuchtpopulation (GEN-) der J.W. Goethe-Universität (Synonym *FFM* in Tabelle 3) in die Multigenerationsstudien eingebracht. Dadurch wird ein Vergleich zwischen zwei unterschiedlich genetisch diversen Populationen (GEN+ und GEN-) ermöglicht.

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

<b>Laborpopulationen</b>	Ursprung	Abkürzung
Universität Amsterdam, Niederlande	Freiland	AMS
AquaSense BV, Amsterdam, Niederlande	Freiland	AQS
AstraZeneca, Brixham Environm. Lab., Großbritannien	k. A.	AST
Universität Cardiff, Großbritannien	Freiland	CAR
J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland	Labor	FFM
Universität Joensuu, Finnland	Labor	JOU
Cemagref, Lyon, Frankreich	k. A.	LYO
Ohio State Universität, Columbus, USA	Freiland	OHO
Centre INRA de Rennes, Frankreich	Labor	RNS
RIZA, Lelystad, Niederlande	Freiland	RIZ
Akademie der Wissenschaften, Sofia, Bulgarien	Freiland	SOF
<b>Freilandpopulationen</b>		
Kläranlage bei Hanhofen (Woogbach), Deutschland	Freiland	KAH
Bach in der Nähe von Sulzbach (Sulzbächle), Deutschland	Freiland	SSB

Die Zuckmücken werden im Labor in Anlehnung an die OECD Richtlinie 218 (OECD, 2004a) gezüchtet. Die Tiere werden 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 gehältert. Die Luftfeuchtigkeit beträgt ca. 70%. Um eine vergleichbare stoffliche Zusammensetzung der aquatischen Umgebung zu gewährleisten, wird in der Zucht und in allen Experimenten rekonstituiertes Wasser verwendet. Dieses wird aus entionisiertem Wasser hergestellt, welches durch Zugabe von Tropic Marin Meersalz (Dr. Biener, Wartenberg, Deutschland) auf eine Leitfähigkeit von  $540 \mu\text{S}/\text{cm}$  eingestellt wurde. Der pH-Wert wird 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 erfolgt in vier Polypropylenschalen (28x22x5 cm), mit einer aus feinem Quarzsand bestehenden 1 cm hohen Sedimentschicht (Quick Mix Gruppe, Osnabrück, Deutschland, Korngröße 0,1-0,4 mm). Das Sediment wird vollständig, um ca. 3 cm, mit rekonstituiertem Wasser überschichtet. Um die Reproduktion der geschlüpften Tiere während des Versuchszeitraumes gewährleisten zu können, wird um jede Schale ein gazebespannter Zuchtkäfig (60x60x50 cm, Maschenweite 0,75 mm) mit einem Luftvolumen von  $0,18 \text{ m}^3$  angebracht. Die Weibchen legen meist an den Rändern der Schalen ihre Gelege ab, aus welchen sich innerhalb von ca. drei Tagen die nächste Generation entwickelt.

Im Intervall von zwei Tagen werden die Larven mit gemörsertem, in Aqua dest. suspendiertem Tetra-Min<sup>®</sup> (Tetra Fischwerke Berlin, Deutschland) *ad libitum* gefüttert. Zusätzlich ernähren sich die Larven von bakteriellem Aufwuchs und Algen. Die Zucht wird einmal wöchentlich gereinigt. Dabei werden die Larven mit Leitungswasser aus dem Sediment gespült und in einem Sieb aufgefangen (Maschenweite 0,5 mm). Anschließend wird das Sediment komplett erneuert. Die Zuchtbecken werden erneut mit Wasser, künstlichem Sediment sowie Futter befüllt und die Zuckmückenlarven eingebracht.

### *Kreuzungsexperimente*

Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, zeigen die Kreuzungsexperimente mit einzelnen *C. riparius* Stämmen aus den verschiedenen Laboren deutlich, dass eine erfolgreiche Vermischung einzelner Populationen möglich ist. Die meisten produzierten Gelege sind fertil, wobei nur zwei Ausnahmen bei der Kreuzung von Männchen der AST-Population mit Weibchen der AQS-Population und von Männchen der SOF-Population und Weibchen der AST-Population festzustellen sind. Hierbei sind 61% (AST ♂, AQS ♀) bzw. 36% (SOF ♂, AST ♀) aller produzierten Gelege fertil.

**Tabelle 4:** Kreuzungsschema und produzierte Gelege (gesamt/fertil) der Einzelpopulationen vor der Erstellung der Mischpopulation. Abkürzungen der Einzelpopulationen vgl. Kap. 3.3.1, ♀/♂ - einzeln aufgezogene Weibchen/Männchen.

Population/ Geschlecht	AMS ♀	AQS ♀	AST ♀	CAR ♀	FFM ♀	JOU ♀	LYO ♀	OHO ♀	RNS ♀	RIZ ♀	SOF ♀
AMS ♂			8/8								
AQS ♂											
AST ♂		31/19		19/19							
CAR ♂	27/27							9/9			
FFM ♂				11/11							
JOU ♂				6/4							1/1
LYO ♂											
OHO ♂											
RNS ♂											4/3
RIZ ♂											
SOF ♂			11/4			11/11					

### *Genetische Diversität der Einzelpopulationen und der Mischpopulation*

Die Mikrosatellitenanalyse ist in Kapitel 5.2 näher beschrieben. Alle Zuchten zeigen wenigstens an einem Locus Variabilität, wobei die durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Locus bei 1,2 (FFM, LYO) bis 5,6 (KAH Freilandpopulation) liegt (Tab. 5). Der Anteil

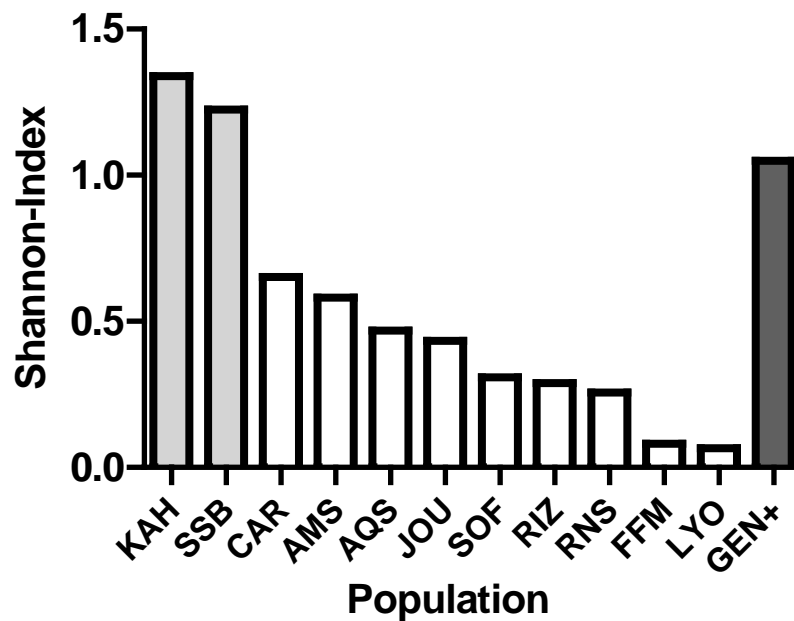
heterozygoter Loci befindet sich zwischen 4% (FFM) und 62,5% (KAH). Beide Freilandzuchten zeigen Variation an allen fünf Mikrosatellitenmarkern und haben vergleichbare Level an genetischer Diversität. Verglichen mit den Freilandproben zeigen alle Laborzuchten eine deutlich verringerte Anzahl an Allelen/Locus (im Mittel 1,7 zu 5,3 im Freiland).

**Tabelle 5:** Populationsgenetische Parameter für die 10 Labor- und 2 Freilandzuchten Dargestellt sind Stichprobengröße (N), Anzahl polymorpher Genorte (P), Allele pro Genort (A), Anteil seltener Allele mit Frequenzen unter 5% ( $A < 5\%$ ), Beobachtete ( $H_O$ ) und Erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotie.

Population	N	P	A	A<5%	$H_O$	$H_E$
AMS	23	5	2,0	0,00	0,469	0,403
AQS	24	4	1,8	0,00	0,350	0,332
CAR	24	4	2,2	0,00	0,389	0,410
FFM	25	1	1,2	0,00	0,040	0,049
JOU	24	4	1,8	0,11	0,280	0,307
LYO	24	1	1,2	0,00	0,042	0,038
PTG	24	3	1,6	0,38	0,123	0,156
RNS	24	2	1,6	0,13	0,175	0,176
RIZ	24	3	1,6	0,12	0,175	0,204
SOF	23	4	2,0	0,20	0,236	0,189
KAH	24	5	5,6	0,18	0,625	0,625
SSB	21	5	5,0	0,16	0,611	0,596

Sowohl die beobachtete als auch erwartete Heterozygotie liegt bei allen Laborzuchten unter den Werten der Freilandpopulationen (im Mittel 0,23 im Labor gegen 0,62 im Freiland). Weiterhin sind diejenigen Laborstämme, die ursprünglich aus dem Freiland gesammelt wurden, signifikant diverser sind als die, welche von einer anderen Laborzucht stammen (one-tailed Mann Whitney test,  $p = 0,032$ ).

Um das generelle Ausmaß an genetischer Verarmung in Laborzuchten zu illustrieren, wird der Shannon-Index für alle Labor- und Freilandpopulationen berechnet (Abb.2). Die Freilandproben zeigen einen klar erhöhten Level an genetischer Variation, während es deutliche Schwankungen zwischen den Laborzuchten gibt.



**Abbildung 2:** Genetische Diversität von *Chironomus riparius* ausgedrückt als Shannon-Index von zwei Freiland- (hellgraue Balken) und neun Laborpopulationen (weiße Balken) sowie der erstellten Mischpopulation GEN+ (dunkelgrauer Balken); Abkürzungen vg. Tabelle 3.

Sowohl die mittlere Anzahl an Allelen/Locus als auch der Shannon Index sind in dem GEN<sup>+</sup>-Ansatz im Vergleich zu allen Laborzuchten klar erhöht (Tab.6). Jedoch befindet sich das Ausmaß genetischer Variation immer noch unter dem der beiden Freilandpopulationen. (im Mittel 5,3 Allele/Locus in den Freilandproben im Vergleich zu 3,6 Allelen/Locus im Kreuzungsansatz).

**Tabelle 6:** Mittlere ( $\pm$  SD) genetische Variation von GEN<sup>+</sup>, sowie den Laborzuchten (n = 9) und Freilandproben (n = 2). SI = Shannon-Index, weitere Abkürzungen siehe Tabelle 5.

abbr.	P	A	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	SI
GEN <sup>+</sup>	5,0	3,6	0,47	0,60	1,05
lab.	3,1 (+/-1,37)	1,7 (+/-0,33)	0,23 (+/-0,14)	0,23 (+/-0,13)	0,34 (+/-0,19)
field	5,0	5,3	0,62	0,62	1,28

Obwohl die genetische Struktur innerhalb von den in den Experimenten verwendeten Populationen die Ergebnisse von toxikologischen Bioassays beeinflussen kann, (MUKHOPADHYAY ET AL., 1997; DUAN ET AL., 1997; WOODS ET AL., 1989), ist bisher kaum etwas über das Ausmaß an genetischer Diversität in Testzuchten bekannt. Die Ergebnisse zeigen, das Laborzuchten von *C. riparius* generell im Vergleich zu den Freilandpopulationen

genetisch verarmt sind. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Resultaten, die bei der Untersuchung von Laborpopulationen anderer Tiergruppen erzielt wurden (MUKHOPADHYAY ET AL., 1997; DUAN ET AL., 1997; WOODS ET AL., 1989). Genetische Verarmung ist folglich ein universell verbreitetes Phänomen in Laborpopulationen, welches durch zwei Hauptmechanismen erklärbar ist. Bei der Etablierung von Laborzuchten durch eine begrenzte Zahl von Gründerindividuen kommt es durch den sogenannten Gründereffekt zu einer Reduzierung der allelischen Variabilität in der Population, da die Gründer nur einen Teil des Genpools der Ausgangspopulation in die Zucht "mitnehmen". Da die Laborzuchten über lange Zeiträume isoliert sind, führt genetische Drift zu einer weiteren genetischen Verarmung, die nicht durch Genfluss aus benachbarten Populationen wiederhergestellt werden kann. Da das Ausmaß an genetischer Drift von der Populationsgröße abhängt, können Laborpopulationen, die in kleinen Individuenzahlen gehalten werden, schnell an allelischer Variabilität verlieren. Diesen Effekt kann man deutlich im Verlauf der drei Multigenerationsstudien anhand der Heterozygotiewerte der Kontrollpopulationen beobachten (Kapitel 6.1).

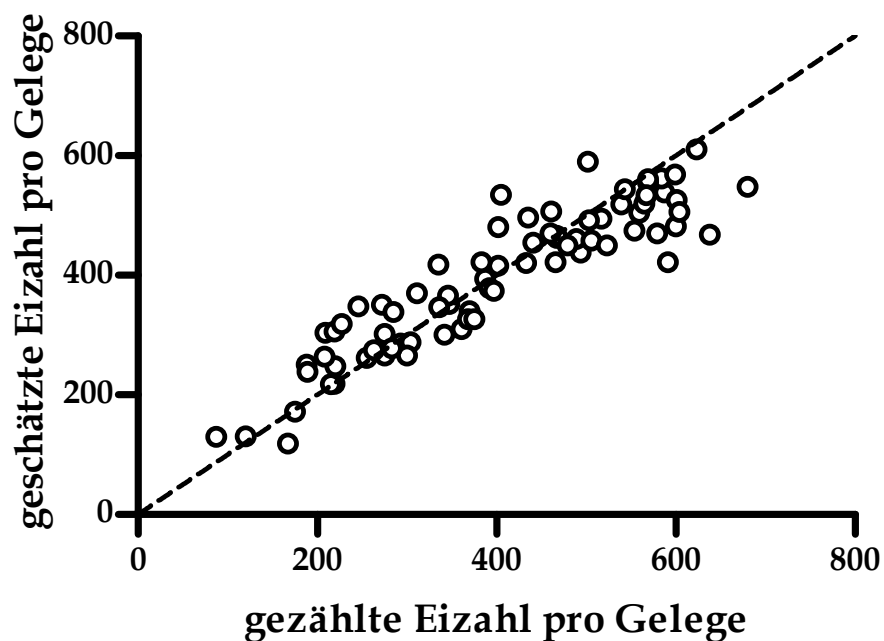
Das deutlich verringerte Ausmaß an genetischer Diversität indiziert starke Inzucht in den untersuchten Laborzuchten. Inzucht kann zu verminderter Fitness führen, insbesondere unter stressreichen Umweltbedingungen, wie neuere Studien zeigen (ARMBRUSTER UND REED, 2005; DAHLGAARD UND HOFFMANN, 2000). Dies könnte für Toxizitätstests mit genetisch verarmten und ingezüchteten Laborpopulationen negative Auswirkungen haben. Zum einen könnten Ergebnisse in Toxizitätsuntersuchungen durch erhöhte Sensitivität auf Schadstoffexposition beeinflusst werden, was die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die mit verschiedenen Zuchten gewonnen wurden, erschweren würde. Desweiteren wäre die Übertragbarkeit von Laborergebnissen mit der Art auf die natürlichen Verhältnisse im Freiland nicht gegeben. In Kapitel 8 wird dargestellt, inwieweit eine unterschiedliche genetische Diversität die Reaktion von *Chironomus*-Laborzuchten die Toleranz gegenüber Cadmiumstress beeinflusst.

#### *Bestimmung der Gelegegröße*

Für die Ermittlung der Anzahl an Eiern pro Gelege wird die Methode nach BENOIT ET AL. (1997) modifiziert und die Anzahl an Spiralen mit der Eianzahl in der mittleren Spirale multipliziert. Vor dem Experiment wird die Methode mittels einer Kalibrierungskurve auf deren Anwendbarkeit und mögliche Fehler überprüft. Dafür wird in einer Stichprobe von 76 Eigelegen die Anzahl an Eiern pro Gelege zunächst geschätzt und anschließend durch das Auflösen der Gallerte mit 40% Schwefelsäure die Eier separiert und gezählt. Außerdem wird in einem weiteren Vorexperiment unter Kontrollbedingungen überprüft, ob in Gelegen, die als

*fertil* deklariert wurden, auch tatsächlich aus allen Eiern Larven schlüpfen. Dafür werden von 30 fertilen Gelegen die Anzahlen an geschlüpften L1-Larven über mehrere Tage bestimmt und mit der Gesamtanzahl an Eiern abgeglichen.

Das Ergebnis der Kalibrierungskurve ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Anzahl an geschätzten Eiern pro Gelege ist dabei mit der Anzahl an gezählten Eiern pro Gelege korreliert (Spearman Korrelation,  $p < 0,001$ ). Es deutet sich an, dass die angewandte Methode zu einer leichten Überschätzung der Gelegegröße bei kleinen Gelegen und zu einer Unterschätzung der Eizahlen pro Gelege bei großen Gelegen führt. Dieser Effekt wird allerdings in den Experimenten aufgrund des guten linearen Regressionskoeffizienten ( $r^2 = 0,84$ ) vernachlässigt. Im Mittel sind 85% ( $\pm 14,8\%$ ) eines als fertil kategorisierten Geleges entwicklungsfähig.



**Abbildung 3:** *Chironomus riparius* – gezählte und geschätzte Eizahl pro Gelege (Spearman Korrelation,  $p < 0,001$ ,  $n = 76$ , gestrichelte Linie - lineare Regression mit dem Anstieg 1).

### 3.2 Datenauswertung

Die statistische Auswertung der ökotoxikologischen Daten wird mit dem Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.03 (GraphPad Software, USA) durchgeführt. Zur Signifikanzberechnung werden klassische Auswertungsmethoden herangezogen. Bei normal verteilten Daten (ohne Abweichungen der Varianzen) werden der ungepaarte t-Test oder bei mehreren Vergleichsgruppen eine einfache Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett's posthoc test) durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Daten bzw. bei unterschiedlichen Varianzen wird der Mann-Whitney U-Test oder ein Kruskal-Wallis Test (Dunn's posthoc test) für die Berechnung von signifikanten Unterschieden herangezogen.

In den MGS II/III erfolgt eine Modifizierung des Testdesigns, wobei pro Behandlungsgruppe zwei unabhängige Replikate mit jeweils sieben Kristallisierschalen (Pseudoreplikate) durchgeführt werden (Kap. 6.1.2 und 6.1.3). Im Vergleich dazu wird in der MGS I jeweils nur ein unabhängiges Replikat mit 10 Kristallisierschalen (Pseudoreplikate) verwendet (Kap. 6.1.1). Durch die Veränderung des Testdesigns wird eine statistische Auswertung der Endpunkte Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), der Populationswachstumsrate und vor allem für die genetischen Endpunkte in den MGS II/III möglich.

#### *Mortalität und LC<sub>50</sub>*

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

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

$N_{\text{Larven}}$	Anzahl toter Larven
$N_{\text{Puppen}}$	Anzahl toter Puppen
$N_{\text{Gesamt}}$	Anzahl eingesetzter Larven pro Schale (50 Tiere)

Für die chronischen Tests können aussagekräftige LC<sub>50</sub>-Werte nur für die Experimente mit einer Kontrollmortalität < 30% berechnet werden. Zu Beginn der Analysen wird für jede Konzentration eine mittlere Mortalität ( $\pm$  SD, n) gebildet und diese anschließend für die Berechnung des LC<sub>50</sub>-Wertes, mittels nicht linearer Regression (sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg) benutzt. Als festgesetzte Kurvenparameter dienen für die untere/obere Asymptote der Regressionskurve die Kontrollmortalität sowie die maximale



Mortalität von 100%. Signifikante Unterschiede werden für die MGS I durch ein Global-Fitting Verfahren nach MOTULSKY und CHRISTOPOULOS (2004) bestimmt. In den MGS II/III wird zuerst ein LC<sub>50</sub>-Wert pro Replikat berechnet und anschließend die beiden Replikate pro Behandlungsgruppe zusammengefasst (n = 2). Signifikante Unterschiede der jeweiligen LC<sub>50</sub>-Werte werden nun durch einen t-Test bestimmt. In den Akuttests werden die LC<sub>50</sub>-Werte übereinstimmend zu den chronischen Tests bestimmt.

#### *Mittlerer Schlupfzeitpunkt und Hauptschlupfintervall*

Basierend auf dem Schlupfzeitpunkt und der Anzahl der geschlüpften Tiere wird der mittlere Schlupfzeitpunkt (EmT<sub>50</sub>) für das jeweilige Geschlecht und für jede Schale einzeln ermittelt. Für die Berechnung des EmT<sub>50</sub> ist es notwendig, die Daten zu transformieren. Dabei wird die Anzahl der geschlüpften Tiere kumuliert und anschließend auf 100% normalisiert. Zusätzlich wird der natürliche Logarithmus des Schlupfzeitpunktes gebildet. Die normalisierte Anzahl der geschlüpften Tiere wird danach gegen die logarithmierte Zeitachse aufgetragen und eine nicht lineare Regression mit der Logistikkurve durchgeführt (Gl. 2).

Das Softwareprogramm Prism<sup>®</sup> berechnet anhand der Logistikkurve die EmT<sub>50</sub> der jeweiligen Geschlechter, den Standardfehler, das dazugehörige 95% Konfidenzintervall (95% KI) sowie die Anzahl der Freiheitsgrade. Um die EmT<sub>50</sub>-Werte anschaulich darstellen zu können, werden die logarithmierten Werte rücktransformiert und anschließend die einzelnen EmT<sub>50</sub>-Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst und sowohl im Vorexperiment als auch in der

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

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

MGS I auf signifikante Unterschiede (t-Test) überprüft. In den MGS II/III wird erneut zuerst ein EmT<sub>50</sub> pro Replikat berechnet und anschließend beide Replikate pro Behandlungsgruppe zusammengefasst (n = 2). Signifikante Unterschiede werden abermals durch einen t-Test bestimmt. Weiterhin werden die EmT<sub>20</sub> (20% Gesamtschlupf) und EmT<sub>80</sub> Werte (80% Gesamtschlupf) anhand einer kumulativen Logistikkurve mittels Interpolation im

Vorexperiment bestimmt. So lässt sich, durch Subtraktion ( $EmT_{80}-EmT_{20}$ ) das Hauptschlupfintervall ermitteln, in dem 60% aller Tiere geschlüpft sind.

#### *Weibchenanteil der geschlüpften Imagines (AW)*

Der Anteil der Weibchen an der Gesamtanzahl der geschlüpften Tiere wird 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 werden in der Vorstudie und in der MGS I mittels Fisher's exact Test und in den MGS II/III mittels t-Test ermittelt.

#### *Gelege pro Weibchen*

Die Anzahl an Gelegen pro Weibchen wird durch einfache Division berechnet. Dieser Parameter kann in die gesamte Anzahl an Gelegen pro Weibchen und in die fertile Gelegeanzahl pro Weibchen unterschieden werden. Signifikante Unterschiede werden in der Vorstudie und in der MGS I mittels Fisher's exact Test und in den MGS II/III mittels t-Test ermittelt.

#### *Gelegegröße*

In den Experimenten wird die Gelegegröße mit der modifizierten Ringzählmethode nach BENOIT ET AL. (1997) aufgenommen. Gelege, die eine unregelmäßige Form aufwiesen, werden dabei nicht berücksichtigt und im Ergebnis mit *n.d.* (nicht definierbar) gekennzeichnet. Da die Gelegegröße nicht normal verteilt ist, wird 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 werden innerhalb der MGS II/III wieder analog zur Mortalität ermittelt.

### *Trockengewicht der Imagines*

Das Trockengewicht der Imagines wird nur in der MGS I ermittelt. Die Gewichte der Weibchen weisen 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 ( $\lambda$ ) wird über den einfachen 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). Die Populationswachstumsrate gibt an, um das wie viel Fache die Population täglich wächst.

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

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

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

### *Genetische Analysen*

Die populationsgenetischen Diversitätsmaße (z.B. beobachtete und erwartete Heterozygotie, Anzahl an Allelen/Locus, Shannon-Index) sowie der Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Allelfrequenzen an den jeweiligen Genorten werden mit dem Programm GENPOP<sup>®</sup> (Online-Version 3.4, RAYMOND & ROUSSET, 1995) ermittelt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Vorexperimente

#### 4.1.1 Ermittlung geeigneter TBT- und Cd-Konzentrationen

Vor der Durchführung der Multigenerationsstudien werden Life-Cycle Experimente in Anlehnung an die OECD Guideline 218 (OECD, 2004a), zur Bestimmung geeigneter TBT- und Cd-Konzentrationen durchgeführt (VOGT ET AL., 2007a). Außerdem werden in der Vorstudie zwei verschiedene Testgefäße mit unterschiedlichen Larvenanzahlen und Sediment:Wasser-Verhältnissen auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft. Im TBT-Experiment werden jeweils 20 Tiere in 600 mL Bechergläsern (100 g Quarzsand und 400 mL rekonstituiertes Wasser) exponiert. 2 L-Kristallisierschalen (Schott, Mainz, Deutschland, Ø 19 cm), gefüllt mit 100 g Quarzsand und 1 L rekonstituiertem Wasser dienen als Testgefäße im Experiment mit Cd. In diesem Experiment werden jeweils 50 Tiere pro Schale exponiert. In den Vorstudien werden fünf (TBT) bzw. zwei (Cd) Replikate durchgeführt. Das Wasser in den Testgefäßen wird mit Hilfe einer Pasteurpipette belüftet (ca. eine Blase/sec). Außerdem werden die Testgefäße mit einer Gazeabdeckung (Maschenweite 0,75 mm) versehen. Für das Vorexperiment werden mindestens zehn frische Gelege (Alter  $\leq 24$  h) aus der GEN+ Population entnommen und in mit rekonstituiertem Wasser gefüllten Mikroskopiernäpfen zum Schlupf gebracht. Im Anschluss daran werden die Larven der einzelnen Gelege in einer Petrischale durchmischt. Mit Hilfe eines Stereomikroskops werden jeweils 20 bzw. 50 vitale Larven in eine Pasteurpipette gesaugt und in die jeweiligen Testgefäße eingesetzt. Dieser Zeitpunkt wird als Tag 0 des Experimentes definiert. Damit sich die eingesetzten Larven in das Sediment eingraben können, wird die Belüftung zu Beginn des Versuches für 24 h abgestellt. Die Chironomidenlarven werden täglich bis zum 18. Versuchstag mit 0,5 mg/Larve/d gemahlener Tetra-Min<sup>®</sup> Suspension gefüttert. Ab dem 19. Versuchstag wird die Futtermenge, bedingt durch den Schlupf der Imagines, für die noch nicht geschlüpften Larven halbiert.

Als Nominalkonzentrationen werden für TBT 50; 80; 100 und 200  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  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 Experiments werden 500 g Quarzsand mindestens 5 min mit entionisiertem Wasser gewaschen und bei 150 °C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wird das Sediment mit den jeweiligen Testkonzentrationen gespikt. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von TBT wird als Lösungsvermittler Ethanol (300 mL EtOH/kg TG, Reinheit > 99,5%, Merck

Schuchardt, Darmstadt) eingesetzt. Aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird EtOH auch im Cd-Experiment entsprechend eingesetzt. Nach dem Spiken wird das Lösemittel vollständig abgedampft. So sollen Lösemittelleffekte ausgeschlossen werden. Neben der Substanzexposition wird deshalb auch eine Lösemittelkontrolle (LMK) mitgeführt. Um eventuelle Effekte des Ethanols abschätzen zu können, erfolgt außerdem die Durchführung einer zusätzlichen Kontrolle mit rekonstituiertem Wasser im TBT-Experiment. In Anlehnung an die OECD-Standardmethode werden am Anfang und am Ende des Experiments pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt und Temperatur gemessen. Auftretende Verdunstungsverluste in den Testgefäßen wurden durch Zugabe von entionisiertem Wasser kompensiert.

Die Testgefäße werden einmal täglich auf tote Larven sowie Puppen untersucht und diese werden entnommen. Da ab dem 12. Versuchstag der Schlupfzeitpunkt der Mücken allmählich erreicht wird, erfolgt mindestens einmal täglich die Untersuchung der Bechergläser hinsichtlich geschlüpfter Tiere. Dabei werden das Geschlecht, der Schlupfzeitpunkt, die Anzahl der Schlupfunfälle und wenn möglich deren Geschlecht bestimmt. Geschlüpfte Imagines werden 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 kann. Dazu wird für die Eiablage der Weibchen ein mit ca. 300 mL rekonstituiertem Wasser gefüllter Behälter (12×12×3,5 cm) aufgestellt. Die produzierten Gelege werden einmal täglich gezählt und die Eizahl pro Gelege bestimmt (vgl. Kap. 3.3.4).

Als Versuchsendpunkte dienen die Larvalmortalität, das Geschlechterverhältnis und die mittlere Emergenzzeit der beiden Geschlechter. Weiterhin werden die Anzahl an Gelegen pro Weibchen (gesamt bzw. fertil), die Gelegegröße und deren Fertilität als weitere Endpunkte im Hinblick auf die Fortpflanzung definiert. Die Bestimmung der Populationswachstumsrate dient als integrierender Versuchsendpunkt. Am Ende des TBT-Experiments, nach ca. 40 Tagen, werden die toten Imagines bis zur Gewichtskonstanz bei 34°C im Wärmeschrank getrocknet und deren Trockengewicht mit einer Analysenwaage (Sartorius 4401, Göttingen, Deutschland) bestimmt.

#### *Validitätskriterien*

Die beiden Vorexperimente erfüllen nahezu alle Validitätsanforderungen der OECD Guideline 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 Guideline festgestellt, da der pH-Wert nicht wie vorgegeben zwischen 6 und 9, sondern teilweise bei 5,5 liegt. Weiterhin beträgt die Temperatur über den gesamten Versuchsverlauf stets  $20 \pm 1$  °C, die Leitfähigkeit zu Beginn des Experiments 540  $\mu\text{S}/\text{cm}$  und die Sauerstoffsättigung ist stets über 60%.

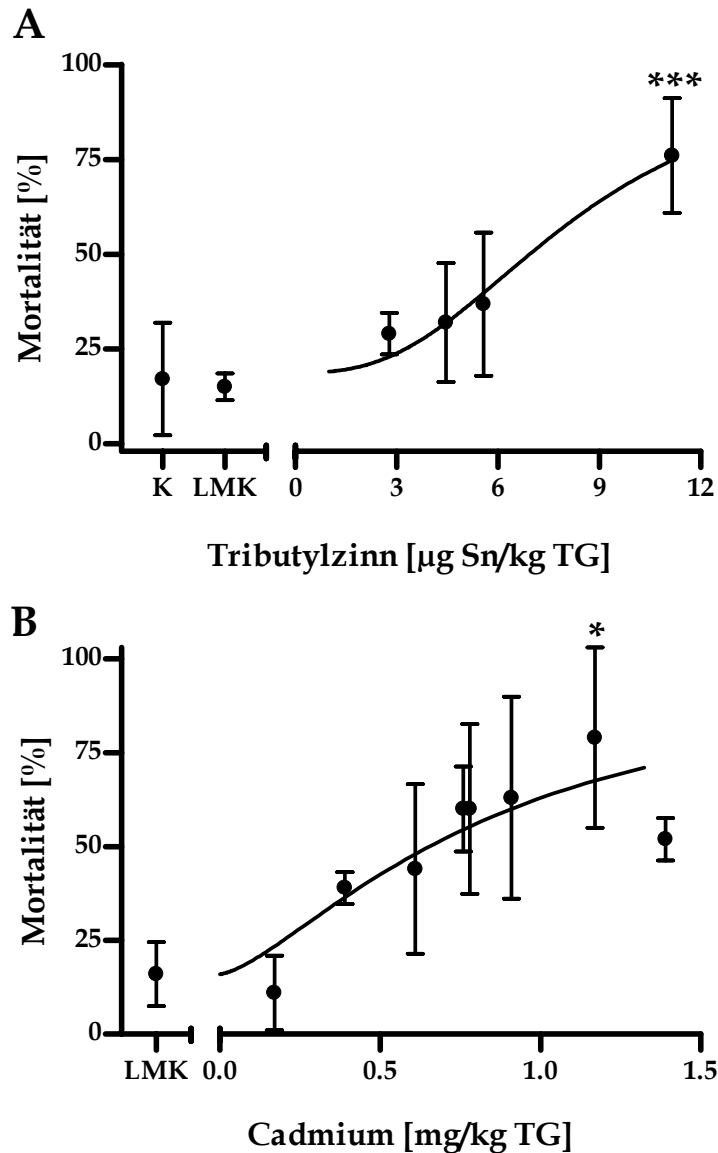
#### *Lösemittelleffekte und Testdesign*

Im TBT-Experiment wird beobachtet, dass keiner der untersuchten Endpunkte signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle mit rekonstituiertem Wasser und der LMK mit EtOH aufweist. Weiterhin zeigen die Endpunkte der beiden Testdesigns mit verschiedenen Larvenanzahlen pro Testgefäß und mit unterschiedlichen Sediment:Wasser-Verhältnissen keine signifikanten Unterschiede.

#### *Mortalität und Geschlechterverhältnis*

Die Exposition gegenüber beiden Substanzen resultiert in einer klaren Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 4A,B) und mit steigender Konzentration steigt auch die Mortalität signifikant an (Pearson Korrelation,  $p < 0,05$ ). Signifikant (ANOVA,  $p < 0,001$ ) erhöhte Larvalmortalitäten können dabei bei der höchsten TBT-Konzentration (gemessen: 11,2  $\mu\text{g Sn}/\text{kg TG}$ ) mit einem Mittelwert von 75% beobachtet werden. Weiterhin wird ein  $\text{LC}_{50}$ -Wert für TBT von 8,27  $\mu\text{g Sn}/\text{kg TG}$  ( $\pm 95\%$  KI, 6,56 – 10,4  $\mu\text{g Sn}/\text{kg TG}$ , bezogen auf gemessene Konzentrationen) berechnet. Steigende Cd-Konzentrationen führen ebenso zu erhöhten Larvalmortalitäten, wobei ein signifikanter (ANOVA,  $p < 0,05$ ) Unterschied bei einer gemessenen Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG, mit einer mittleren Mortalität von 79% im Vergleich zur LMK ermittelt wird. Eine Ausnahme von der monoton steigenden Konzentrations-Wirkungsbeziehung wird allerdings in der höchsten Cd-Konzentration beobachtet. Diese weist eine mittlere Mortalität von 52% auf. Der berechnete  $\text{LC}_{50}$ -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 Verschiebung 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).



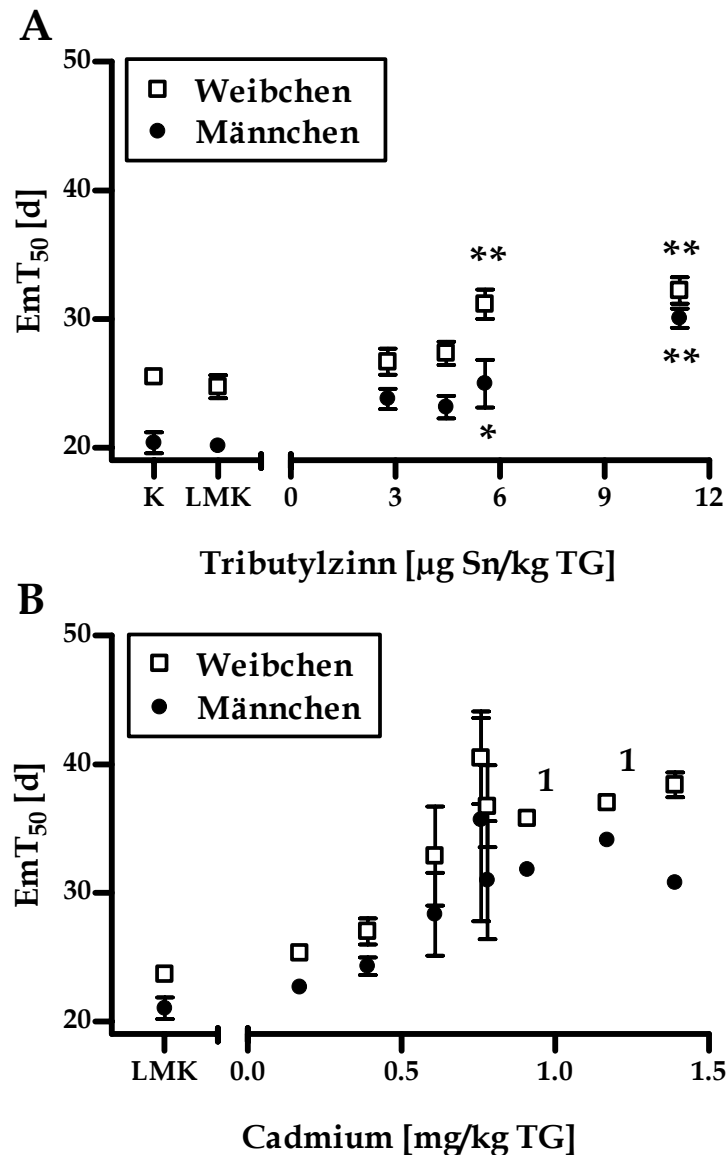
**Abbildung 4:** Mittlere Mortalität ( $\pm$  SD, in %) von *Chironomus riparius* exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B). Dargestellt sind jeweils gemessene Konzentrationen, signifikante Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse bestimmt (ANOVA, Dunnett's post hoc test,  $n_{\text{TBT}} = 4-5$ ,  $n_{\text{Cd}} = 1-2$ ,  $\star = p < 0,05$ ,  $\star\star\star = p < 0,001$ , K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle). Die Berechnung der  $\text{LC}_{50}$ -Werte erfolgte mittels nicht linearer Regression (sigmoide Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg, geschlossene Linie).  $\text{LC}_{50}$ -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  $\text{LC}_{50}$ -Wert Cd =  $0,85 \text{ mg/kg TG}$  ( $\pm$  95% KI  $0,62 - 1,18 \text{ mg/kg TG}$ ,  $n = 16$ )

#### *EmT<sub>50</sub> und Hauptschlupfintervall*

In allen Behandlungsgruppen schlüpfen die Männchen vor den Weibchen (Abb. 5A,B). Weiterhin ist festzustellen, dass beide Testsubstanzen den Schlupf geschlechtsunabhängig beeinflussen, da eine hohe Korrelation der  $\text{EmT}_{50}$  festgestellt 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. 5A), wobei der

Schlupf von beiden Geschlechtern in den beiden höchsten Konzentrationen signifikant verzögert wird (ANOVA,  $p < 0,05$ ). 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 kann kein geschlechtsspezifischer Unterschied hinsichtlich dieses Parameters beobachtet werden. Für Cd variieren der berechnete  $EmT_{50}$  und das Hauptschlupfintervall stark, welches durch die niedrige Anzahl an Replikaten und die damit geringe statistische Aussagekraft zu begründen ist (2 Replikate pro Konzentration). Bei den Konzentration von 0,91 und 1,17 mg Cd/kg TG basieren  $EmT_{50}$  und Hauptschlupfintervall nur auf einem Replikat, da in dem zweiten Replikat die Mortalität größer als 80% ist und kein aussagekräftiger Wert berechnet werden kann. Cadmium verzögert den  $EmT_{50}$  beider Geschlechter signifikant in einer deutlichen Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 5B, Pearson Korrelation,  $p < 0,05$ ). Die maximale Inhibition der Schlupfverzögerung wird bei einer Konzentration von 0,76 mg Cd/kg TG beobachtet, wobei der  $EmT_{50}$  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 signifikante 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 einer Konzentration von 0,76 mg Cd/kg TG beobachtet wird. Bei dieser Konzentration beträgt das Hauptschlupfintervall ca. 10 d und ist fast doppelt so lang wie in der LMK. Für die Männchen wird der Substanzeffekt auf das Hauptschlupfintervall ebenso beobachtet und eine deutliche Verlängerung des Schlupfes ist bei den Konzentrationen 0,78; 0,91 und 1,17 mg Cd/kg TG festzustellen.





**Abbildung 5:** Mittlerer Schlupfzeitpunkt ( $EmT_{50} \pm SEM$ , in d) von *Chironomus riparius* Männchen (geschlossene Punkte) und Weibchen (offene Quadrate) des Tributylzinn (A) und Cadmium (B) Experimentes. Signifikante Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse berechnet (ANOVA, Dunnett's post hoc test,  $n_{TBT} = 4-5$ ,  $n_{Cd} = 1-2$ , ★  $p < 0,05$ , ★★  $p < 0,01$ ). K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle (Ethanol), Index 1 Werte wurden basierend auf einem Replikates berechnet, da im anderen Replikat die Mortalität  $> 80\%$  war.

### Reproduktion

Bezüglich der Gelegeanzahl pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) kann festgestellt werden, dass die Weibchen in der Behandlungsgruppe mit der niedrigsten TBT-Konzentration ( $2,79 \mu\text{g Sn/kg TG}$ ) und in der LMK des Cd-Experimentes mehr als ein Gelege pro Weibchen produzieren (1,03 im TBT-Experiment und 1,04 im Cd-Experiment) (Tab. 7). Für die Exposition gegenüber TBT wird eine Erniedrigung der Anzahl an Gelegen pro Weibchen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle bei den beiden höchsten Konzentrationen ermittelt. Dabei

wird in der höchsten Konzentration nur ein Gelege produziert und ein niedriger Wert an Gelegen pro Weibchen mit 0,13 berechnet. Die Fertilität der Gelege ist durch TBT nicht beeinflusst und variiert zwischen 74% (5,58 µg Sn/kg TG) und 100% (11,2 µg Sn/kg TG).

**Tabelle 7:** Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertile), Eier pro Gelege und geschätzte Larvenanzahl der F1-Generation des Tributylzinn und Cadmium Experimentes. (Konzentration in zeitlich gewichteter mittlerer Testkonzentration, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post hoc test, ★  $p < 0,05$ , ★★  $p < 0,01$ , LMK - Lösemittelkontrolle)

Konzentration	Gelege pro Weibchen		Eier pro Gelege	Geschätzte Larvenzahl der F1-Generation
	gesamt	fertil	(Median, 25/75% Perzentil; n)	
<b>Tributylzinn [µg Sn/kg TG]</b>				
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
<b>Cadmium [mg Cd/kg TG]</b>				
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

Cadmium beeinflusst die Reproduktion der Weibchen negativ. Erniedrigte Reproduktionsraten werden bei den Konzentrationen von 0,76; 1,17 und 1,39 mg Cd/kg TG festgestellt. Allerdings sind diese negativen Effekte nicht konzentrations-wirkungsabhängig, da die Reproduktion bei den Konzentrationen 0,78 und 0,91 mg Cd/kg TG nicht beeinflusst wird. Cadmium hat auch einen Einfluss auf die Fertilität der Gelege. Bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG sind nur 40% der produzierten Gelege fertil. Im Vergleich dazu sind es in der LMK 85%.

Für TBT wird kein Effekt auf die Gelegegröße beobachtet (Tab. 7). Im Gegensatz dazu sind signifikante Effekte der Cd-Exposition bei den Konzentrationen von 0,17; 0,61; 0,78; 0,91

und 1,39 mg Cd/kg TG zu beobachten. In diesen Behandlungsgruppen sind Gelege signifikant (U-Test,  $p < 0,05$ ) kleiner als in der LMK, wobei eine nicht monotone Konzentrations-Wirkungsbeziehung ermittelt wird. Außerdem werden in nahezu allen Kontrollen bzw. LMK und Behandlungsgruppen Gelege mit einer Abweichung von der regelmäßigen spiralförmigen Ausprägung beobachtet.

Neben den reproduktionsrelevanten Parametern wird im Vorexperiment auch die Anzahl an Larven der F1-Generation abgeschätzt, um die Realisierbarkeit der folgenden Multigenerationsstudien überprüfen zu können. 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-Behandlung (2,79  $\mu\text{g Sn/kg TG}$ ) wird beobachtet, dass die Anzahl an Larven für die nächste Generation mit 15.478 leicht über der Anzahl in der LMK liegt. Im Gegensatz dazu führt eine Erhöhung der TBT-Konzentration zu einer deutlichen Verringerung der Larvenanzahlen für die nächste Generation. Im Cd-Experiment werden in der LMK höhere Anzahlen an Larven für die nächste Generation im Vergleich zur Lösemittelkontrolle im TBT-Experiment ermittelt (26.606). Mit steigenden Cd-Konzentrationen erniedrigt sich auch die Anzahl an Larven signifikant (Pearson Korrelation,  $p < 0,01$ ) und ein Minimalwert von 1.209 Larven wird bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG beobachtet.

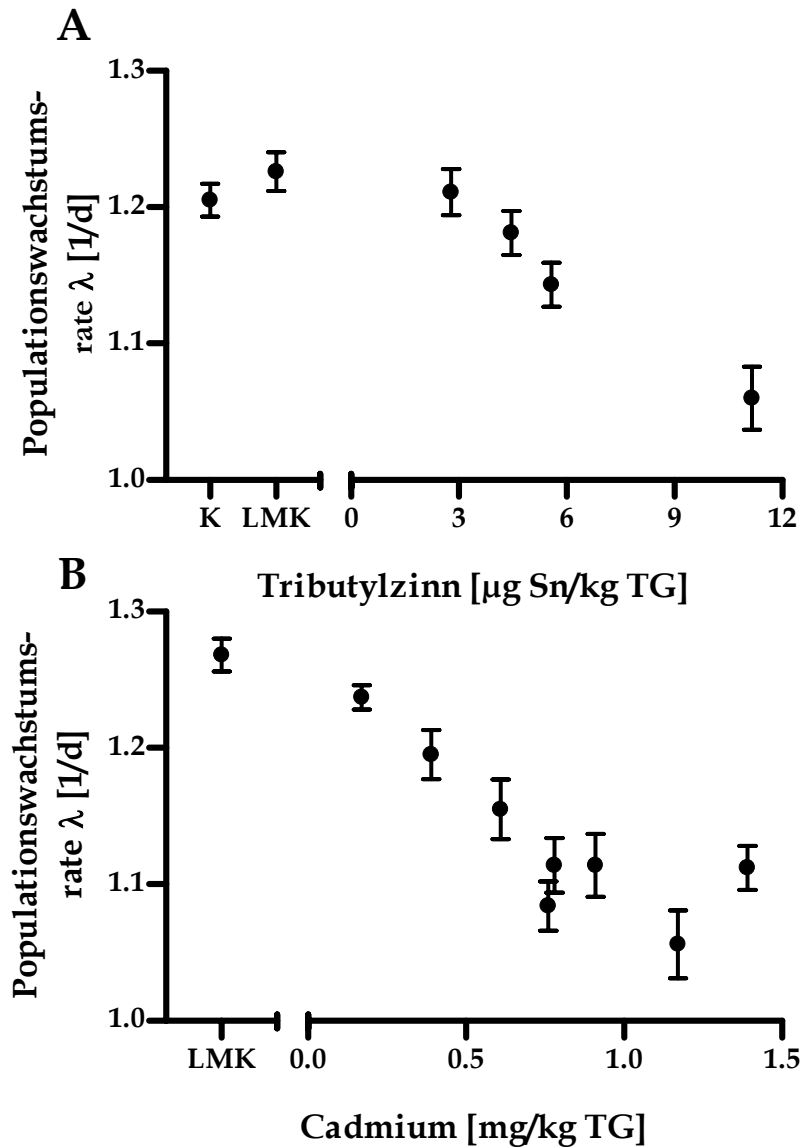
#### *Trockengewicht der Imagines*

Das Trockengewicht der Imagines wird in den Vorexperimenten nur im TBT-Experiment gemessen. Bezüglich des Trockengewichts der Männchen wird eine Normalverteilung festgestellt, während für die Weibchen eine deutliche Abweichung von der Gaußschen Glockenkurve zu beobachten ist. Die männlichen Imagines der LMK weisen das höchste mittlere Gewicht mit 0,404 mg auf. Im Gegensatz dazu werden signifikant (ANOVA,  $p < 0,05$ ) leichtere männliche Imagines (0,335 mg) bei der höchsten TBT-Konzentration im Vergleich zur LMK festgestellt. Die weiblichen medianen Trockengewichte 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) verringert sich in beiden Experimenten mit steigenden Konzentrationen kontinuierlich (Abb. 6), wobei eine signifikante Konzentrations-Wirkungsbeziehung festgestellt werden kann (Pearson Korrelation,  $p < 0,05$ ). Die höchsten PWR werden in den Lösemittelkontrollen mit 1,22  $\text{d}^{-1}$  im TBT-Experiment und mit 1,26  $\text{d}^{-1}$  im Cd-Experiment ermittelt. Im Vergleich zu diesen hohen PWR, 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. Wie auch bei den anderen Endpunkten des Cd-Experimentes (z.B. Mortalität und  $\text{EmT}_{50}$ ) wird eine Abweichung von der Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei der höchsten Cd-Konzentration festgestellt.



**Abbildung 6:** Populationswachstumsrate ( $\pm$  SD, in  $\text{d}^{-1}$ ) von *Chironomus riparius* exponiert gegenüber Tributylzinn (A) und Cadmium (B). Dargestellt sind jeweils gemessene Konzentrationen, K = Kontrolle, LMK = Lösemittelkontrolle.

Die Experimente dienen als Vorexperimente für die nachfolgenden Multigenerationsstudien und erfüllen die Validitätskriterien der OECD Guideline 218 (OECD, 2004a). Nur eine Abweichung der Testparameter wird beim pH-Wert ermittelt. Dieser soll laut OECD zwischen 6 und 9 über den gesamten Versuchszeitraum liegen, wird aber in den

Vorexperimenten geringfügige um 0,5 unterschritten. Die Abweichung kann durch das Testdesign ohne organischen Kohlenstoffanteil erklärt werden. 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 ein geeignetes Testdesign bezüglich der Larvendichte und des Sediment:Wasser-Verhältnisses zu ermitteln. Da keine signifikanten Unterschiede der Endpunkte zwischen beiden Testdesigns existieren, wird die Variante mit den Kristallisierschalen (50 Larven) ausgewählt. Dadurch kann ein populationsrelevantes Testdesign bei einem relativ geringen experimentellen Aufwand ermöglicht werden.

Die Ergebnisse der Vorstudien zeigen, dass beide Testsubstanzen in der Lage sind, das Wachstum und die Reproduktion von *C. riparius* bei dem gewählten Testdesign zu beeinflussen. Die beobachteten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen decken dabei den chronischen sowie den akuten Wirkungsbereich ab. Es wird außerdem deutlich, dass TBT ein wesentlich höheres toxikologisches Potential als Cadmium besitzt, da der ermittelte LC<sub>50</sub>-Wert für Cadmium ca. 100-mal höher ist (bezogen auf TBT als Sn). Dieser Unterschied wird aufgrund der bioziden Eigenschaften der Testsubstanz TBT auch angenommen. Andere Studien mit Chironomiden zeigen ebenfalls das hohe toxikologische Potential von TBT bereits im µg/L-Bereich (FARGASOVA, 1998; HAHN & SCHULZ, 2002). Im Gegensatz dazu ist Cadmium weniger toxisch in einem Konzentrations-Wirkungsbereich von 0,17 bis 1,39 mg/kg TG. Für Cadmium werden LC<sub>50</sub>-Werte für Sedimenttoxizitäten zwischen 1,64 und 39 mg Cd/kg TG in der Literatur für *C. riparius* in Abhängigkeit des organischen Kohlenstoffanteils beschrieben. MILANI ET AL. (2003) berechnen einen LC<sub>50</sub>-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 ermitteln die Autoren einer Studie mit Cadmium und *C. riparius* bei einem nach der OECD Guideline 218 standardisierten Sediment (Kohlenstoffanteil 5%) einen LC<sub>50</sub>-Wert von 1,64 mg Cd/kg TG (PEDINA, 2001). Eine dritte Studie kommt zu dem Schluss, dass ein künstliches Sediment mit 15% Kohlenstoffanteil zu einer Mortalität von 13% bei einer Konzentration von 2 mg Cd/kg TG führt (WATTS & PASCOE, 2000). Diese Studien zeigen, dass verschiedene Testdesigns in unterschiedlichen Ergebnissen resultieren und die Vorexperimente für die Bestimmung von geeigneten Testkonzentrationen unerlässlich sind. In den Vorstudien werden weiterhin wenige

tote L4-Larven sowie tote Puppen gefunden. Es ist anzunehmen, dass die empfindlichsten Entwicklungsstadien die früheren Larvenstadien sind. Erhöhte Mortalitäten in den jeweiligen Generationen sind auf Mortalitäten in diesen Entwicklungsphasen zurückzuführen.

Weiterhin wird der mittlere Schlupfzeitpunkt geschlechtsspezifisch berechnet, wobei dieser für beide Lösemittelkontrollen der beiden Experimente gleich ist. Die Männchen schlüpfen etwa am 20. und die Weibchen etwa am 24. Versuchstag. Außerdem wird die Protandrie bezüglich des Schlupfverhaltens beobachtet, 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 und bis heute sind kaum Experimente bekannt, in denen ein abweichendes Schlupfregime durch Chemikalien induziert werden konnte. Klare Effekte auf den  $EmT_{50}$  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 Inhibierung des Wachstums wird ebenfalls im Experiment mit Cd beobachtet, wobei allerdings keine signifikanten statistischen Unterschiede zur Lösemittelkontrolle etabliert werden. Dieses kann auf die niedrige Replikanzahl und den damit verbundenen statistischen Unsicherheiten zurückgeführt werden. Für das Schwermetall kann die Verspätung des  $EmT_{50}$  auch in zahlreichen weiteren Untersuchungen mit Chironomiden bestätigt werden (PASCOE ET AL., 1989; MCCAHERN & PASCOE 1991; SILDANCHANDRA & CRANE, 2000; MILANI ET AL., 2003). Neben den Effekten auf den  $EmT_{50}$  werden auch deutliche Effekte der Substanzexposition auf das Hauptschlupfintervall beobachtet. In den TBT-Ansätzen schlüpfen zwar die Tiere später, aber konzentrationsunabhängig über einen annähernd gleichen Zeitraum. Die verminderte Reproduktion kann deshalb nicht durch das fehlende Zusammentreffen von Weibchen und Männchen erklärt werden. Im Gegensatz dazu sind deutliche Effekte der Cd-Exposition neben der Verzögerung des  $EmT_{50}$  auch auf das Hauptschlupfintervall zu erkennen. Die Tiere in den Expositionsgruppen schlüpfen über einen längeren Zeitraum und es können indirekte Effekte der Testsubstanz auf die Reproduktion durch eine Verringerung der effektiven Schwarmgrößen vermutet werden.

In den Vorexperimenten wurde die OECD Guideline 218 (OECD, 2004a) mit reproduktionsrelevanten Parametern erweitert, um die Durchführbarkeit der Multigenerationsstudien abschätzen zu können. Beiden Substanzen scheinen die Reproduktion bei höheren Konzentrationen negativ zu beeinflussen, allerdings können aufgrund der einfachen Replikation keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Das Phänomen der negativen Beeinflussung der Reproduktion wird auch in einer Diplomarbeit von PEDINA (2001)

beobachtet, wobei eine Reduktion der Gelegegröße von ca. 330 Eiern/Gelege in der Kontrolle auf 200 Eier/Gelege bei einer Cd-Konzentration von 3 mg Cd/kg TG festgestellt wurde. In den Experimenten mit TBT wird allerdings kein Effekt auf die Gelegegröße ermittelt. Außerdem wird eine geringere Fertilität der produzierten Gelege bei einer Konzentration von 1,17 mg Cd/kg TG mit nur 40% beobachtet. Ähnliche Effekte auf die Fertilität der produzierten Gelege konnten bei *C. riparius* durch die Exposition gegenüber dem Insektizid Cypermethrin ermittelt werden (HOOPER ET AL., 2003). Für die Anzahl an Gelegen, welche nicht die regelmäßige spiralförmige Form aufweisen, kann kein Substanzeffekt vermutet werden, da diese sowohl in den Behandlungen als auch in den Kontrollen sowie Lösemittelkontrollen festgestellt werden.

Ein weiterer wichtiger Endpunkt ist die Anzahl an Larven in der F1-Generation. Ist diese zu gering, können die Multigenerationsstudien nicht erfolgreich durchgeführt werden. Bei erhöhten Konzentrationen verringert sich die Anzahl an F1-Larven deutlich. Die exponierten Populationen sind bei höheren Konzentrationen einem erhöhten Aussterberisiko ausgesetzt.

In den Vorexperimenten tritt keine Abweichung des Weibchenanteils auf und dieser variiert stets um die Gleichverteilung von 0,5. Ähnlich Ergebnisse werden in einer Studie mit Cd und *C. riparius* ermittelt (WATTS & PASCOE, 2000) und der Endpunkt des Geschlechterverhältnisses scheint kein sensitiver Parameter hinsichtlich der Schadstoffexposition für diese Species zu sein.

Weiterhin wurde in dem Vorexperiment mit TBT das Trockengewicht der adulten Imagines ermittelt, wobei auffiel, dass die Männchen stets signifikant ( $p < 0,001$ ) leichter sind als die Weibchen. Diese Tatsache kann mit der Eiablage der Weibchen erklärt werden, da anzunehmen ist, dass nicht alle Weibchen erfolgreich ein Gelege ablegen und nach dem Absterben der Weibchen noch unabgelegte Gelege deren Gewicht erhöhen. Das Trockengewicht der Tiere wird nur bei der höchsten TBT-Konzentration beeinflusst. In dieser Behandlung sind die Männchen signifikant leichter ( $p < 0,05$ ) als diejenigen der Lösemittelkontrolle. Diese Tatsache scheint auf generelle Toxizitäten hinzuweisen, da die adulten Tiere von Nahrungsdepots der Larven profitieren und diese bei höherer Schadstoffbelastung mehr Energie in die Schadstoffelimination als in den Aufbau von Biomasse investieren. Ähnliche Ergebnisse werden bezüglich des Larvengewichtes von Chironomiden für belastete Sedimente (WENTSEL ET AL., 1977) und bei Cd-Exposition (PASCOE ET AL., 1989; WATTS & PASCOE, 2000) berichtet. Im Gegensatz dazu zeigen Studien mit Cypermethrin (HOOPER ET AL., 2003) und Cd (MCCAHERN & PASCOE 1991) erhöhte

Trockengewichte der Tiere. Die Aussagekraft dieses Parameters ist kritisch zu betrachten und es deutet darauf hin, dass es entscheidend auf den Konzentrationsbereich der Testsubstanzen ankommt.

Neben zahlreichen Einzelparametern wird die Populationswachstumsrate (PWR) in Anlehnung an FORBES & COLD (2005) und SIBLEY ET AL. (1997) berechnet, um Aussagen der Substanzexposition vom Einzelindividuum auf die Populationsebene ableiten zu können. Für die Lösemittelkontrollen werden hohe PWR von  $1,22 \text{ d}^{-1}$  für das TBT-Experiment und  $1,26 \text{ d}^{-1}$  für das Cd-Experiment berechnet und die Populationen wachsen täglich um 22% (TBT) bzw. 26% (Cd). Ähnlich hohe PWR mit  $1,28 \text{ d}^{-1}$  für *C. riparius* werden bei der Anwendung des DEBtox-Modells (LOPES ET AL., 2005) unter Standardbedingungen ermittelt. In niedrigen Konzentrationen führt TBT zu einer leichten Steigerung der PWR, während hohe 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 zahlreichen weiteren Studien, z.B. bei der Exposition gegenüber Pestiziden ermittelt (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 somit wachsen die Populationen sogar in den höchsten Konzentrationen unter den gewählten Standardbedingungen weiter. Als Erklärung dafür kann die hohe Anzahl an Eiern pro Gelege angenommen werden. Diese Tatsache kann anhand der höchsten TBT-Konzentration belegt werden. In dieser Behandlung wird insgesamt nur ein Gelege produziert, wobei in diesem Gelege insgesamt 495 Eier gezählt werden. Damit kann angenommen werden, dass sich die nächste Generation aus 495 Larven entwickelt und sich die Anzahl an Tieren im Vergleich zum Versuchsbeginn (100 Larven eingesetzt) deutlich erhöht (allerdings ist hier zu bedenken, dass die Nachkommen ausschließlich von einer Mutter stammen (vorausgesetzt Mehrfachbefruchtung findet nicht statt) und in der Folge wird es vermutlich zu einer Erniedrigung genetischer Variabilität kommen). Es kann festgestellt werden, dass die gewählten Konzentrationen zu deutlichen Effekten aber nicht zu einem akuten Aussterberisiko unter Laborbedingungen führen.

Für die folgenden Experimente wurden aufgrund dieser Erkenntnisse TBT-Nominalkonzentrationen zwischen 80 und  $160 \mu\text{g Sn/kg TG}$  ausgewählt. Für die Zweitstressorstudien mit Cadmium wurde eine Nominalkonzentration im Bereich des  $\text{LC}_{50}$ -Wertes eingesetzt ( $1,2 \text{ mg/kg TG}$ ).



#### 4.1.2 Entwicklung der Mikrosatelliten

Ziel ist es, für die Schwesterarten *Chironomus riparius* und *Chironomus piger* (Diptera: Chironomidae) geeignete Mikrosatellitenmarker zu entwickeln. Obwohl zahlreiche Arbeiten über populationsdynamische Prozesse bei Chironomiden veröffentlicht wurden, gibt es bisher für Arten dieser Familie keine modernen molekulargenetischen Markersysteme, um genetische Diversitätsmuster innerhalb und zwischen Populationen zu untersuchen. Um zu beantworten, ob anthropogene Schadstoffbelastung die genetische Diversität von *C. riparius*-Populationen beeinflusst, werden im Rahmen des Projektes fünf variable Mikrosatellitenloci im Genom der Spezies identifiziert. Diese Marker werden auch auf Anwendbarkeit bei der eng verwandten Art *C. piger* STRENZKE untersucht. *C. piger* ist morphologisch nicht sicher von *C. riparius* zu unterscheiden und kann mit dieser Hybride bilden. Daher ist die molekulare Unterscheidung zwischen den beiden Elternarten und potentiellen Hybriden für die Untersuchung der Populationsstruktur von großer Bedeutung. Die Mikrosatellitenloci werden mittels *in situ*-Hybridisierung auf den Chromosomen lokalisiert, um ihren "single copy"-Status und ihre physikalische Unabhängigkeit voneinander zu überprüfen.

Zur Konstruktion einer Genbank wird DNA von 100 *C. riparius*-Individuen extrahiert. Die DNA wird mechanisch geschnitten (Nebulisierung), elektrophoretisch aufgetrennt, elektroeluiert und aufgereinigt. Die Fragmente werden in pUC19 Vektorplasmide ligiert und in DA10B-*E. coli* Wirtszellen transformiert. 2700 Insert-tragende Klone werden anschließend auf Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell, BA85) übertragen (Koloniefilterhybridisierung; GRUNSTEIN & HOGNESS, 1975). Die Klone wurden mit radioaktiv markierten, synthetischen Oligonukleotidsonden ((CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (AAT)<sub>10</sub>, (AAG)<sub>10</sub>, (ATG)<sub>10</sub>, (GATA)<sub>6</sub>) nach typischen Mikrosatellitenmotiven gescreent. 55 Hybridisierungsklone werden zufällig ausgewählt, ihre Inserts mittels PCR amplifiziert und auf einem ABI 3730 Kapillarsequenzierer sequenziert. Für 27 mikrosatellitentragende Fragmente werden fluoreszenzmarkierte Primer designed. PCR-Reaktionen werden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit folgenden Reagenzien durchgeführt: 0.25 mM dNTPs, 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl; Invitrogen), 0.2 µM jedes Primers und 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen).

24 Fragmente können erfolgreich amplifiziert und mit einem ALF-Gelsequenzierer auf Variabilität getestet werden. Alle Loci werden an mindestens 12 Individuen getestet. Variable Loci werden anschließend genauer an je 24 in der Rhein-Neckar-Region gesammelten *C. riparius* und *C. piger*- Individuen auf ihre Eignung als artdiagnostische und populationsrelevante Marker hin getestet. Populationsgenetische Parameter (Heterozygotie,

Allele pro Locus, Hardy-Weinberg-Test) werden im Programm GENEPOP online version 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995) berechnet.

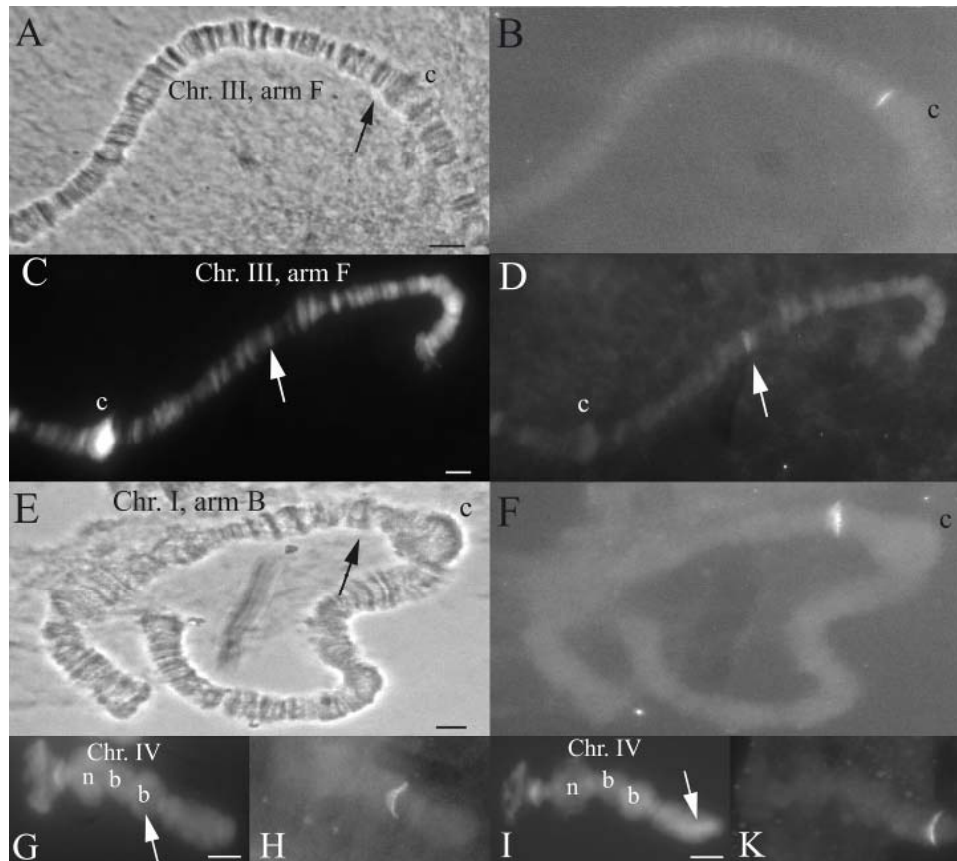
Zur Lokalisierung der Mikrosatelliten auf den Chromosomen werden in *situ*-Hybridisierungen nach HANKELN ET AL. (1988) und SCHMIDT ET AL. (1988) durchgeführt. Hierfür werden die Speicheldrüsenchromosomen von L4-Larven herauspräpariert, denaturiert und in 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M Na citrate)/0.5% SDS mit biotinmarkierten Sonden hybridisiert. Nach einem doppelten Waschschrift werden die Sonden durch einen standard-Anti-Biotin-Antikörpernachweis sichtbar gemacht. Die Positionen der Hybridisierungssignale werden mit Hilfe der Chromosomenkarte von HÄGELE (1970) bestimmt.

Fünf Loci zeigen Variabilität innerhalb oder zwischen den untersuchten Populationen (Tab.8). Die beobachtete Anzahl an Allelen pro Locus liegt zwischen 3 bis 10 (*C. riparius*) und 2 bis 13 (*C. piger*). Die Werte für die erwartete Heterozygotie schwanken je nach Locus zwischen 0,621 und 0,864 (*C. riparius*) und 0,041 bis 0.859 (*C. piger*). Ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht wird bei *C. riparius* zwischen den Loci MSC2 und MSC5 identifiziert (Fisher's exact test,  $p < 0.05$ ). Weiterhin kann bei drei (*C. riparius*) bzw. 2 (*C. piger*) Loci ein signifikantes Heterozygotendefizit festgestellt werden (Exact HW test; GUO & THOMPSON 1992), welches höchstwahrscheinlich durch Populations-Substrukturierung innerhalb des besammelten Gebietes zu erklären ist.

**Tabelle 8:** Wiederholungsmotive, Primersequenzen, Fragmentlängen, Allelanzahl (A), Beobachtete ( $H_O$ ) und Erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotie und GenBank „accession numbers“ der fünf Mikrosatellitenmarker für *C. riparius* and *C. piger* (in Klammern). Die populationsgenetischen Parameter basieren auf 24 Individuen pro Art, die in der Rhein-Neckar-Region gesammelt wurden. \* indiziert ein signifikantes ( $p < 0.05$ ) Heterozygotendefizit

Locus	Motiv	Primersequenz	Größe [bp]	A	$H_O/H_E$	Accession no.
MSC1	CA <sub>9</sub>	for: CAT CAT CCT TAA CAA CCC AC rev: CTA GCT TTG CAG GCG AGT GC	95-103 (96-100)	8 (4)	0.500/0.860* (0.291/0.328)	DQ408105
MSC2	(TAA) <sub>9</sub> , T <sub>10</sub>	for: AGA CTA ATG ACC AGA CTT GC rev: CTT GTG ATG CGA AAA GCC TG	114-141 (112-141)	8 (10)	0.750/0.864 (0.333/0.780*)	DQ408106
MSC3	(GT) <sub>14</sub> , T <sub>9</sub> , T <sub>6</sub>	for: ACT ACG CGT GCC TCA ACA GC rev: AGC TAA TTC TCA TGT TGG TC	168-176 (159-189)	7 (13)	0.583/0.758* (0.541/0.857*)	DQ408107
MSC4	(TCA) <sub>6</sub>	for: TGA CTG AAC TTC CGC AAT GGG rev: CCG AGA ATG CTG CGA TCC AG	211-216 (215-216)	3 (2)	0.458/0.621 (0.041/0.041)	DQ408108
MSC5	(CA) <sub>11</sub> , A <sub>9</sub>	for: AAC ATT TGA ACG CAC ATC G rev: ATT TGA TTG TAT GTC CTG	264-278 (269-290)	10 (13)	0.750/0.830* (0.666/0.859*)	DQ408109

Alle fünf Klone zeigen bei der in situ-Hybridisierung eindeutige, getrennte Signale (Abb. 7), womit ihr „single copy“-Status bewiesen ist. Die Marker sind über drei der vier *C. riparius*-Chromosomen verteilt, wobei 2 Loci (MSC2 und MSC4) nah beieinander auf dem Chromosom 4 liegen. Diese zeigen jedoch keine signifikante Kopplung, was durch die hohen Rekombinationsraten in der Nähe des Balbiani-Ringes erklärt werden kann.



**Abbildung 7:** In situ-Lokalisierung der Mikrosatellitensonden auf den Polytäanchromosomen von *C. riparius*. (MSC5, A und B; MSC3, C und D; MSC1, E und F; MSC2, G und H; MSC4, I und K). B, D, F, H und K zeigen die Signale der hybridisierten Sonden; A und E zeigen Phasenkontrast-Aufnahmen der jew. Chromosomen; C, G und I zeigen chromosomale Bandenmusternach DNA-Färbung mit DAPI. Die Pfeile zeigen die Positionen der Hybridisierungssignale. Centromere (c), Nucleoli (n) und Balbiani Ring Puffs (b) sind angedeutet. Maßstab = 10  $\mu$ m.

Die identifizierten Marker stellen geeignete Werkzeuge zur Untersuchung populationsgenetischer Muster bei *C. riparius* und seiner Schwesterart, *C. piger* dar. Sie können durch ihre Artspezifität an allen fünf Loci (Daten nicht gezeigt) sowohl zur Artunterscheidung, als auch zur Untersuchung der genetischen Differenzierung oder Hybridisierung zwischen den Arten eingesetzt werden. Die identifizierten Mikrosatelliten

dienen als geeignete Diversitätsmarker in den Multigenerationsstudien (Kapitel 6) sowie den Experimenten, die in den Kapiteln 7 und 8 beschrieben werden.

#### 4.1.3 Rückstandsanalytik

In dem verwendeten Quarzsand wird kein TBT nachgewiesen, dies gilt auch für die Metaboliten des Tributylzinn (Tab. 9). Für TBT sind die berechneten zeitlich gewichteten mittleren Testkonzentrationen deutlich niedriger als aufgrund der Nominalkonzentration erwartet wird, wobei nur 6% der eingesetzten Testkonzentration analytisch wiedergefunden werden (Tab. 9). 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 aufgenommenen Parameter wie z.B. Nitrit- und Nitratkonzentration des Testsystems sind in Anhang A nachzulesen.

**Tabelle 9:** Zeitlich gewichtete mittlere Testkonzentrationen für das TBT- und Cd-Vorexperiment (LMK – Lösemittelkontrolle) nach der OECD Guideline 211 (OECD, 1998). Die Rückstandsanalysen wurden entsprechend der DIN-Norm 19744 (DIN, 2003) 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

## 4.2 Laborexperimente

### 4.2.1 Multigenerationsstudien (MGS)

Bei den Multigenerationsstudien (MGS) werden Life-Cycle Experimente ähnlich wie im Vorexperiment mit Cd ausgeführt. Insgesamt werden drei MGS durchgeführt, wobei drei verschiedene TBT-Nominalkonzentrationen sowie leicht modifizierte Testdesigns eingesetzt werden (Tab. 10 & Abb. 8).

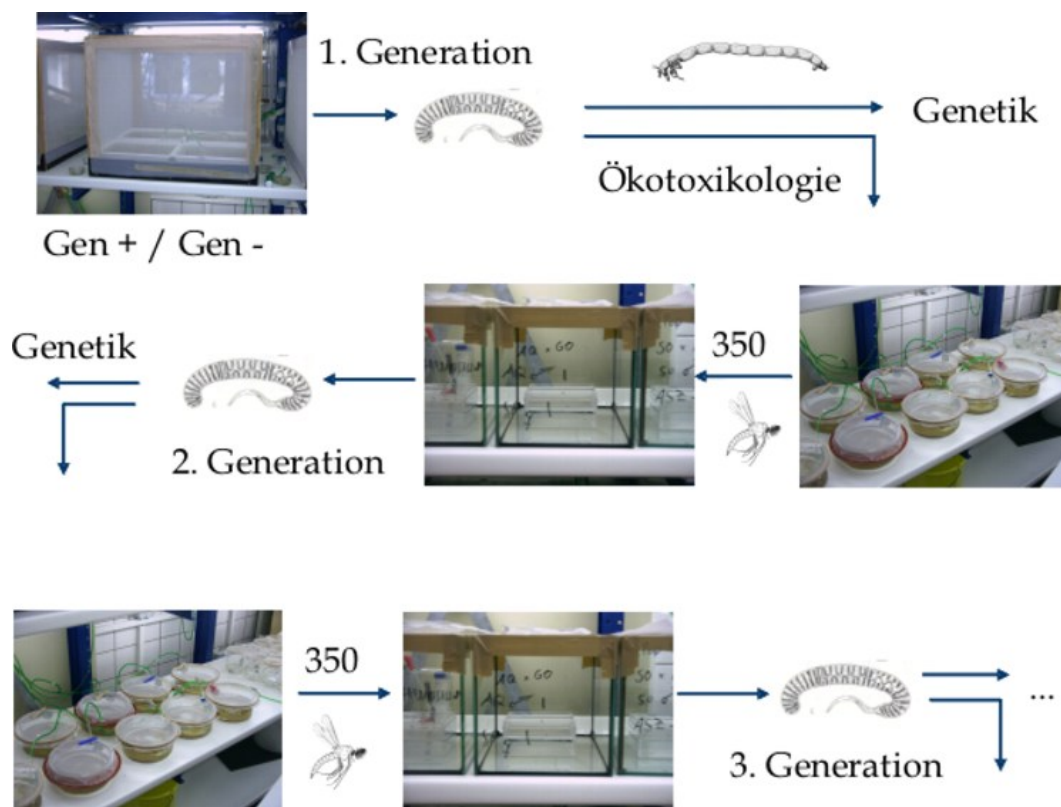
**Tabelle 10:** Experimentelle Parameter der Multigenerationsstudien (MGS); GEN+ Mischpopulation, GEN- Frankfurter Laborpopulation; Index <sup>1</sup> Anzahl an Gelegen, aus denen die erste Generation der Studie angesetzt wurde; Index <sup>2</sup> Anzahl an durchgeführten Generationen; Index <sup>3</sup> Abweichungen in der zweiten Generation für GEN-LMK 9, in der dritten bzw. vierten Generation für GEN-TBT 6 bzw. 8 Schalen; Index <sup>4</sup> Anzahl an Individuen, welche pro Generation eingesetzt wurden; Index <sup>5</sup> Anzahl an Aquarien, in denen die Larven für die genetische Analysen gezüchtet wurden; Index <sup>6</sup> Haupteiblagerperiode aus der die Gelege für die nächste Generation entnommen wurden; Index <sup>7</sup> Ermittlung des Trockengewichts (TG) der toten Imagines.

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 <sup>1</sup>	31 GEN+	56 GEN+	64 GEN+
	18 GEN-	74 GEN-	79 GEN-
Experiment mit Gelegen aus	GEN+ und GEN-	GEN+LMK & GEN-LMK nach MGS I	GEN+LMK I/II und GEN-LMK I/II (jeweils Mischung) nach der MGS II
Generationen <sup>2</sup>	11	2	12 GEN+/4 GEN-
Anzahl Replikate	1	2	2
Bezeichnungen der Behandlungsgruppen	GEN+LMK, GEN-LMK	GEN+LMK I/II, GEN-LMK I/II	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
Schalen pro Replikat <sup>3</sup>	10	7	7
N <sub>Individuen</sub> <sup>4</sup>	500	350	350
Genetikansätze <sup>5</sup>	2 pro Replikat	1 pro Replikat	1 pro Replikat
Gelegeperiode <sup>6</sup>	4 Tage	3 Tage	3 Tage
TG ermittelt <sup>7</sup>	ja	nein	nein

Bei den MGS werden 2 L Kristallisierschalen (Schott & Duran, Ø 190 mm) als Testgefäße verwendet. Diese werden einen Tag vor Versuchsbeginn mit 100 g gespikten Quarzsand sowie mit 1 L Vorratswasser befüllt. Die Testgefäße werden belüftet und mit einer Gazeabdeckung versehen. Die MGS werden aus unterschiedlichen Anzahlen an Gelegen aus der Mischpopulation (GEN+) sowie aus der Frankfurter Laborpopulation (GEN-) angesetzt.

Wie im Vorexperiment mit Cd werden in den Kristallisierschalen jeweils 50 Tiere eingesetzt. So wird ein populationsrelevantes *experimental design* gewährleistet.

Pro Behandlungsgruppe werden jeweils zehn (MGS I) bzw. sieben (MGS II/III) Kristallisierschalen angesetzt. Da in manchen Generationen der MGS I nicht genügend Gelege produziert werden, kann teilweise nicht die volle Anzahl an Kristallisierschalen angesetzt werden (Tab. 10). Der Zeitpunkt des Einsetzens wird auch in diesen Experimenten als Tag 0 definiert. Die Belüftung wird ebenfalls zu Beginn des Experimentes für 24 h abgestellt. Die Fütterung der Larven erfolgt analog dem Vorexperiment. Außerdem werden alle Endpunkte wie im Vorexperiment aufgenommen. Um eine zeitliche Divergenz des Versuchsansatzes zu vermeiden, werden nur die Gelege, welche an den vier (bzw. drei) Versuchstagen mit der höchsten Eiablage produziert werden, für die nächste Generation verwendet. Die aus diesen Gelegen geschlüpften Larven werden analog dem Versuchsbeginn in die nächste Generation überführt.



**Abbildung 8:** Fließbildschema der Multigenerationsexperimente mit *C. riparius*. Dargestellt ist beispielhaft die Durchführung der ersten drei Generationen der MGS III (in diesem Falle wurden jeweils 350 Tiere für den Start der nächste Generation ausgewählt).

Am Ende der jeweiligen Generation werden nur in der MGS I die toten Imagines auf deren Trockengewicht untersucht. Als TBT-Nominalkonzentrationen werden 80; 120 und 160  $\mu\text{g}$

Sn/kg TG ausgewählt. Zusätzlich wird jeweils eine Lösemittelkontrolle mit Ethanol mitgeführt. Die Testsubstanz wird zu Beginn des Experimentes wie im Vorexperiment auf das Sediment aufgebracht. Außerdem werden die Parameter pH-Wert und Leitfähigkeit zu Anfang und zum Ende der jeweiligen Generationen aufgenommen. Auftretende Verdunstungsverluste werden ähnlich wie im Vorexperiment durch zusätzliche Vorratswasserzugabe kompensiert.

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

In der vierten Generation der TBT-Population der MGS I kommt es fast zu einem Totalausfall, wobei eine Larvalmortalität von 96% festgestellt wird. Ein ähnliches Problem tritt in der 10. Generation der MGS III in beiden TBT-Replikaten auf. Diese jeweiligen Generationen stehen nicht mehr für die Gründung der darauf folgenden Generation zu Verfügung. Um die Multigenerationsstudien trotzdem weiterführen zu können, werden deshalb Gelege aus den gleichen vorbelasteten Populationen entnommen, welche allerdings im Rahmen von Nebenexperimenten über den Zeitraum von einer Generation unter Kontrollbedingungen gehalten werden. So wird 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. In der MGS III verhält es sich analog. Dabei werden die jeweiligen TBT-Replikate 9 Generationen gegenüber TBT exponiert, die darauf folgende Generation nur unter Lösemittelbedingungen gehalten und anschließend wieder zwei Generationen unter TBT-Stress.

#### 4.2.1.1 MGS I

##### *Rückstandsanalytik*

Nach einer Dauer von einer Stunde wird bei dem gewählten Testdesign (50 Tiere, 1 L rekonstituiertes Wasser, Futter etc.) eine Konzentration von 8,7 µg Sn/kg TG analytisch nachgewiesen (Tab. 11). Zu diesem Zeitpunkt waren keine TBT-Metaboliten im Testsystem messbar. Ein geringfügig höherer Wert wird nach einer Testdauer von 72 h mit 10,0 µg Sn/kg

TG gemessen. Vor dem Schlupf der Imagines (336 h) verringert sich die TBT-Konzentration auf ca. 40%, wobei 4,1 µg Sn/kg TG gemessen werden. Neben TBT können außerdem für die Messungen nach 72 und 336 h zwei TBT-Abbauprodukte, Di- und Monobutylzinn, in niedrigen µg/kg-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die mittlere zeitlich gewichtete Konzentration wird mit einem Wert von 4,5 µg Sn/kg TG nach der OECD Guideline 211 (OECD, 1998) berechnet.

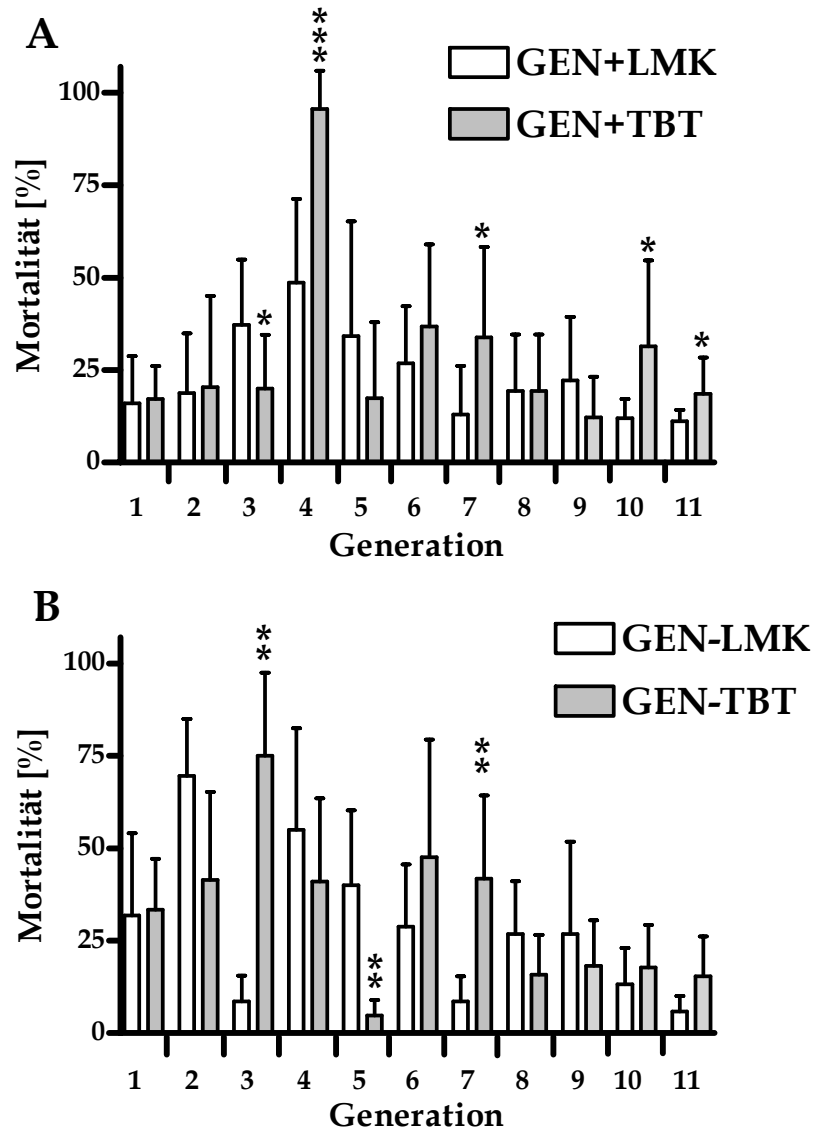
**Tabelle 11:** Ergebnisse der Rückstandsanalytik für den Quarzsand und die Organozinnverbindungen (Mono-, Di- und Tributylzinn) der TBT-Behandlungen nach einer Testdauer von 1, 72 und 336 h in der Multigenerationsstudie (dargestellt als Konzentration der Verbindung und als Sn/kg TG). Die eingesetzte Nominalkonzentration ist 80 µg als Sn bzw. 195 µg als TBT/kg TG. Die Rückstandsanalysen werden in Anlehnung an die DIN-Norm 19744 (DIN, 2003) durchgeführt (Nachweisgrenze < 1 µg OZV/kg TG).

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

### *Mortalität*

Aus Abbildung 9 wird deutlich, dass die Mortalität in allen vier Behandlungsgruppen stark schwankt, wobei die Schwankungen bei den beiden GEN-Gruppen stärker ist. In der GEN+LMK werden Mortalitäten zwischen 11% und 48% beobachtet. Ähnliche Schwankungen werden auch bei der GEN+TBT beobachtet. In dieser Population liegen die Mortalitäten zwischen 12% und 37%, mit Ausnahme der vierten Generation. In dieser Generation wird eine unerklärlich hohe Mortalität von 96% ermittelt und die Fortführung der Multigenerationsstudie kann nur durch die Absicherungspopulation gewährleistet werden. Bei der GEN-LMK schwanken die Mortalitäten 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. Somit werden über die gesamte Studie hinweg keine akuten Toxizitäten der Testsubstanz auf beide Populationen bei der gewählten Konzentration beobachtet.



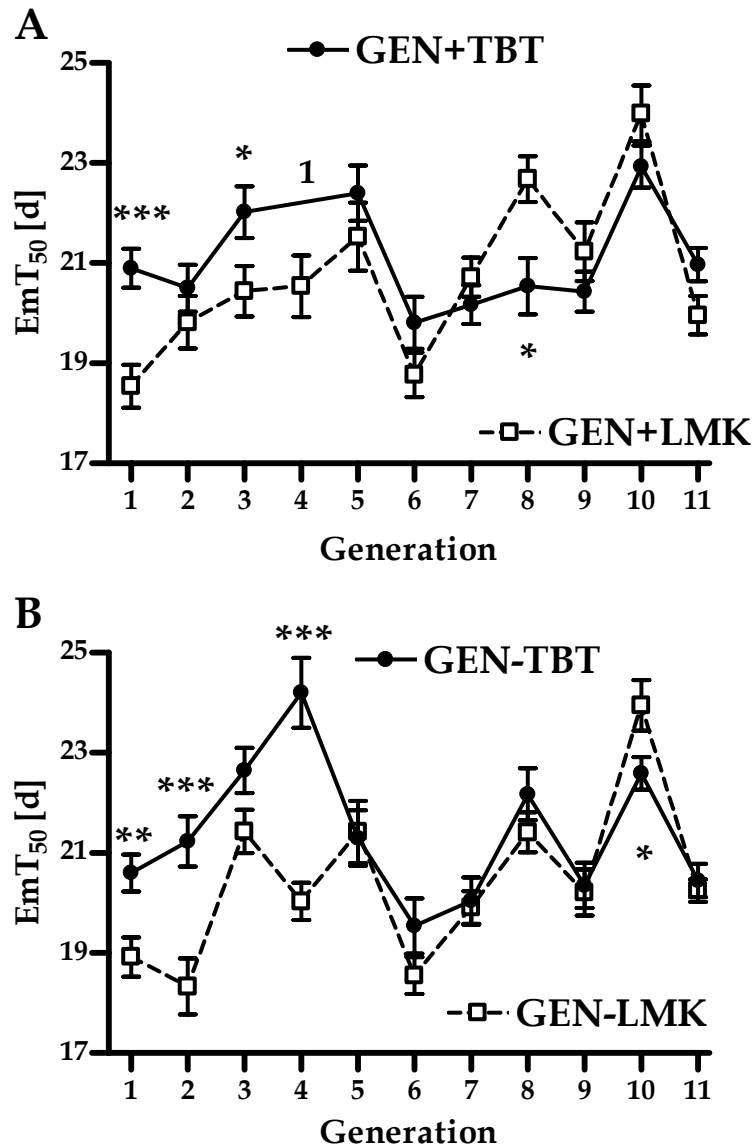


**Abbildung 9:** MGS I mit *Chironomus riparius*. Mortalität (MW  $\pm$  SD, in %) der Mischpopulation (GEN+) (**A**) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (**B**) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 4,46  $\mu\text{g Sn/kg TG}$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels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

Signifikant erhöhte Mortalitäten im Vergleich zur LMK werden bei GEN+TBT in den Generationen vier, sieben, zehn und elf festgestellt (t-Test,  $p < 0,05$ ), während im Gegensatz dazu die Mortalität der GEN+LMK in der dritten Generation signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) höher ist als in der TBT-Behandlung. Für GEN- sind signifikant erhöhte Mortalitäten in den Generationen drei und sieben der TBT-Exposition im Vergleich zur LMK festzustellen (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ähnlich wie bei GEN+ wird auch in einer Generation (fünf) eine signifikant (t-Test,  $p < 0,01$ ) niedrigere Mortalität bei TBT-Exposition im Vergleich zur LMK festgestellt.

*EmT<sub>50</sub> und Weibchenanteil*

TBT verzögert den mittleren Emergenzzeitpunkt der Tiere in beiden Populationen (GEN+/GEN-) bis zur vierten Generationen, wobei signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) verspätete mittlere Schlupfzeitpunkte in den Generationen eins und drei bei der GEN+Population und in den Generationen eins, zwei und vier bei der GEN-Population ermittelt werden (Abb. 10).



**Abbildung 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 wurden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt ( $\star p < 0,05$ ,  $\star\star p < 0,01$ ,  $\star\star\star p < 0,001$ ,  $n = 6-10$ ). Index <sup>1</sup>  $EmT_{50}$  nicht kalkulierbar aufgrund von zu hoher Mortalität ( $> 80\%$ ).

Ab der fünften Generation wird der verzögernde Effekte auf den Schlupf der Tiere in beiden Populationen nicht mehr beobachtet und die Imagines der TBT-Behandlung schlüpfen sogar in der achten (GEN+TBT) sowie in der zehnten (GEN-TBT) Generation signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) früher als die Tiere der LMK.

Weiterhin können in der MGS I, wie bereits im Vorexperiment ermittelt, keine signifikanten (Fishers Exact Test,  $p > 0,05$ ) Unterschiede des Weibchenanteils festgestellt werden. Dieser Parameter schwankt für beide Behandlungsgruppen der GEN+Population stets zwischen 0,44 und 0,53. Für die GEN-Population werden Werte zwischen 0,36 und 0,58 festgestellt. Bei der Betrachtung des mittleren Weibchenanteils ( $\pm$  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 0,51 ( $\pm$  0,03, GEN-LMK) und 0,47 ( $\pm$  0,07, GEN-TBT).

### *Reproduktion*

Die Anzahl an Gelegen pro Weibchen schwankt über alle Generationen der GEN+Population bei GEN+LMK zwischen 0,76 und 1,26 (Tab. 12) und bei GEN+TBT zwischen 0,75 und 1,35. In der 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 insbesondere in den ersten Generationen niedrige Gelegezahlen pro Weibchen in beiden Behandlungen beobachtet werden.

In Tabelle 12 wird weiterhin deutlich, dass die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen in der GEN+LMK zwischen 0,62 und 1,22 variiert. 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 der GEN-TBT Behandlungsgruppe weisen im Allgemeinen einen deutlich niedrigeren Schwankungsbereich zwischen 0,01 und 0,70. Auch hier ist besonders die niedrige Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen in den ersten Generationen zu erwähnen.

Bei der GEN+Population werden mittlere Furchtbarkeiten ( $\pm$  SD) über alle Generationen von 84% ( $\pm$  5,3%, GEN+LMK) und von 85% ( $\pm$  9,3%, GEN+TBT) festgestellt. Bei GEN- ist die Fertilität der Gelege im allgemeinen deutlich niedriger als in der GEN+, wobei Mittelwerte über alle Generationen von 75% ( $\pm$  19,2%) für die Kontrollen und 44% ( $\pm$  22,6%) für die TBT-belasteten Ansätze berechnet werden. Weiterhin kann festgestellt werden, dass der

Anteil an fertilen Gelegen an den gesamt produzierten Gelegen bei der GEN+ am höchsten in der ersten Generation ist, sowohl bei der LMK, als auch bei TBT-Exposition. In den folgenden Generationen nimmt der Anteil stets ab. Für GEN+TBT werden allerdings in den späteren Generationen wieder hohe Anteile an fertilen Gelegen an den gesamt produzierten Gelegen mit mehr als 90% beobachtet (Generationen sieben, neun und elf). Bei GEN- verhält sich dieser Zusammenhang umgekehrt, wobei in den ersten Generationen in beiden Behandlungsgruppen niedrige Werte festgestellt werden. Im Verlauf des Experimentes stabilisieren sich die Anzahlen an fertilen Gelegen pro Weibchen auf einem hohen Niveau.

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

**Tabelle 12:** Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung der jeweiligen Populationen (GEN+ Mischpopulation, GEN- Laborzuchtpopulation) in der MGS I.

Generation/Behandlung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Gelege pro Weibchen (gesamt)</b>											
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
<b>fertile Gelege pro Weibchen</b>											
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 in der GEN+LMK zwischen 432 und 533 und bei GEN+TBT zwischen 450 und 600 (Daten nicht dargestellt). Signifikant größere Gelege werden in den Generationen zwei, acht, neun und zehn festgestellt (U-Test,  $p < 0,05$ ), 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, wobei nur die Größe der fertilen Gelege für die Auswertung herangezogen wird. In den genannten Generationen legen die Weibchen der TBT-Behandlung signifikant größere, fertile Gelege als in der LMK (U-Test,  $p < 0,05$ ).

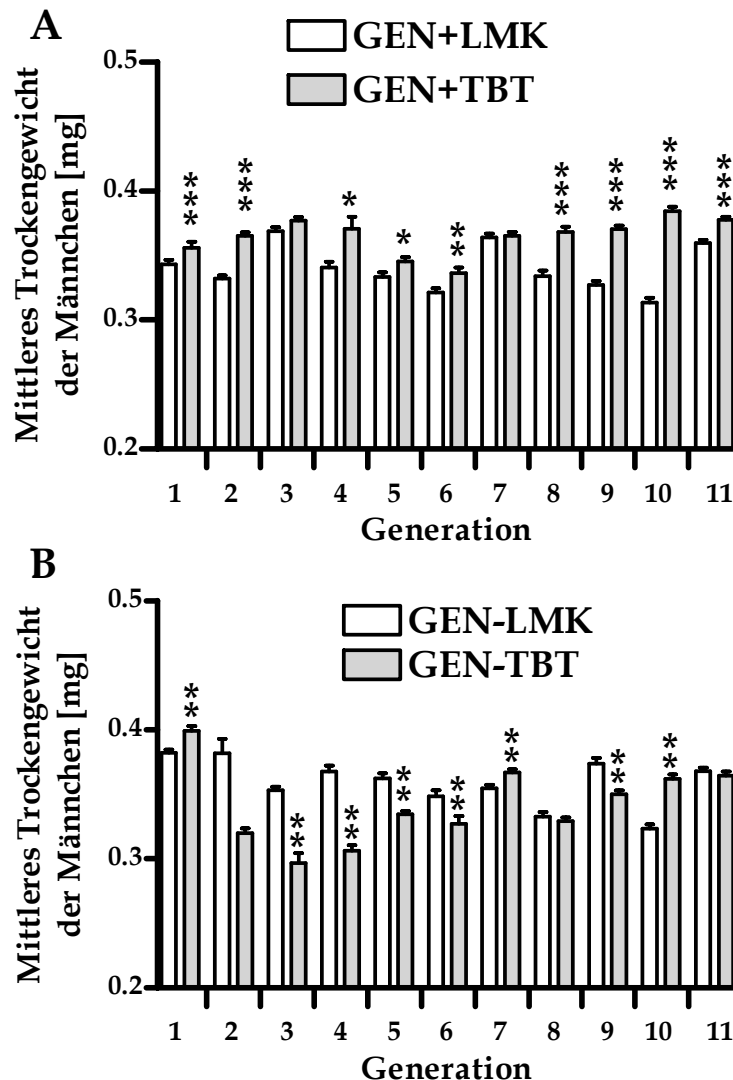
Für die GEN-Population werden ähnliche Schwankungen der medianen Gelegegrößen für GEN-LMK zwischen 406 und 592 und für GEN-TBT zwischen 364 und 525 festgestellt (Daten ebenfalls nicht dargestellt). In der ersten Generation weist die GEN-Population ein ähnliches Bild wie die GEN+Population auf, da die Gelege der GEN-TBT Behandlungsgruppe signifikant (U-Test,  $p < 0,05$ ) größer sind, als jene der 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 kleiner sind als in der GEN-LMK (U-Test,  $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse für die kleineren Gelegegrößen werden bestätigt, sobald nur die fertilen Gelege bei der Auswertung berücksichtigt werden.

#### *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). Weiterhin können deutliche TBT-Effekte bei diesen Parameter beobachtet werden, so führt die TBT-Belastung in acht der elf Generation zu einem signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) höheren Trockengewicht der Männchen im Vergleich zu GEN+LMK. Betrachtet man das mittlere Trockengewicht der Männchen über alle Generationen, so sind die Tiere in der GEN+LMK ( $0,34 \pm 0,001$  mg) signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ) leichter als die Tiere der GEN+TBT Behandlungsgruppe ( $0,37 \pm 0,001$  mg). Die Weibchen der GEN+Population weisen diesen TBT-Effekt nicht im selben Umfang wie die Männchen auf, allerdings können in sechs der elf Generation (zwei, drei, fünf, acht, neun und zehn) signifikant (U-Test,  $p < 0,05$ ) schwerere Trockengewichte ermittelt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). In den anderen Generationen kann kein Einfluss von TBT auf das Trockengewicht der Weibchen festgestellt werden.

Für die Männchen der GEN-Population werden ähnliche mittlere Trockengewichte wie bei der GEN+Population festgestellt, wobei die Effekte der TBT-Exposition nicht so homogen wie in der GEN+Population sind (Abb. 11B). Signifikant schwerere Männchen werden bei GEN-TBT in drei Generationen (eins, sieben und neun) im Vergleich zu GEN-LMK festgestellt (t-Test,  $p < 0,01$ ). Ein konträres Bild ergibt sich in den Generationen drei, vier, fünf, sechs und neun, wobei die Männchen der GEN-TBT signifikant leichter sind, als die der GEN-LMK (t-Test,  $p < 0,01$ ). Für die GEN-Population kann festgestellt werden, dass diese Männchen bei TBT-Belastung im Mittel über alle Generationen signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ) leichter sind als die Männchen der GEN-LMK Behandlungsgruppe (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 (U-Test,  $p < 0,05$ ) schwerer, als die Weibchen der Kontrollgruppe.

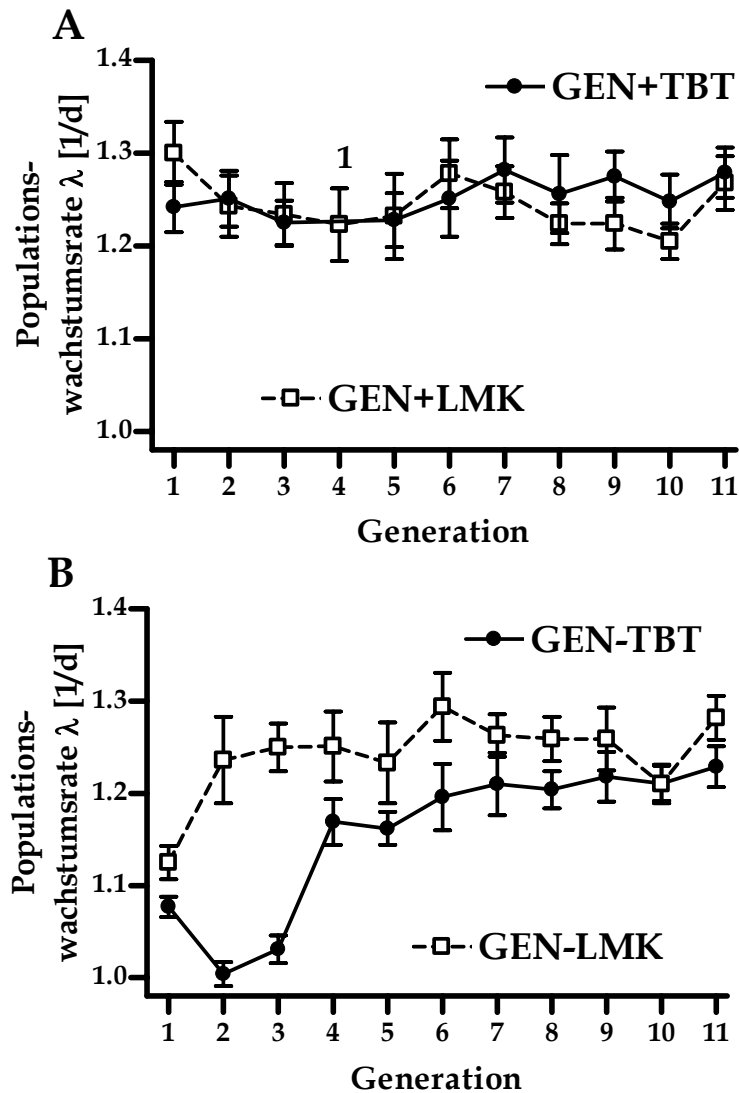


**Abbildung 11:** *Chironomus riparius*. Trockengewicht (MW  $\pm$  SD, in mg) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von  $4,46 \mu\text{g Sn/kg TG}$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test zwischen 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  $1,31 \text{ d}^{-1}$  für beide GEN+Populationen ermittelt (Abb. 12A), wobei die PWR in den jeweiligen Generationen zwischen den beiden Behandlungsgruppen ähnlich sind. Für TBT wird anhand der PWR nur in der ersten Generation ein Einfluss auf die Entwicklung und Reproduktion erkennbar, da in dieser Generation die GEN+LMK eine höheren PWR mit  $1,29 \text{ d}^{-1}$  im Vergleich zu GEN+TBT mit

1,26 d<sup>-1</sup> 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 in der GEN+TBT größer sind als in der GEN+LMK. In der letzten Generation sind die PWR der beiden Behandlungsgruppen wieder annähernd gleich.



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

Im Vergleich dazu weist die GEN-Population besonders in der ersten Generation sehr niedrige PWR mit 1,12 d<sup>-1</sup> für GEN-LMK und 1,09 d<sup>-1</sup> für GEN-TBT (Abb. 12B). Im Verlauf des Experimentes fällt die PWR für die GEN-TBT sogar in der zweiten Generation fast unter den kritischen Wert von 1,0 d<sup>-1</sup> mit 1,004 d<sup>-1</sup>, während die GEN-LMK kontinuierlich höhere

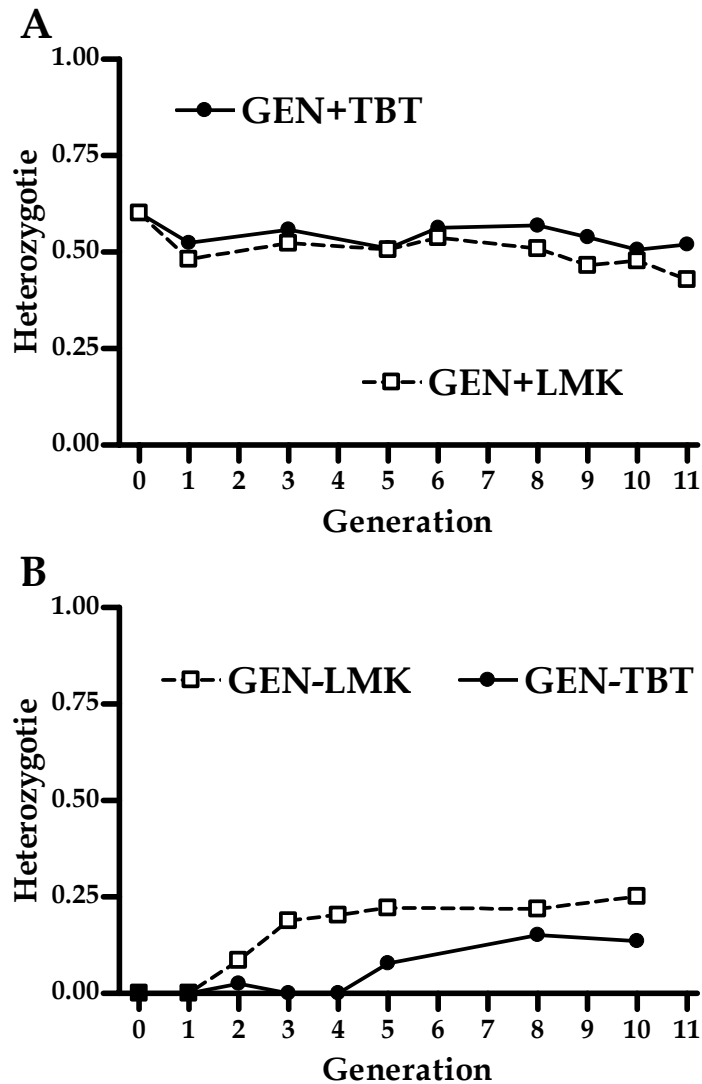
PWR bis zur Generation vier erreicht. Die GEN-TBT Population erholt sich nach der zweiten Generation und zwischen der dritten und vierten Generation steigt sie sprunghaft an. Im weiteren Experiment liegen die PWR der GEN-TBT stets unter denen der GEN-LMK, mit Ausnahme der zehnten Generation.

### *Genetische Analysen*

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

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





**Abbildung 13:** *Chironomus riparius*. 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 (LMK – Lösemittelkontrolle).

Weiterhin werden signifikante ( $X^2$ -Test,  $p < 0,05$ ) Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG) bei der GEN+Population an allen fünf untersuchten Genorten festgestellt (Tab. 13). Während nur ein signifikanter Unterschied ( $X^2$ -Test,  $p < 0,05$ ) in der GEN+LMK (Lokus 1 in der achten Generation) ermittelt wird, werden bei GEN+TBT zehn signifikante ( $X^2$ -Test,  $p < 0,05$ ) 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.

**Tabelle 13:** *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. Signifikante Abweichungen wurden mittels  $X^2$ -Test bestimmt ( $\star p < 0,05$ ;  $\star\star p < 0,01$ ;  $\star\star\star p < 0,001$ ).

Generation	Behandlung	Mikrosatellitenloci				
		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 zur GEN+Population werden bei der GEN-Population signifikante Abweichungen vom HWG nur am fünften Locus ermittelt (Tab. 14). So ist wird in der achten Generation bei GEN-LMK und in der zehnten Generation bei GEN-TBT eine signifikante ( $X^2$ -Test,  $p < 0,05$ ) Abweichung vom HWG berechnet. Außerdem kann festgestellt werden, dass sowohl bei GEN-LMK als auch bei GEN-TBT der zweite und vierte Mikrosatellitenlocus fast ausschließlich homozygot auftreten und die ermittelte genetische Variabilität, besonders in den späteren Generationen, sich auf den ersten, dritten und fünften Mikrosatellitenmarker beschränkt.

**Tabelle 14:** *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie und Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht der fünf Mikrosatellitenorte für die Laborzuchtpopulation (GEN-) der Lösemittelkontrolle (LMK) und TBT-Behandlung in der Multigenerationsstudie I. Signifikante Abweichungen wurden mittels  $\chi^2$ -Test bestimmt (★  $p < 0,05$ ).

Generation	Behandlung	Mikrosatellitenloci				
		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 ★
	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 ★

Innerhalb der Life-Cycle Parameter kann eine große Schwankungsbreite festgestellt werden. Dieses trifft für beide Population (GEN+/GEN-) als auch für beide Behandlungsgruppen (LMK/TBT) zu. Beispielsweise ist die Mortalität bei GEN+TBT in vier Generationen signifikant gegenüber der GEN+LMK (vgl. Abb. 9A) erhöht. Allerdings kann auch in einer Generation ein genau umgekehrter Effekt mit einer signifikant niedrigeren Mortalität bei GEN+TBT als in der Lösemittelkontrolle festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse werden auch bei der GEN-Population beobachtet, wobei in zwei Generationen die Mortalität bei TBT-Exposition signifikant erhöht und in einer Generation signifikant erniedrigt ist (vgl. Abb. 9B). Neben den großen Variabilitäten der Mortalitäten konnten auch ähnliche Schwankungen auf den mittleren Emergenzzeitpunkt festgestellt werden (vgl. Abb. 10A,B). Auffällig ist allerdings bei beiden Populationen, dass besonders in den ersten Generationen die mittleren Schlupfzeitpunkte bei TBT-Exposition signifikant verzögert sind. Ab der fünften Generation ist dieses Phänomen nicht mehr zu beobachten und die Tiere schlüpfen bei GEN+ in den Generation fünf bis sieben und bei GEN- in den weiteren Generationen annähernd zum selben

Zeitpunkt. Bei der GEN+Population ist festzustellen, dass sich die verzögernde Wirkung der TBT-Exposition umkehrt und die Tiere sogar eher schlüpfen, als in der GEN+LMK.

Ähnlich variable Muster können auch für den  $EmT_{50}$  innerhalb der MGS festgestellt werden. Während allerdings für die Variation der Mortalität und der  $EmT_{50}$  über die jeweiligen Generationen keine erkennbaren Muster festgestellt werden können, werden signifikant größere Gelege nur in den Generationen sieben bis 10 festgestellt. Es kann vermutet werden, dass dieses eine Reaktion der exponierten Population auf den TBT-Stress ist. Im Gegensatz dazu zeigt der Parameter der *Trockengewichte - Männchen* einen konstanten TBT-Effekt innerhalb der MGS, wobei in allen Generationen, mit zwei Ausnahmen, stets signifikant schwerere Männchen im Vergleich zur GEN+LMK ermittelt werden. Das Phänomen von erhöhten Trockengewichten wird auch in Studien mit Chironomiden, welche an die Stressoren Cypermethrin (HOPPER ET AL., 2003) und Cadmium (MCCAHOON & PASCOE, 1991) exponiert wurden, festgestellt und scheint eine mögliche Reaktion auf chemischen Stress zu sein. Erhöhte Trockengewichte der Weibchen werden nur in zwei Generationen ermittelt (drei und zehn) und dieses kann auf die große Variation innerhalb des Datensatzes, verursacht durch die Eiablage der Weibchen, zurückgeführt werden.

Obwohl die Variation in einigen Endpunkten zwischen den einzelnen Schalen und den beiden Behandlungsgruppen groß ist, kann eine genaue Betrachtung des zeitlichen Verlaufes deutliche Hinweise auf eine Veränderung der Life-History-Parameter als eine mögliche Stressreaktion gegenüber TBT festgestellt werden. In der ersten Generation des Experimentes wird eine deutlich niedrigere Populationswachstumsrate bei GEN+TBT im Vergleich zu GEN+LMK berechnet. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Vorstudie mit TBT überein (VOGT ET AL., 2007a). Nach weiteren fünf Generationen, bei denen die PWR der GEN+LMK und der GEN+TBT annähernd gleich sind, erhöht sich die PWR in der GEN+TBT absolut als auch relativ zur GEN+LMK. Diese Zunahme der PWR ist zum größten Teil auf die Erhöhung der Reproduktion zurückzuführen. Sowohl die Anzahl an gesamten als auch an fertilen Gelegen pro Weibchen erhöht sich deutlich in den letzten Generationen der MGS. Obwohl in den letzten beiden Generationen die Larvalmortalität erhöht ist, produzieren die geschlüpften Weibchen relativ mehr und größere Gelege im Vergleich zu den ersten Generationen. Außerdem werden in den letzten Generationen größere Gelege bei TBT-Exposition produziert. Ähnliche Ergebnisse können auch durch RISTOLA und Mitarbeiter (2001) bestätigt werden. Dabei weist eine über drei Generationen an 2,4,5-Trichlorophenol exponierte *C. riparius* Population einen höheren reproduktiven *output* auf, als die dazugehörige Kontrollpopulation. Ähnliche Effekte von sich verändernden Life-Cycle-

Parametern unter Schadstoffstress werden in einer Multigenerationsstudie mit Cadmium von POSTMA und DAVIDS (1995) festgestellt. In diesen Experimenten erniedrigt sich die Anzahl an Eiern pro Gelege bei relativ geringen Cadmiumkonzentrationen (54,2 und 159,6 nM) in den ersten Generationen, während im Vergleich dazu nach sechs Generationen deutlich größere Gelege als in den ersten Generationen festgestellt werden. Es kann deshalb angenommen werden, dass Chironomiden in der Lage sind, den Lebenszyklus hin zu einem größeren reproduktiven *output* hin zu verschieben. Dieses scheint eine generelle Stressreaktion zu sein mit dem Ziel das Aussterberisiko für die exponierte Population zu verringern.

Die Veränderung des Lebenszyklus der GEN+TBT über den Verlauf der MGS kann außerdem als ein deutlicher Hinweis für eine genetische Anpassung an Umweltstress interpretiert werden. Weitere Hinweise für diese These liefern die Ergebnisse der Akutexperimente in den Generationen 3, 5, 8, 9 und 10 (vgl. Tab. 18). So können in den letzten Generationen der MGS deutlich niedrigere Sensitivitäten der TBT-vorexponierten Population gegenüber dem Stressor TBT ermittelt werden. Die LC<sub>50</sub>-Werte in der neunten und zehnten Generation sind signifikant ( $p < 0,001$ ) höher bei GEN+TBT als in der GEN+LMK. Beide Effekte (erhöhte reproduktive Leistung und geringere TBT-Empfindlichkeit) der L1-Larven können möglicherweise durch eine genetische Anpassung und durch maternale Effekte (physiologische Anpassung) erklärt werden. Das auch die physiologische Anpassung eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Toleranz gegenüber Stressoren spielen kann, wurde für *C. riparius* bereits in zahlreichen Studien gezeigt (GILLIS ET AL., 2002; LEE ET AL., 2006). Allerdings hätten für die genaue Unterscheidung von genetischen und physiologischen Anpassungen weitere Experimente bezüglich der Vererbbarkeit durchgeführt werden müssen. Da allerdings bei solch geringen Konzentrationen nicht unbedingt mit Anpassungseffekten gerechnet wurde, wurden in die MGS keine Experimente hinsichtlich einer vollständigen Beantwortung der Fragestellung integriert. Allerdings können die Anpassungen an den Stressor TBT erst in den späteren Generationen beobachtet werden und maternale Effekte scheinen nicht für die geringere Sensitivität gegenüber TBT verantwortlich zu sein, da diese bereits nach einer Generation induziert werden sollten.

Bei der Betrachtung der genetischen Diversität kann festgestellt werden, dass diese bei einer chronischen TBT-Exposition über zahlreiche Generationen gegenüber der TBT-Nominalkonzentration von 80 µg Sn/kg TG nicht gefährdet ist. Es werden ähnliche Heterozygotien für die GEN+LMK und für GEN+TBT ermittelt (vgl. Abb 12A). Während in der GEN+LMK ein deutlicher Trend beobachtet werden, wobei die genetische Diversität von

Generation zu Generation langsam abfällt, ist dieses Phänomen im Gegensatz dazu in der GEN+TBT nicht zu beobachten. Bei der Berechnung der genetischen Drift kann festgestellt werden, dass die Veränderung der genetischen Diversität über die jeweiligen Generationen sich stets in diesem Intervall befindet. Somit sind die Veränderungen durch natürliche genetische Drift zu erklären. Anhand dieser Berechnungen erfolgt die Verminderung der genetischen Diversität auch nicht aufgrund des höheren Reproduktionserfolges oder der ähnlichen Populationsgrößen in beiden Behandlungsgruppen.

Obwohl die genetische Diversität der GEN+Population relativ konstant über die Generationen war, konnten zahlreiche Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG) bei GEN+TBT festgestellt werden. Abweichungen vom HWG werden dabei in allen untersuchten Generationen mit Ausnahme der zehnten Generation beobachtet. Allerdings kann für den fünften Mikrosatellitenloкус nur in der ersten Generation ein signifikanter Unterschied aufgenommen werden. Bei der GEN+LMK wird nur in der achten Generation eine signifikante Abweichung vom HWG am ersten Mikrosatellitenloкус beobachtet. Mit Ausnahme der ersten Generation, in welcher die Abweichungen vom HWG wahrscheinlich durch eine unvollständige Durchmischung der GEN+Population zu erklären sind, akkumulieren die Abweichungen in den späteren Generationen an den Mikrosatellitenorten eins und zwei. Da die Populationsgrößen in beiden Behandlungsgruppen annähernd gleich waren, können die Abweichungen vom HWG nicht mit diesem Parameter erklärt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die Abweichungen vom HWG durch Selektionsprozesse zu erklären. Obwohl Mikrosatellitenmarker als neutrale Marker entwickelt wurden, können sie möglicherweise eng mit nicht-selektionsneutralen DNA-Abschnitten verbunden sein und somit ebenfalls durch Selektionsprozesse beeinflusst werden (SELKOE & TOONEN, 2006).

In der Multigenerationsstudie I gibt es starke Hinweise für Anpassungsprozesse gegenüber dem Stressor TBT. Sowohl die L1-Larven zeigen geringere Sensitivitäten gegenüber dem Stressor TBT in den Generationen neun und zehn, als auch der Reproduktionserfolg der Weibchen ist in den letzten Generationen deutlich erhöht. Außerdem werden in zahlreichen Generationen Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ermittelt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass auch niedrige Konzentrationen, welche in Life-Cycle Experimenten zu keinen deutlichen Effekten führen, die Fitness und genetische Diversität von exponierten Populationen beeinflussen können. Außerdem sind die tatsächlichen Konzentrationen erheblich niedriger als die Nominalkonzentrationen und stimmen mit

umweltrelevanten TBT-Konzentrationen über ein (ARAMBARRI ET AL., 2003; BHOSLE ET AL., 2004; BURTON ET AL., 2005).

### *Anpassungsexperimente*

Die Akuttests zeigen annähernd gleiche  $LC_{50}$ -Werte für beide GEN+Behandlungen in den Generationen drei, fünf und acht (Tab. 15), wobei die  $LC_{50}$ -Werte zwischen 14,5 und 26,1  $\mu\text{g Sn/L}$  in der GEN+LMK und zwischen 15,1 und 21,3  $\mu\text{g Sn/L}$  in der TBT-Behandlung liegen. 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, welche aus der vorbelasteten Behandlungsgruppe (GEN+TBT) stammen weniger sensitiv gegenüber dem Stressor 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 die GEN-Population werden ähnliche  $LC_{50}$ -Werte wie für die GEN+Population in den Akuttests ermittelt.

**Tabelle 15:** Berechnete  $LC_{50}$ -Werte ( $\pm$  SD;  $n$ ) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) Population für die Anpassungsexperimente der Multigenerationsstudie I, (sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung, variabler Anstieg, Global-Fitting nach MOTULSKY & CHRISTOPOULOS (2004), ★★★  $p < 0,001$ ).

Generation	Behandlung	GEN+	GEN-
Akuttests mit L1-Larven [ $\mu\text{g Sn/L}$ ]			
3	LMK	21,8 ( $\pm$ 1,19; 4)	-
	TBT	16,9 ( $\pm$ 1,12; 4)	-
5	LMK	26,1 ( $\pm$ 14,45; 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 ( $\pm$ 1,2; 4)
10	LMK	7,5 ( $\pm$ 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 [ $\mu\text{g Sn/kg TG}$ ] (mittlere zeitlich gewichtete Konz.)			
11	LMK	6,7 ( $\pm$ 1,23; 3)	7,1 ( $\pm$ 1,15; 3)
	TBT	8,0 ( $\pm$ 1,03; 3)	10,1 ( $\pm$ 1,47; 3)

So liegen die  $LC_{50}$ -Werte der GEN-LMK zwischen 12,6 und 31,2  $\mu\text{g Sn/L}$  und die der GEN-TBT zwischen 13,7 und 28,9  $\mu\text{g Sn/L}$ . Es werden allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt. Im chronischen Anpassungstest befinden sich die  $LC_{50}$ -Werte auf dem Niveau, welches bereits im Vorexperiment ( $LC_{50}$ -Wert von 8,3  $\mu\text{g Sn/kg TG}$ ) ermittelt wird. Nach der elften Generation wird für GEN+LMK ein  $LC_{50}$ -Wert von 6,7  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  berechnet. Für GEN+TBT ist der  $LC_{50}$ -Wert mit 8,0  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  leicht erhöht 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 (Global-Fitting,  $p > 0,05$ ). Für die GEN-Population werden bei den chronischen Anpassungstests ähnliche  $LC_{50}$ -Werte wie für beide GEN+Behandlungsgruppen ermittelt. Die GEN-LMK Population weist dabei einen  $LC_{50}$ -Wert von 7,1  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  und die TBT vorbelastete Population (GEN-TBT) einen  $LC_{50}$ -Wert von 10,1  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  auf. Auch in diesen beiden Behandlungsgruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Global-Fitting,  $p > 0,05$ ).

#### 4.2.1.2 MGS II

##### *Rückstandsanalytik*

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

##### *Mortalität*

Hinsichtlich der Mortalität kann festgestellt werden, dass diese bei TBT-Exposition stets höher liegt als in den Kontrollgruppen (Tab. 16). Dieser Unterschied trifft für beide Populationen zu und in der zweiten Generation der GEN+Population ist die Mortalität signifikant (t-Test,  $p < 0,01$ ) erhöht mit 41%. Im Vergleich dazu wird in der Lösemittelkontrolle eine Mortalität von lediglich 9,4% beobachtet. Betrachtet man die mittlere Mortalität über beide Generationen der MGS II kann ebenfalls ein signifikanter (t-Test,  $p < 0,05$ ) Unterschied für die GEN+Population (GEN+LMK,  $12,9 \pm 2,36\%$ , GEN+TBT,  $36,7 \pm 6,86\%$ ) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu werden keine statistisch abgesicherten erhöhten Mortalitäten für die GEN-Population bei TBT-Exposition festgestellt (t-Test,  $p > 0,05$ ).



*EmT<sub>50</sub> und Weibchenanteil*

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

**Tabelle 16:** *Chironomus riparius*. Endpunkte der MGS 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). Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und der Lösemittelkontrolle ermittelt (★  $p < 0,05$ ; ★★  $p < 0,01$ ). Alle Angaben sind ± SEM und basieren auf zwei Replikaten (n = 2).

Endpunkt	Generation	GEN+		GEN-	
		LMK I/II	TBT I/II	LMK I/II	TBT I/II
Mortalität [%]	1	16,4 ± 2,43	31,7 ± 15,43	9,8 ± 6,48	24,1 ± 9,86
	2	9,4 ± 1,12	41,0 ± 1,00 ★★	15,9 ± 2,15	42,0 ± 9,71
EmT <sub>50</sub> [d]	1	21,0 ± 0,12	24,3 ± 1,09	19,74 ± 0,56	20,8 ± 0,50
	2	21,0 ± 0,27	22,1 ± 0,79	21,20 ± 0,49	20,0 ± 0,79
Weibchenanteil	1	0,50 ± 0,065	0,51 ± 0,020	0,50 ± 0,025	0,50 ± 0,030
	2	0,52 ± 0,005	0,48 ± 0,055	0,50 ± 0,005	0,55 ± 0,005 ★
Gelege pro	1	1,01 ± 0,105	1,09 ± 0,205	1,16 ± 0,020	1,07 ± 0,050
Weibchen (gesamt)	2	0,94 ± 0,070	1,23 ± 0,095	1,12 ± 0,015	1,23 ± 0,075
Gelege pro	1	0,84 ± 0,230	0,96 ± 0,205	1,04 ± 0,040	0,96 ± 0,065
Weibchen (fertil)	2	0,77 ± 0,080	1,14 ± 0,060	1,01 ± 0,020	1,14 ± 0,030
Gelegegröße	1	480 ± 10,6	460 ± 5,0	518 ± 4,3	541 ± 25,4
	2	463 ± 14,1	446 ± 14,3	486 ± 4,9	514 ± 12,5
Gelegegröße (fertile Gelege)	1	488 ± 22,7	527 ± 4,6	462 ± 4,3	555 ± 25,7
	2	457 ± 19,2	484 ± 7,8	443 ± 17,6	516 ± 8,5

Weiterhin können in der Multigenerationsstudie II, ähnlich wie bereits in der Vorstudie und in der MGS I, keine signifikanten TBT-Effekte auf den Weibchenanteil der GEN+Populationen

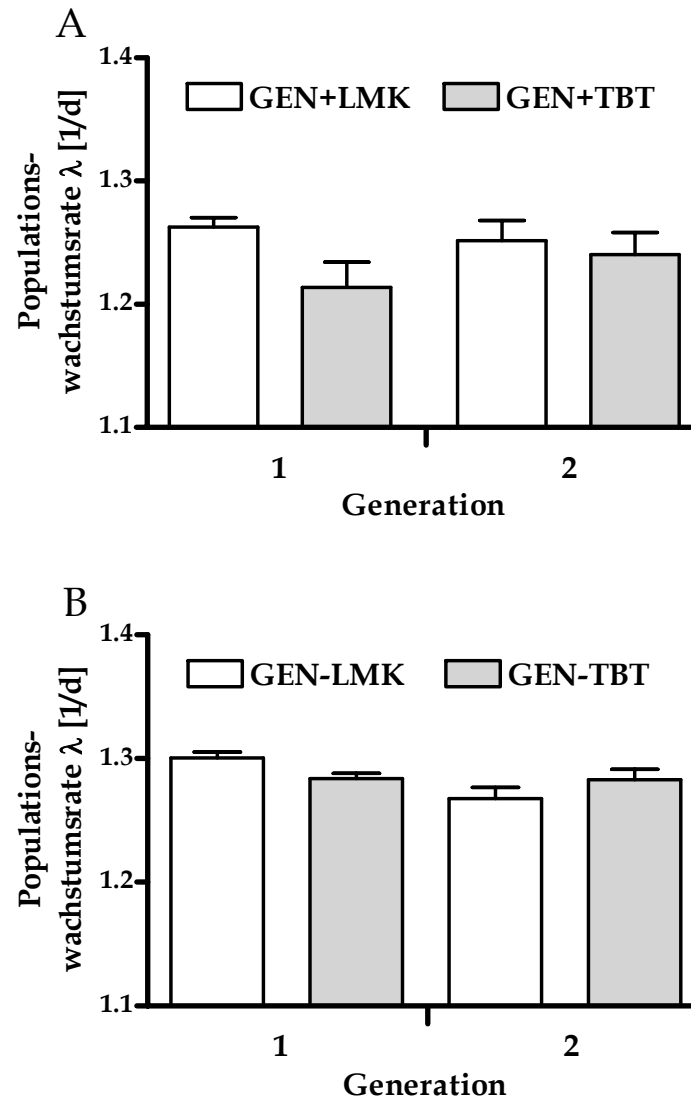
festgestellt werden. Bei der GEN-Population wird im Gegensatz dazu ein Unterschied in der zweiten Generation festgestellt, wobei der Weibchenanteil bei GEN-TBT mit 0,55 signifikant erhöht ist (t-Test,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu GEN-LMK mit 0,5.

#### *Reproduktion*

Hinsichtlich der Reproduktion werden in der MGS II keine Unterschiede zwischen den Lösemittelkontrollen und den jeweiligen TBT-Behandlungen ermittelt (Tab. 16). Die Gelegezahlen pro Weibchen befinden sich mit einer Ausnahme der zweiten Generation der GEN+LMK in einem hohen Bereich (stets über 1,0). Auch die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen liegt bei relativ hohen Werten über 0,77 in beiden Populationen und Behandlungsgruppen. In dieser Studie werden keine TBT-Effekte auf die Gelegegröße beobachtet. So schwankt dieser Parameter für beide Populationen zwischen 446 (GEN+LMK, Generation 2) und 541 (GEN+TBT, Generation 1). Ebenfalls keine Effekte der TBT-Belastung treten bezüglich der Gelegegröße der fertilen Gelege auf.

#### *Populationswachstumsrate (PWR)*

Die PWR beider Populationen und Behandlungen liegen ähnlich wie in den späteren Generationen der MGS I stets zwischen 1,2 und 1,3  $d^{-1}$  (Abb. 14). Weiterhin können keine signifikanten TBT-Effekte auf die PWR festgestellt werden und TBT wirkt sich bei der gewählten Konzentration von 6,69  $\mu\text{g Sn/kg TG}$  nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ) negativ auf die Entwicklung und Reproduktion von *Chironomus riparius* Populationen aus. Allein in der ersten Generation der GEN+TBT deutet sich ein Trend zu einer niedrigeren PWR im Vergleich zur Lösemittelkontrolle an.



**Abbildung 14:** *Chironomus riparius*. Populationswachstumsrate (MW  $\pm$  SD, in  $d^{-1}$ ) der Mischpopulation (GEN+) (**A**) und der Laborzuchtpopulation (GEN-) (**B**) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Konzentration von  $6,69 \mu\text{g Sn/kg TG}$  (LMK – Lösemittelkontrolle).

#### Genetische Analysen

Hinsichtlich der genetischen Diversität kann festgestellt werden, dass bei dem gewählten Testdesign (Populationsgröße = 350 Tiere) die Heterozygotie leicht abfällt. So beträgt die erwartete Heterozygotie am Ende der MGS I (Generation elf) 0,429 und nach den beiden Generationen der MGS II 0,386 (Mittelwert aus GEN+LMK I/II). Es wird also innerhalb der MGS II ein moderater Rückgang der genetischen Diversität unter Kontrollbedingungen beobachtet.

## 4.2.1.3 MGS III

*Rückstandsanalytik*

Nach dem Spiken der Sedimente (inkl. EtOH Evaporation) werden noch 13,6% (21,7 µg Sn/kg TG) der ausgewählten Nominalkonzentration von 160 µg Sn/kg TG analytisch bestimmt (Tab. 17). Nach einer anschließenden Testdauer von einer Stunde verringert sich die TBT-Konzentration auf 9,8 µg Sn/kg TG. Zu diesem Zeitpunkt kann ebenfalls ein Abbauprodukt (Dibutylzinn), in einer Konzentration von 1,1 µg Sn/kg TG nachgewiesen werden. Die TBT-Konzentration verringert sich im Verlauf des Experimentes weiter und kurz vor dem Schlupf der Tiere (nach 336 h) wird eine TBT-Konzentration von 2,8 µg Sn/kg TG analytisch bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt weist das Sediment ebenfalls eine erhöhte Konzentration an Monobutylzinn (8,1 µg Sn/kg TG) auf. In Anlehnung an die OECD Guideline 211 (OECD, 1998) wird für die MGS III eine zeitlich gewichtete mittlere TBT-Testkonzentration von 8,93 µg Sn/kg TG berechnet.

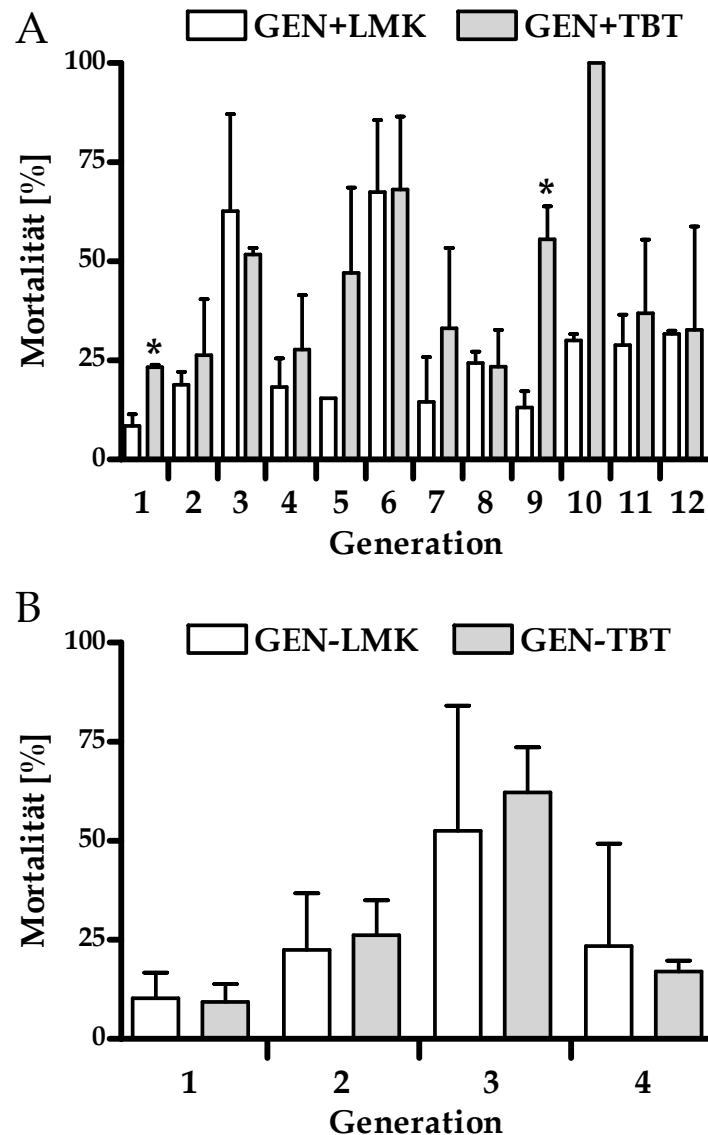
**Tabelle 17:** Ergebnisse der Rückstandsanalytik (Mono-, Di- und Tributylzinn) nach dem Spiken (inkl. Verdampfen des EtOH) und einer Testdauer von 1, 72 und 336 h im Rahmen der MGS III (dargestellt als Konzentration der Verbindung bzw. als Sn/kg TG). Die eingesetzte Nominalkonzentration beträgt 160 µg als Sn bzw. 390 µg als TBT/kg TG. Die Rückstandsanalysen wurden in Anlehnung an die DIN-Norm 19744 (DIN, 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 Mortalitäten zeigen in beiden Populationen und Behandlungsgruppen große Schwankungen, ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten. Die Mortalität liegt bei GEN+LMK zwischen 8% und 68% und bei GEN+TBT zwischen 23% und 69%. Ähnlich wie in der MGS I wird auch in dieser Studie eine extreme Ausnahme beobachtet, wobei GEN+TBT in der zehnten Generation eine Mortalität 100% aufweist (Abb. 15). Auch in diesem Falle kann die Studie nur über eine Rückstellpopulation weitergeführt werden. Ähnliche variable Mortalitäten werden bei der GEN-Population beobachtet. In dieser Population liegen die Werte bei GEN-LMK zwischen 10% und 52% und bei GEN-TBT zwischen 9% und 62%. Im Allgemeinen kann festgestellt werden, dass die mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) über alle Generationen für GEN+LMK 28% ( $\pm$  4,01%) beträgt. Für GEN+TBT wird

eine signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) erhöhte durchschnittliche Mortalität über alle elf Generationen von 43,8% ( $\pm 5,05\%$ ) berechnet. Signifikant erhöhte Mortalitäten bei GEN+TBT (t-Test,  $p < 0,05$ ) werden zwischen den beiden Behandlungen in den Generationen eins und neun festgestellt.



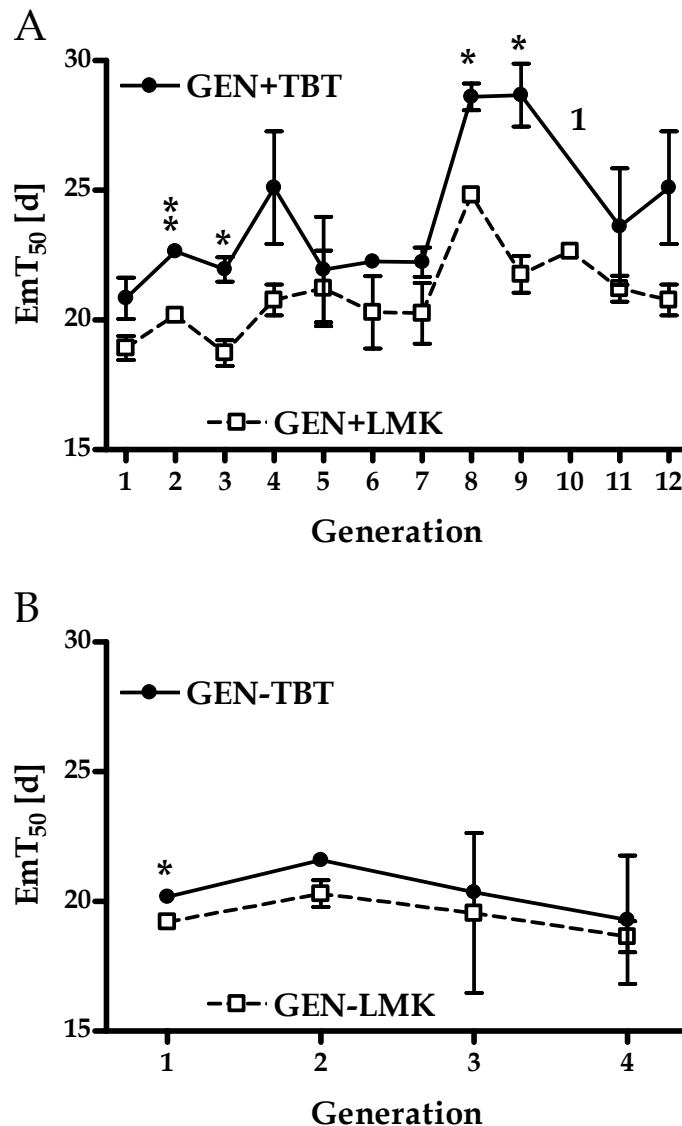
**Abbildung 15:** *Chironomus riparius*. Mortalität (MW  $\pm$  SD, in %) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) bei einer zeitlich gewichteten mittleren TBT-Testkonzentration von 8,93  $\mu\text{g Sn/kg TG}$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test zwischen der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

In Abbildung 15B wird deutlich, dass für GEN-LMK die mittlere Mortalität ( $\pm$  SD) über die vier durchgeführten Generationen 27% ( $\pm 8,28\%$ ) und für GEN-TBT 25% ( $\pm 7,92\%$ ) beträgt. Somit können die Ergebnisse des Vorexperimentes für diese Konzentration, mit einer erhöhten Mortalität für die GEN-Population nicht bestätigt werden. Für die GEN-Population

werden auch innerhalb der jeweiligen Generationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt.

### *EmT<sub>50</sub> und Weibchenanteil*

TBT verzögert den mittleren Emergenzzeitpunkt beider GEN+Populationen in allen Generationen der MGS III, wobei signifikant verspätete EmT<sub>50</sub>-Werte (t-Test,  $p < 0,05$ ) in den Generationen zwei, drei, acht und neun ermittelt werden (Abb. 16A).



**Abbildung 16:** *Chironomus riparius*. Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT<sub>50</sub>) (MW ± SD, in d) 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 wurden mittels t-Test zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Lösemittelkontrolle (LMK) bestimmt (★  $p < 0,05$ ; ★★  $p < 0,01$ ;  $n = 2$ ). Index <sup>1</sup> = EmT<sub>50</sub> nicht kalkulierbar aufgrund von zu hoher Mortalität (> 80%).

Deutlich ist auch, dass die Verzögerung besonders in der achten und neunten Generation auftritt und nach dem Zusammenbruch in Generation zehn wieder auf ein ähnliches Niveau wie zu Beginn der Studie zurückkehrt. Im Mittel beträgt der  $EmT_{50}$  über alle Generationen für die GEN+LMK 20,9 Tage. Bei TBT-Exposition verzögert sich der durchschnittliche  $EmT_{50}$  signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ) um 3 Tage. Die GEN-Population zeigt nicht so deutliche Effekte in Gegenwart von TBT, wobei der mittlere Emergenzzeitpunkt allerdings in allen vier Generationen verspätet ist. Im Mittel wird für die GEN-LMK Population ein  $EmT_{50}$  von 19,4 Tagen festgestellt. Bei GEN-TBT ist die Entwicklung der Tiere um etwa einen Tag verzögert ( $EmT_{50} = 20,3$  d).

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

### *Reproduktion*

Die Anzahl an Gelegen (gesamt) pro Weibchen schwankt über alle Generationen bei GEN+LMK zwischen 0,88 und 1,37 und bei GEN+TBT zwischen 0,86 und 1,07 (Ergebnisse nicht dargestellt). Über alle Generationen wird für GEN+LMK eine signifikant (t-Test,  $p < 0,01$ ) höhere durchschnittliche Gelegenanzahl pro Weibchen mit 1,11 ( $\pm 0,04$ ) im Vergleich zu GEN+TBT mit 0,96 ( $\pm 0,04$ ) festgestellt. Die Gelegenanzahl pro Weibchen (gesamt) 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 in der GEN+LMK zwischen 0,73 und 1,25 (Tab. 18). Im Vergleich dazu werden bei GEN+TBT niedrigere Werte zwischen 0,59 und 1,05 festgestellt. Bezüglich dieses Parameters kann ebenfalls eine signifikante (t-Test,  $p < 0,01$ ) Wirkung der TBT-Exposition über alle Generationen festgestellt werden, wobei die durchschnittliche Anzahl an Gelegen pro Weibchen über alle Generationen niedriger ist (GEN+LMK:  $0,99 \pm 0,04$ ; GEN+TBT:  $0,83 \pm 0,04$ ). Bei der GEN-Population können im Hinblick auf die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen sowie hinsichtlich der Anzahl an Gelegen pro Weibchen (gesamt) keine Effekte durch TBT festgestellt werden (Tab. 18). Auch hier liegen die Werte beider Behandlungsgruppen stets um 1,0. Weiterhin kann festgestellt werden, dass der Anteil an fertilen Gelegen an den gesamt produzierten Gelegen durch TBT über alle Generation gemittelt keinen Effekt aufweist. Im Durchschnitt werden bei beiden

Populationen und Behandlungsgruppen Werte zwischen 84% (GEN-TBT) und 89% (GEN+LMK) beobachtet.

**Tabelle 18:** 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 wurden 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+		GEN-	
	LMK	TBT	LMK	TBT
1	1,25 ± ,065	0,80 ± 0,055 $\star$	1,07 ± 0,075	1,18 ± 0,035
2	1,01 ± 0,025	0,92 ± 0,120	1,10 ± 0,090	0,92 ± 0,075
3	0,97 ± 0,005	1,05 ± 0,100	1,07 ± 0,025	1,08 ± 0,115
4	0,89 ± 0,035	0,89 ± 0,035	0,91 ± 0,100	0,97 ± 0,065
5	0,81 ± 0,110	0,78 ± 0,100	-	-
6	0,99 ± 0,125	0,64 ± 0,025	-	-
7	0,73 ± 0,135	0,59 ± 0,185	-	-
8	0,81 ± 0,205	0,99 ± 0,045	-	-
9	1,23 ± 0,045	0,92 ± 0,115	-	-
10	0,92 ± 0,180	n.B.	-	-
11	1,24 ± 0,165	0,89 ± 0,095	-	-
12	1,02 ± 0,095	0,76 ± 0,080	-	-

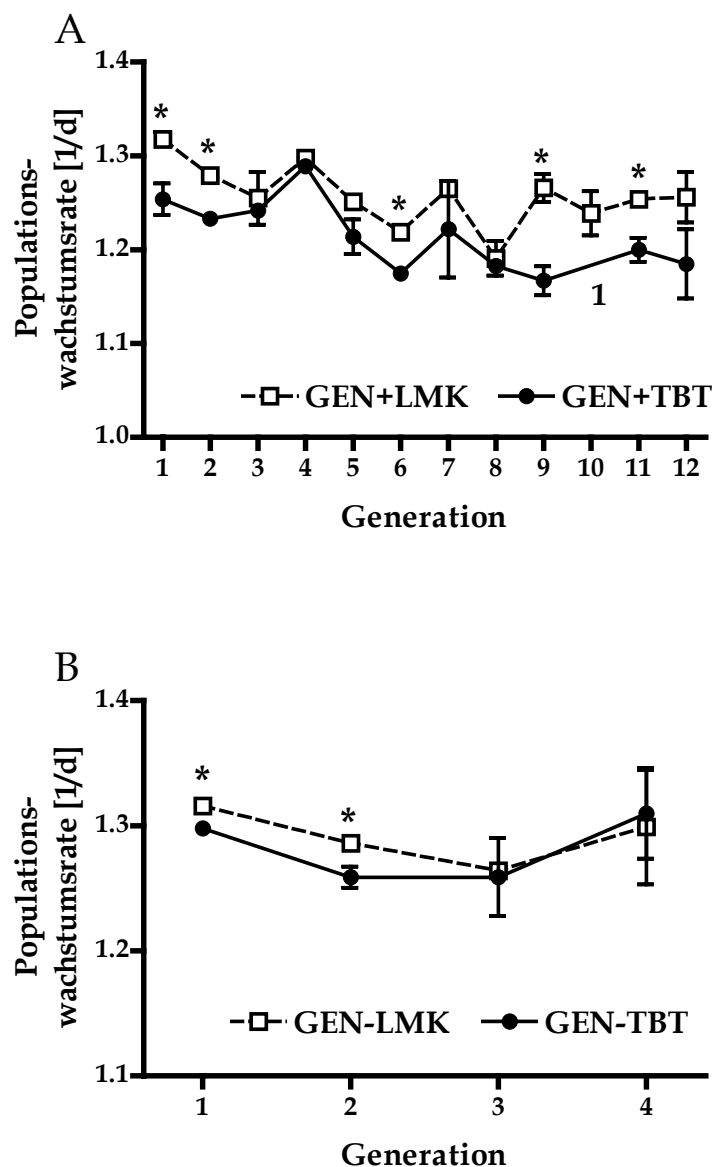
Die mediane Anzahl an Eiern pro Gelege variiert in der GEN+LMK zwischen 323 und 520 und bei GEN+TBT zwischen 376 und 554 (Ergebnisse nicht dargestellt). Für GEN-LMK werden Gelegegrößen zwischen 480 und 533 und für GEN-TBT zwischen 463 und 570 Eiern pro Gelege beobachtet. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Gelege in der ersten Generation der GEN-TBT signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) kleiner sind als jene der GEN-LMK. Bezüglich der Größe fertiler Gelege werden für GEN+LMK Werte zwischen 332 und 538 und für GEN+TBT Werte zwischen 378 und 550 ermittelt. Bei der GEN-Population sind ähnliche Größen bezüglich der fertilen Gelege zu beobachten (GEN-LMK 470 – 536, GEN-TBT 447 – 554).

#### *Populationswachstumsrate (PWR)*

Die PWR liegt auch in der MGS III deutlich über  $1,0 d^{-1}$  und es werden ähnliche Werte wie in den Studien zuvor ermittelt. Bei der GEN+Population liegen die PWR für GEN+LMK zwischen  $1,19$  und  $1,32 d^{-1}$  und bei GEN+TBT zwischen  $1,17$  und  $1,29$  (Abb. 17A). Dabei



kann der Effekt von TBT deutlich beobachtet werden, wobei in allen Generationen die PWR der GEN+TBT unter derjenigen der Lösemittelkontrolle liegt. Signifikante Unterschiede können dabei in den Generationen eins, zwei, sechs, neun und elf ermittelt werden (t-Test,  $p < 0,05$ ). Betrachtet man die durchschnittliche PWR ( $\pm$  SD) über alle Generationen, so ist diese mit  $1,26 \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 0,007 \text{ d}^{-1}$ ) bei GEN+LMK signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ) höher als in der GEN+TBT mit  $1,22 \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 0,009 \text{ d}^{-1}$ ).

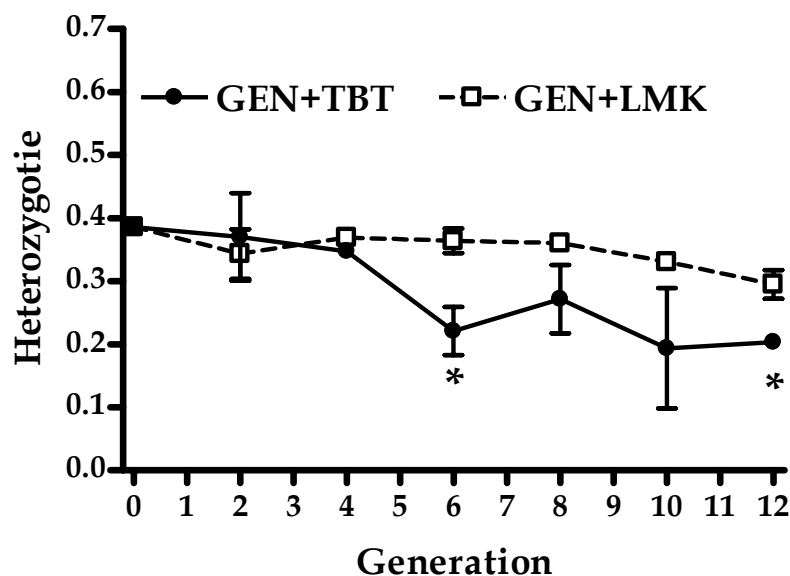


**Abbildung 17:** *Chironomus riparius*. Populationswachstumsrate ( $MW \pm SD$ , in  $\text{d}^{-1}$ ) der (A) Mischpopulation (GEN+) und der (B) Laborzuchtpopulation (GEN-) in der Multigenerationsstudie III bei einer mittleren zeitlich gewichteten TBT-Testkonzentration von  $8,93 \mu\text{g Sn/kg TG}$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

Auffällig ist, dass in der GEN-Population ein vergleichbarer Trend wie bei der GEN+Population zu beobachten ist (Abb. 17B). So ist die PWR in den ersten beiden Generationen bei GEN-TBT signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) niedriger im Vergleich zur GEN-LMK. In den folgenden Generationen drei und vier gleichen sich jedoch die Werte der beiden Behandlungsgruppen wieder an und es können keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet werden. Im Allgemeinen liegen allerdings die PWR auch bei dieser Population deutlich über dem kritischen Wert von  $1,0 \text{ d}^{-1}$ . Betrachtet man ebenfalls die durchschnittliche PWR ( $\pm \text{SD}$ ) der GEN-Population, so ist ebenfalls ein signifikanter (t-Test,  $p < 0,05$ ) Effekt der TBT-Exposition zu erkennen. Dabei weist die GEN-LMK eine durchschnittliche PWR von  $1,32 \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 0,004 \text{ d}^{-1}$ ) und GEN-TBT eine PWR von  $1,30 \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 0,001 \text{ d}^{-1}$ ) auf. Die PWR liegen zwar über denen der GEN+Population, allerdings werden bei GEN- lediglich die ersten vier Generationen berücksichtigt.

#### Genetische Analysen

Die genetische Diversität in der MGS III wird in der Ausgangspopulation und in sechs der insgesamt zwölf Generationen nur für die GEN+Population untersucht. Dabei kann festgestellt werden, dass sich die erwartete Heterozygotie der GEN+Population im Verlauf der vorangegangenen Experimente deutlich verringert gegenüber dem Beginn in der MGS I ist und der Startwert nur noch bei ca. 0,4 liegt (Abb. 18).



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

Weiterhin können annähernd gleiche Heterozygotien für GEN+LMK und GEN+TBT in den Generationen zwei und vier festgestellt werden. In den folgenden beiden Generationen kommt es zu einem Abfall der genetischen Diversität und in der 6. Generation wird ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen festgestellt. Dabei ist die Diversität in der GEN+TBT Population signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ,  $X^2$ -Test) als in der GEN+LMK. In den folgenden Generationen acht und zehn wird wieder ein ähnliches Niveau in beiden Behandlungsgruppen ermittelt. In der letzten Generation ist die Diversität der GEN+TBT Population wieder signifikant ( $p < 0,05$ ,  $X^2$ -Test) niedriger als in der GEN+LMK. Im Allgemeinen ist bei der GEN+LMK über die zwölf Generationen ein stetiger, langsamer Rückgang der Heterozygotie zu erkennen. Dieser Trend hin zu mehr homozygoten Genorten fällt bei der GEN+TBT Population stärker aus.

In der MGS III werden ebenfalls signifikante ( $X^2$ -Test,  $p < 0,05$ ) Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG) bei der GEN+Population festgestellt (Tab. 19). Dieses betrifft aber sowohl die Lösemittelkontrolle (3x) als auch die TBT-Behandlung (3x), wobei im Gegensatz zur MGS I allerdings sehr wenige Abweichungen beobachtet werden. Die Abweichungen vom HWG beschränken sich auf die Mikrosatellitengenorte eins und vier. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Genorte vier und fünf ab der sechsten Generation überhaupt keine Heterozygotie aufweisen und völlig homozygot vorliegen. Deshalb wird auch die gesamte Heterozygotie der GEN+TBT Population im Mittel deutlich vermindert. Im Allgemeinen können auch bei der Betrachtung der einzelnen Mikrosatellitengenorte deutlich niedrigere Werte im Vergleich zur MGS I beobachtet werden.

**Tabelle 19:** *Chironomus riparius*. 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. Signifikante Abweichungen wurden mittels  $X^2$ -Test bestimmt ( $\star p < 0,05$ ;  $\star\star p < 0,01$ ;  $\star\star\star p < 0,001$ ).

Generation	Behandlung	Mikrosatellitengenorte				
		Lokus 1	Lokus 2	Lokus 3	Lokus 4	Lokus 5
0		0,758	0,287	0,505	0,209	0,172
2	LMK I	0,769	0,169	0,460	0,089	0,089
	LMK II	0,806	0,191	0,479	0,223	0,156
	TBT I	0,770	0,120	0,510	0,082	0,125
	TBT II	0,801	0,383	0,507	0,284	0,120
4	LMK I	0,847 $\star$	0,223	0,510	0,191	0,042
	LMK II	0,764	0,284	0,487	0,082	0,262
	TBT I	0,807	0,333	0,530	0,082	0,000
	TBT II	0,756	0,311	0,496	0,120	0,042
6	LMK I	0,752	0,000	0,489	0,507	0,000
	LMK II	0,754 $\star$	0,125	0,497	0,294	0,223
	TBT I	0,715	0,254	0,000	0,000	0,000
	TBT II	0,254 $\star$	0,254	0,254	0,000	0,000
8	LMK I	0,623	0,125	0,507	0,507	0,000
	LMK II	0,675	0,082	0,503	0,361	0,361
	TBT I	0,652	0,418	0,418	0,000	0,000
	TBT II	0,418	0,311	0,383	0,000	0,082
10	LMK I	0,711	0,028	0,460	0,497	0,000
	LMK II	0,653	0,168	0,401	0,307	0,083
	TBT I	0,495 $\star\star$	0,106	0,029	0,000	0,000
	TBT II	0,774 $\star\star$	0,243	0,178	0,000	0,109
12	LMK I	0,512	0,036	0,497	0,507	0,000
	LMK II	0,707	0,122	0,394	0,125 $\star\star\star$	0,048
	TBT I	0,691	0,337	0,000	0,000	0,000
	TBT II	0,688	0,311	0,000	0,000	0,000

### Anpassungsstudien

In den Akuttests werden ähnliche Werte hinsichtlich der Sensitivität der L1-Larven gegenüber TBT in beiden Populationen und Behandlungsgruppen festgestellt. Dabei ist auffällig, dass durch das gewählte statistische Verfahren ( $n = 2$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt werden. Dieses trifft vor allem für die erste Generation der GEN+Population 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 (Tab. 22). Im weiteren Verlauf der Experimente werden für GEN+LMK  $\text{LC}_{50}$ -Werte zwischen 14,1 und 21,7  $\mu\text{g Sn/L}$  berechnet. Für GEN+TBT werden  $\text{LC}_{50}$ -Werte zwischen 12,9 und 29,5  $\mu\text{g Sn/L}$  berechnet. Bei GEN- ist auffällig, dass in der vierten Generation der  $\text{LC}_{50}$ -Wert in der TBT Behandlung nur halb so hoch ist, wie der in der GEN-LMK und die Tiere der TBT-Vorexposition somit empfindlicher gegenüber dem Stressor TBT sind.

**Tabelle 20:** Berechnete  $\text{LC}_{50}$ -Werte (MW  $\pm$  SEM; n) für die Lösemittelkontrolle (LMK) und die TBT-Behandlung (TBT) der GEN+ (Mischpopulation) und GEN- (Laborzuchtpopulation) Population für die Anpassungsexperimente der MGS III. (Index <sup>1</sup> = 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+	GEN-
Akuttests 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)	9,9 ( $\pm 4,59$ ; 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	5,7 (-; 1) <sup>1</sup>	15,6 (-; 1) <sup>1</sup>
	TBT	8,6 ( $\pm 0,31$ ; 2) ★	n. B. <sup>2</sup>
12	LMK	n. B. <sup>2</sup>	n. B. <sup>2</sup>
	TBT	n. B. <sup>2</sup>	n. B. <sup>2</sup>

Hinsichtlich der chronischen Tests kann nur ein valides Experiment nach der vierten Generation in der GEN+Population ausgewertet werden, da in allen anderen Experimenten die Kontrollmortalität zu hoch ist ( $> 30\%$ ). Dadurch kann kein sinnvoller  $\text{LC}_{50}$ -Wert berechnet werden. In dem validen Experiment kann festgestellt werden, dass die TBT-vorexponierte GEN+Population einen signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) erhöhten  $\text{LC}_{50}$ -Wert im Vergleich zur Lösemittelkontrolle aufweist. Weiterhin werden in diesem Experiment ähnliche  $\text{LC}_{50}$ -Werte wie im TBT-Vorexperiment berechnet.

#### 4.2.2 Cadmium als Zweit-Stressor

Neben den Multigenerationsexperimenten werden weiterführende Experimente mit Cadmium als zweitem Stressor durchgeführt. Dabei wird der Fragestellung nachgegangen, ob chronisch TBT-vorbelastete Populationen anders auf eine sich anschließende Cadmiumexposition reagieren, als nicht TBT-vorbelastete Populationen. Innerhalb der MGS I und MGS III werden diese Experimente mit einer Cd-Nominalkonzentration von 1,2 mg/kg TG parallel zu den MGS ebenfalls im Multigenerationsansatz (über drei Generationen) durchgeführt (Tab. 21). Die Zweitstressorstudien werden dabei identisch dem jeweiligen Testdesign (Replikanzahl etc.) der MGS durchgeführt, wobei die einzelnen Belastungsgruppen entsprechend ihrer Vorexposition und Exposition während der Versuche wie folgt benannt wurden (Tab. 21). Die Zweitstressorstudien werden nur mit der Mischpopulation (GEN+) durchgeführt. Das erste Experiment innerhalb der MGS I erfolgt dabei im Rahmen der Diplomarbeit von Maren Heß (2005) über die Generationen sieben bis neun. Die zweite Studie wird in der MGS III parallel zu den Generationen zehn bis zwölf durchgeführt.

**Tabelle 21:** Stressorwechsel in den verschiedenen Belastungsgruppen 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

MGS I (einfache Replikation)		
Bezeichnung	Vorexposition 6 Generationen	Folgebehandlung 3 Generationen
LMK+LMK	-	-
LMK+Cd	-	Cadmium
TBT+LMK	TBT	-
TBT+Cd	TBT	Cadmium
TBT+TBT	TBT	TBT
MGS III (doppelte Replikation)		
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

Die Endpunkte der Life-Cycle Experimente mit Cadmium (Cd) werden für die beiden Zweitstressorstudien als gemittelte Werte ( $\pm$  SD) der jeweiligen drei Generationen aufgeführt. So können generelle Aussagen für die Populationen abgeleitet werden. Die jeweiligen

Behandlungsgruppen werden nach ihrer Belastungshistorie in „nicht vorbelastet“ und „TBT-vorbelastet“ der besseren Übersichtlichkeit halber getrennt. Statistisch signifikante Unterschiede werden in allen Grafiken nur für Unterschiede zwischen der Cd-Behandlung und der jeweils zugehörigen Kontrolle bzw. zwischen den beiden Cd-Ansätzen dargestellt.

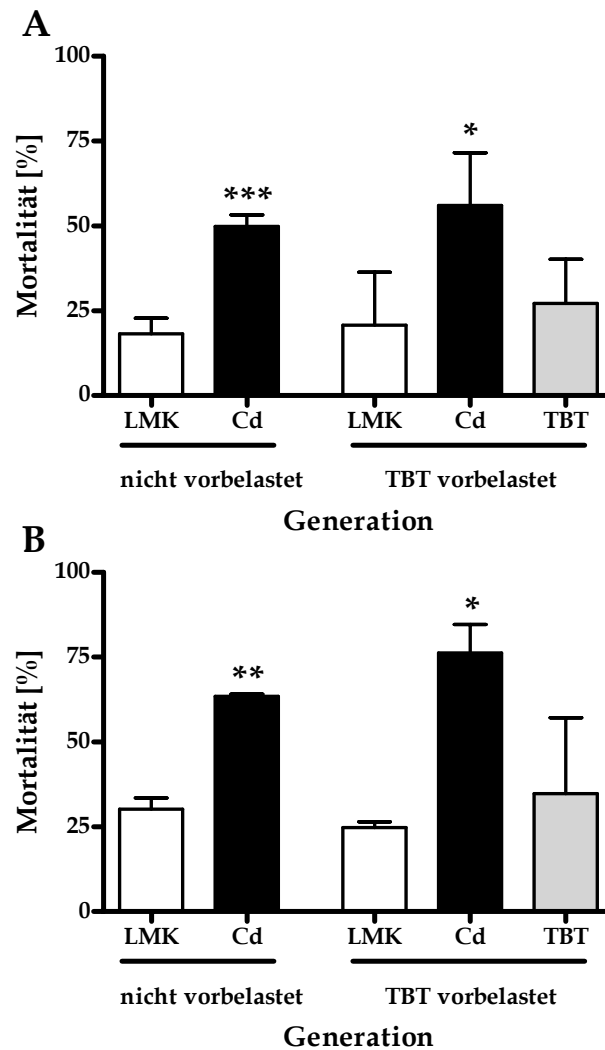
#### *Rückstandsanalytik*

In den Zweitstressorstudien (ZSS) wird eine gesonderte Cd-Rückstandsanalytik für das Sediment und für das Überstandswasser am IHI Zittau durchgeführt (Details siehe OETKEN, 1999). Dabei wird ebenfalls wie im Cd-Vorexperiment (VOGT et al, 2007a) eine zeitlich gewichtete mittlere Testkonzentration von 0,76 mg/kg TG in Anlehnung an die OECD Guideline 211 (OECD, 1998) berechnet. Im Überstandswasser wurden zum Ende des Versuches 0,19 µg Cd/L gemessen (HESS, 2005).

#### *Mortalität und Geschlechterverhältnis*

Die Mortalitäten befinden sich in allen Kontrollgruppen (LMK+LMK, LMK+TBT) stets auf einem moderaten Niveau und weisen in beiden Studien etwa 25% auf (Abb. 19A,B). Wie bereits für die gesamte 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). Dieses trifft auch für die TBT+TBT Population in der MGS III zu (Abb. 19B). Im Gegensatz dazu kann ein toxischer Effekt des Schwermetalls Cd auf die Mortalität der Tiere beobachtet werden. So erhöht sich die Mortalität signifikant in der ZSS I in beiden Cd-Behandlungsgruppen (LMK+Cd, TBT+Cd) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Diese Erhöhung der Mortalität bestätigt die Ergebnisse des Vorexperimentes ( $LC_{50} = 1,25$  mg/kg TG, VOGT ET AL., 2007a). Hinsichtlich der unterschiedlichen Vorbelastung werden keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt. In der ZSS III, können ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte Mortalitäten bei den Cd-Expositionen (LMK+Cd, TBT+Cd) beobachtet werden. Allerdings gibt es auch hier keine Unterschiede zwischen der nicht-vorbelasteten und der vorbelasteten Gruppe.

Interessant ist, dass die gleiche Cd-Konzentration höhere Mortalitäten bei GEN+LMK und bei GEN+TBT in der ZSS III im Vergleich zur ZSS I zur Folge hat. Bezüglich des Geschlechterverhältnisses konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt werden.



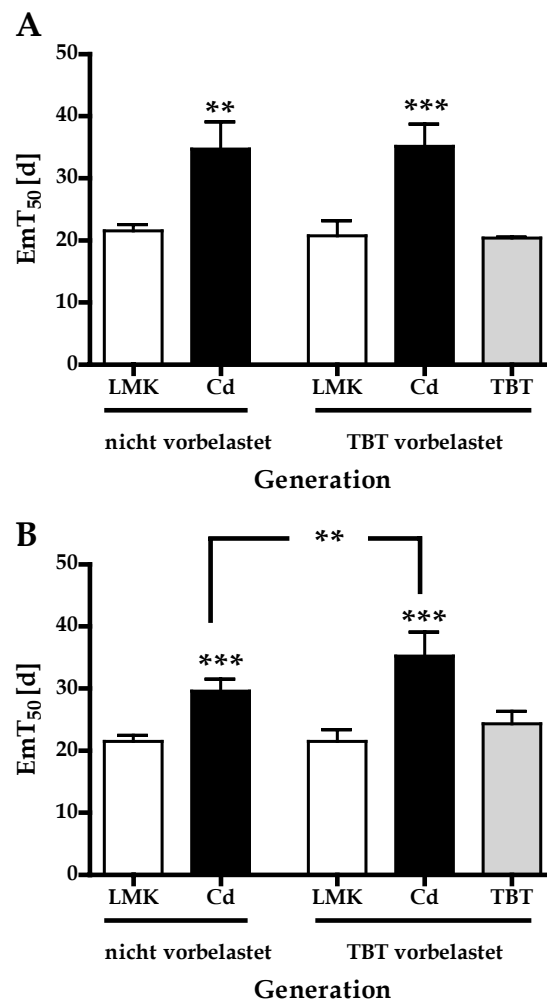
**Abbildung 19:** *Chironomus riparius*. Mortalität (MW ± SD) in den Zweitstressorexperimenten mit den nicht-vorbelasteten und TBT-vorbelasteten Populationen (**A**) parallel zur MGS I und (**B**) parallel zur MGS III. Dargestellt sind die beiden Populationen bei Schadstoffwechsel auf Cadmium (schwarze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

#### Mittlerer Schlupfzeitpunkt ( $EmT_{50}$ )

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. 20A,B). Die TBT-Vorbelastung spielt dabei bezüglich der TBT+LMK Populationen keine Rolle. In den Experimenten kann kein Effekt der TBT-Belastung auf den  $EmT_{50}$  in der MGS I über die Generationen sieben bis neun festgestellt werden (Abb. 20A). Bei der TBT+TBT Behandlung der MGS III ist dieses ähnlich, wobei allerdings eine Verzögerung des  $EmT_{50}$ -Wertes beobachtet wird ( $p = 0,0521$ ). Weiterhin ist ein entwicklungsverzögernder Effekt des Schwermetalls Cd auf den  $EmT_{50}$  in



beiden Studien offensichtlich, wobei bei allen Cd-Behandlungsgruppen signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) spätere Schlupfzeitpunkte im Vergleich zur jeweiligen LMK beobachtet werden. Die Emergenz der Tiere verzögert sich dabei in allen vier Cd-Behandlungen um 10-15 Tage. Auffällig ist hierbei, dass in der ZSS I keine Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich vorbelasteten Populationen zu erkennen sind. In der ZSS III ist das nicht der Fall (Abb. 20B). So ist die Population, welche über neun Generationen mit einer höheren TBT-Konzentration vorbelastet wurde, signifikant ( $p < 0,01$ ; t-Test) empfindlicher gegenüber dem Zweitstressor als das in der LMK+Cd der Fall ist.



**Abb. 20:** Mittlerer Emergenzzeitpunkt ( $EmT_{50}$ , in d) von *C. riparius* ( $MW \pm SD$ ) in den Zweitstressorexperimenten mit den 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 (schwarze Balken, Cd) und die jeweiligen Vergleichsgruppen (weiße Balken, Lösemittelkontrolle – LMK; grauer Balken, Tributylzinn –TBT) über drei Generationen. Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test bestimmt ( $\star\star$   $p < 0,01$ ;  $\star\star\star$   $p < 0,001$ ;  $n = 2-3$ ).

*Gelege pro Weibchen und Gelegegröße*

Hinsichtlich der Reproduktionsparameter kann kein einheitliches Bild der Cd-Exposition in beiden Zweitstressorstudien ermittelt werden (Tab. 22). In der Vorstudie werden eine deutlich niedrigere Gelegeanzahl pro Weibchen sowie tendenziell kleinere Gelege bei Cd-Stress bei der gewählten Konzentration ermittelt (VOGT ET AL., 2007a). Im Allgemeinen werden unabhängig von der Vorbelastung, als auch von der Belastung innerhalb der Zweitstressorexperimente, hohe Gelegezahlen pro Weibchen festgestellt, wobei diese zwischen 0,88 und 1,17 schwanken. Weiterhin können keine dramatischen Folgen auf die Entwicklungsfähigkeit der Gelege beobachtet werden, wobei die Weibchen stets zahlreiche fertile Gelege produzieren. In der ZSS I wird ein signifikanter ( $p < 0,05$ , t-Test) Unterschied zwischen der TBT+LMK und der TBT+Cd Gruppe ermittelt, wobei die Weibchen unter Cd-Stress mehr Gelege produzieren. In der ZSS III werden im Gegensatz dazu keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt.

**Tabelle 22:** Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertile, Mittelwert  $\pm$  SD) und Eier pro Gelege (Mittelwert  $\pm$  SD) der Zweitstressorstudien mit Cadmium parallel zu den Multigenerationsstudien I und III. Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test bestimmt ( $\star p < 0,05$ ,  $\star\star p < 0,01$ ,  $n = 2-3$ ).

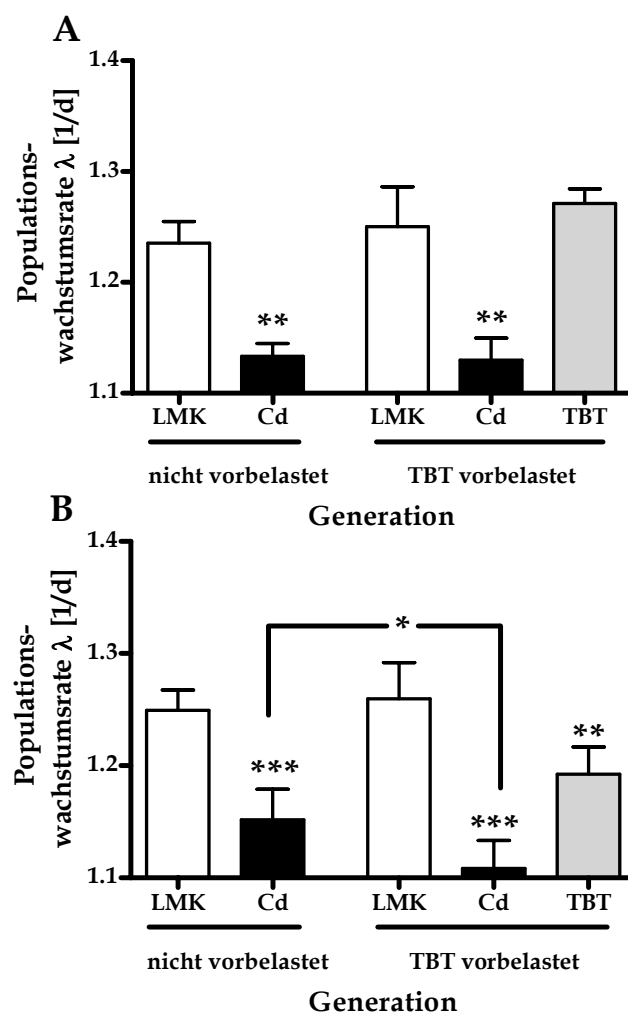
Behandlungsgruppe	Gelege pro Weibchen (MW $\pm$ SD)		Eier pro Gelege (MW $\pm$ SD)
	gesamt	fertil	
Zweitstressorstudie I (parallel zur MGS I)			
LMK+LMK	0,95 (0,032)	0,78 (0,056)	458,7 (13,03)
LMK+Cd	1,04 (0,176)	0,97 (0,160)	393,3 (17,65) $\star\star$
TBT+LMK	0,88 (0,077)	0,82 (0,084)	493,8 (11,04)
TBT+Cd	1,11 (0,074) $\star$	0,99 (0,061)	463,7 (40,70)
TBT+TBT	1,14 (0,185)	1,06 (0,185)	496,7 (11,04)
Zweitstressorstudie III (parallel zur MGS III)			
LMK+LMK	1,17 (0,183)	1,06 (0,162)	393,7 (44,36)
LMK+Cd	1,07 (0,159)	0,89 (0,103)	504,6 (13,66) $\star$
TBT+LMK	1,08 (0,090)	1,06 (0,090)	537,1 (37,36)
TBT+Cd	0,95 (0,370)	0,89 (0,294)	507,9 (29,96)
TBT+TBT	0,97 (0,081)	0,82 (0,088)	391,4 (22,20) $\star$

Die Gelegegröße unter Cd-Stress ist in der ZSS I signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) kleiner bei der LMK+Cd im Vergleich zur LMK+LMK. Somit können die Ergebnisse der Vorstudie nahezu bestätigt werden. In der ZSS III ergibt sich allerdings ein umgekehrtes Bild. Die produzierten Gelege bei LMK+Cd sind signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test) größer als jene der LMK+LMK.

Weiterhin kann ein statistisch abgesicherter Unterschied zwischen der TBT+TBT und der TBT+LMK festgestellt werden, wobei die Gelege bei TBT-Exposition signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test) kleiner sind.

#### Populationswachstumsrate (PWR)

In Kontrollbehandlungen (LMK+LMK, TBT+LMK) befinden sich die PWR auf einem ähnlichen Niveau, wobei die Populationen jeden Tag um etwa 25% wachsen (Abb. 21A,B). Dieses ist, wie bei den Life-Cycle Parametern der Mortalität und der  $EmT_{50}$ , wiederum unabhängig von der Vorexposition.



**Abbildung 21:** Populationswachstumsrate (in  $d^{-1}$ ) von *C. riparius* (MW  $\pm$  SD) in den Zweitstressorexperimenten mit den 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 (schwarze Balken, Cd) und die jeweiligen Vergleichsgruppen (weiße Balken, Lösemittelkontrolle – LMK; grauer Balken, Tributylzinn –TBT) über drei Generationen. Signifikante Unterschiede wurden mittels T-Test bestimmt ( $\star p < 0,05$ ;  $\star\star p < 0,01$ ;  $\star\star\star p < 0,001$ ;  $n = 2-3$ ).

Bezüglich der TBT-Exposition (TBT+TBT) kann in der ZSS I kein TBT-Effekt festgestellt werden, da die PWR ein ähnliches Niveau wie in den Kontrollen erreicht (Abb. 21A). Im Gegensatz dazu wird in der ZSS III eine signifikant ( $p < 0,01$ ) niedrigere PWR mit ca.  $1,2 \text{ d}^{-1}$  bei TBT+TBT im Vergleich zur Kontrolle ermittelt (Abb. 21B).

Die Exposition gegenüber Cd führt in allen vier Behandlungsgruppen zu signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) niedrigeren PWR gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dabei fällt die Verminderung der PWR statistisch größer in der ZSS III aus. Auffällig ist auch, dass die Erniedrigung der PWR in der ZSS I in der nicht-vorbelasteten und in der TBT-vorbelasteten Behandlungsgruppe gleich stark ausfallen. Im Gegensatz dazu ist die TBT-vorbelastete Gruppe in der ZSS III signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test) empfindlicher gegenüber Cd als die nicht-vorbelastete Gruppe.

#### *Physiologische Auswirkungen einer Cd-Exposition*

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die generellen physiologischen Effekte des Schwermetalls unter den gegebenen Versuchsbedingungen anhand der Cd-belasteten Kontrollen erklärt. Das breite Wirkungsspektrum von Cd auf die verschiedenen physiologischen Vorgänge ist in der unspezifischen Wirkung auf molekularer Ebene begründet (Cd wirkt als Enzymhemmer). Durch Bindung an die Thiolgruppen und Disulfanbrücken von Proteinen destabilisiert es diese und blockiert so diverse Stoffwechselwege (FENT, 1998). Als unspezifischer Enzymhemmer kann Cd in überlebenswichtige Prozesse jedes Entwicklungsstadiums eingreifen. In den Experimenten liegt die Mortalität in den Cd-exponierten Ansätzen jeweils deutlich höher als in den dazugehörigen Kontrollen. Da nicht signifikant mehr tote L4-Larven oder Puppen beobachtet werden, scheinen letale Effekte vor allem in frühen Larvalstadien einzutreten. Diese letalen Effekte von Cadmium, besonders auf die jungen Larvalstadien von Chironomiden, wurden bereits in zahlreichen Studien sowie im Vorexperiment festgestellt (WILLIAMS ET AL., 1986; PASCOE ET AL., 1989; VOGT ET AL., 2007a). Die L2-Larven sind vermutlich eher in der Lage, den Schadstoff zu tolerieren. Dies kann durch verschiedene Strategien, wie Veränderungen im Verhalten oder biochemischer bzw. daraus resultierender physiologischer Reaktionen, erfolgen. Ein bei vielen Organismen bekannter Schutzmechanismus gegen Schwermetalle ist die Induktion metallbindender Metallothioneine (MT) (JOHNSON, 1998; GILLIS ET AL., 2002). Die Proteinsynthese und der Schadstoffmetabolismus bis zur Exkretion sind allerdings mit hohen energetischen Kosten für den Organismus verbunden und jegliche Art der Vermeidung, Metabolisierung oder Exkretion bedeutet eine erhöhte Energieinvestition (BARBER ET AL., 1990). Dadurch werden

andere physiologische Prozesse verlangsamt (FORBES & CALOW, 1996) und die „Kosten“ der Entgiftungsmechanismen könnten eine Ursache für die beobachtete Entwicklungsverzögerung der Larven in den Zweitstressorstudien sein. Hinzu kommt die direkte Beeinflussung verschiedener Stoffwechselwege durch eine unspezifische Enzymwirkung.

Interessant ist, dass das zeitliche Verhältnis zwischen den  $EmT_{50}$ -Daten der Geschlechter trotz des Schlupfverzuges bestehenbleibt. Die Männchen beginnen, wie in den Kontrollen, drei Tage früher zu schlüpfen als die Weibchen. Im Freiland garantiert dieses versetzte Schlüpfen, dass bereits genug Männchen schwärmen und es zur Paarung kommen kann, sobald die Weibchen schlüpfen (JACOBS & RENNER, 1988). Die Überschneidung der Schlupfintervalle von Männchen und Weibchen ist aufgrund der kurzen Lebensdauer der Imagines ein entscheidender Faktor für das Überleben der Population (PASCOE ET AL., 1989). In den beiden Multigenerationsstudien wirkt sich Cd nicht negativ auf diese Periodik aus. Eine Störung dieses Ablaufes hätte eine verringerte Verpaarung und damit einen negativen Einfluss auf die Reproduktion zur Folge.

Die Reifung der Gonaden und die Vitellogenese sind Vorgänge, die bereits vor Abschluss der Metamorphose stattfinden (HOFFMANN, 1995), d.h. in einem Stadium, in dem die Chironomiden direkt exponiert werden. Es ist demzufolge anzunehmen, dass das enzymhemmende Cd die Keimzellenentwicklung negativ beeinflusst, beispielsweise durch unvollständige Dottereinlagerung. Aber auch hier kann wieder auf die hohen Energiekosten der Entgiftungsmechanismen verwiesen werden, die energieaufwändige Prozesse wie die Vitellogenese herabsetzen können. Die Ablage der Eier erfolgt dagegen in einem Stadium, in dem die Tiere das belastete Habitat verlassen haben. Obwohl keine direkte Exposition mehr stattfindet, bleibt ein Teil des akkumulierten Schwermetalls im Gewebe der Chironomiden enthalten (GROENENDIJK ET AL. 1999, POSTMA ET AL., 1996) und kann nachhaltig Effekte hervorrufen. Im Gegensatz zum Vorexperiment, wobei weniger Gelege pro Weibchen bei der gewählten Konzentration beobachtet werden, produzieren die Weibchen in den Zweitstressorexperimenten allerdings annähernd gleich viele Gelege unter Cadmiumstress wie unter Kontrollbedingungen. Weiterhin kann in beiden Experimenten ein konträres Bild hinsichtlich der Gelegegröße festgestellt werden, so sind die Gelege in der ZSS I unter Cd-Stress (LMK+Cd) signifikant kleiner als in der Kontrolle (LMK+LMK). Im Gegensatz dazu werden größere Gelege unter Cd-Stress (LMK+Cd) bei der ZSS III als in der Kontrolle (LMK+LMK) festgestellt. Somit gibt es wahrscheinlich neben der Cd-Belastung auch noch andere Effekte, welche sich auf die Gelegegröße auswirken können.

Auch wenn sich der Einfluss von Cd insgesamt nicht negativ auf die Fruchtbarkeit des einzelnen Weibchens auswirkt, hat die Exposition durch die erhöhte Mortalität dennoch Folgen auf die Gesamtreproduktion der Population.

*Ausgangsbedingungen nach unterschiedlicher Vorbelastung und -dauer*

Das Hauptinteresse der Zweistressorstudien liegt in der Frage, ob sich die Effekte von Cd auf TBT-vorexponierte Tiere gegenüber den Effekten auf nicht-vorbelastete Tiere unterscheiden. Eine Vorbelastung mit TBT lässt verschiedene Entwicklungsmöglichkeiten erwarten. Zum einen wäre eine genetische Anpassung an den ersten Stressor TBT möglich, die zu einer Einschränkung der genetischen Variabilität führt. Dadurch wäre das Potential der Population, auf einen weiteren Stressor, also einen neuen Selektionsdruck, zu reagieren, möglicherweise eingeschränkt. Eine stärkere phänotypische Reaktion auf Cadmium wäre zu erwarten. Zum anderen könnten die Tiere eine spezifische TBT-Toleranz entwickeln, die jedoch nicht genetisch verankert ist. Dies könnte beispielsweise über eine gesteigerte Synthese von Stressproteinen geschehen. Dann sollten sich die Effekte von Cadmium auf die unterschiedlich vorbehandelten Tiere nicht unterscheiden. Wenn eine physiologische Toleranz jedoch über maternale Effekte auf die Nachkommen übertragen wird, ist anhand der phänotypischen Reaktion kein Unterschied zu einer genetischen Adaptation zu erkennen (BELFIORE & ANDERSON, 2001). Eine dritte Möglichkeit bestünde darin, dass es zu einer allgemeinen Stresstoleranz der Population kommt. Diese könnte beispielsweise in einer Selektion auf Organismen mit niedrigem Grundstoffwechsel bestehen (KOEHN & BAYNE, 1989). Dann wäre es möglich, dass die Population auch eine erhöhte Toleranz gegenüber einem zweiten Stressor zeigt und die toxikologischen Effekte dementsprechend geringer als in nicht-vorbelasteten Populationen sind.

Bevor die Ergebnisse der Cd-Exposition in den beiden Zweitstressorexperimenten diskutiert werden, sollen an dieser Stelle die Ausgangsbedingungen der unterschiedlich vorbehandelten Populationen noch einmal kurz reflektiert werden.

Hinsichtlich der Life-Cycle Parameter können in der MGS I bis zur sechsten Generation kaum Unterschiede zwischen der GEN+LMK und der GEN+TBT Population festgestellt werden. Die Populationswachstumsraten weisen dabei in der sechsten Generation annähernd gleich hohe Werte in beiden Behandlungsgruppen auf. Weiterhin können noch keine Anpassungshinweise, wie das in den späteren Generationen der MGS I der Fall ist, gegenüber dem Stressor TBT festgestellt werden. Die Mikrosatellitenanalysen weisen außerdem auf keine dramatischen Effekte hinsichtlich der genetischen Diversität der exponierten Population

(GEN+TBT) hin. Allerdings können zahlreiche Abweichungen von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) an den einzelnen Mikrosatellitengenorten bei GEN+TBT beobachtet werden.

In der MGS III verhält es sich mit den Ausgangsbedingungen der beiden Populationen GEN+LMK und GEN+TBT deutlich anders. So wurden die Tiere der GEN+TBT Population über neun Generationen und gegenüber einer höheren TBT-Belastung vorexponiert. Es können deutliche Unterschiede zwischen den Life-Cycle Parametern der beiden Populationen sowie eine signifikante Abnahme der genetischen Diversität unter Schadstoffstress (GEN+TBT) ermittelt werden. Außerdem werden für die vorbelastete Population Hinweise auf eine Anpassung an den Stressor TBT in einem vollen Life-Cycle Experiment nach der vierten Generation beobachtet. Somit unterscheiden sich die Ausgangsbedingungen der jeweiligen Populationen für beide Zweitstressorstudien drastisch.

In den Experimenten kann deutlich gezeigt werden, dass die geringer und über einen kürzeren Zeitraum vorbelastete Population in der Lage ist, den Stressorwechsel auf Cadmium gut zu tolerieren. Diese Population weist in der MGS I keine signifikanten Effekte der TBT-Exposition auf die Fitness und die genetische Variabilität auf. In der ZSS I ist zwar deutlich der negative Effekt des Schwermetalls Cadmium auf die Mortalität und den mittleren Emergenzzeitpunkt zu erkennen und damit auch auf die Populationswachstumsraten (PWR), unabhängig von der Vorbelastung. Die TBT-vorbelastete Population ist nicht durch die Vorexposition in der Fähigkeit sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, negativ beeinflusst. Das bedeutet allerdings auch, dass keine Selektion gegenüber dem Schadstoff TBT stattgefunden hat, da die genetische Diversität auf einem gleich hohen Niveau geblieben ist. Weiterhin implizieren die Ergebnisse, dass die vorexponierte Population keine Mechanismen entwickelt hat, eine höhere Toleranz gegenüber Schadstoffen zu entwickeln. Die Vorbelastung war deshalb wahrscheinlich zu niedrig und zu kurz, um Veränderungen innerhalb der Populationsstruktur hervorzurufen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von RISTOLA ET AL. (2001) festgestellt, wobei Zuckmückenpopulationen, welche über drei Generationen mit 2,4,5-Trichlophenol vorexponierte wurden, nicht empfindlicher gegenüber dem Stressor 2,4,5-Trichlophenol waren, als die entsprechende Kontrollgruppe.

Bei der mit einer höheren TBT-Konzentration vorbelasteten und länger exponierten Population kann im Gegensatz dazu festgestellt werden, dass die nicht vorbelastete und die TBT-vorbelastete Population signifikant unterschiedliche PWR bei Cadmiumstress aufweisen. So ist in Gegenwart des Zweitstressors Cd die PWR der TBT-vorbelasteten

Population signifikant niedriger als die PWR der nicht vorbelasteten Population. Die TBT-vorexponierte Population ist durch die TBT-Exposition negativ beeinflusst und deshalb nur eingeschränkt in der Lage, sich an neue Umweltbedingungen anpassen zu können. Als Ursache kommt dabei wahrscheinlich die signifikant niedrigere genetische Diversität der GEN+TBT in den letzten Generationen der MGS III im Vergleich zur GEN+LMK in Betracht. So führt die erhöhte TBT-Exposition über zahlreiche Generationen durch erhöhte Mortalitäten und eine eingeschränkte Reproduktion zu kleineren effektiven Populationsgrößen und damit auch zu weniger Tieren, welche den Genpool der nächsten Generation aufbauen. Dieses kann auch auf Selektionsprozesse zurückgeführt werden.

Beim Vergleich der beiden Zweitstressorstudien wird die Tragweite der anschließenden Cd-Exposition deutlich sichtbar. Es gibt offensichtlich bei höheren Konzentrationen der Vorexponierung negative Effekte auf die Population, welche die genetische Vielfalt und die Fitness bei einem Schadstoffwechsel beeinflussen. Augenscheinlich werden drastische Effekte der Schadstoffexposition hauptsächlich auf die Mortalität und den mittleren Emergenzzeitpunkt festgestellt. Interessant ist allerdings, dass die Population weiterhin in der Lage ist, unter Standardbedingungen zu wachsen, allerdings wird infolge der Verringerung der genetischen Variabilität auch die Möglichkeit sich an neue Verhältnisse anzupassen dramatisch vermindert (BICKHAM ET AL., 2000; FRANKHAM, 2005). Somit ist von einer Gefährdung von Populationen durch Schadstoffe bereits bei Konzentrationen, bei denen noch keine dramatische Effekte auf die Fitness offensichtlich werden, auszugehen.

#### *Ökologische Konsequenzen und Implikationen für den Artenschutz*

Es kann angenommen werden, dass vorexponierte Populationen Schwierigkeiten haben, sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Für den Artenschutz kann dies bedeuten, daß bereits Effekte durch Schadstoffexposition in umweltrelevanten, niedrigen Konzentrationen auf die genetische Vielfalt von Populationen auftreten, bevor sie als komplettes Verschwinden von Arten wahrgenommen werden können. Es gibt deutliche Hinweise, dass Chemikalien das Potential besitzen, bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen die genetische Variabilität herabzusetzen. Dadurch würden die Anpassungsmöglichkeiten an sich verändernde Umweltbedingungen möglicherweise deutlich verschlechtert. Weiterhin werden durch die Verringerung des Genpools negative Prozesse wie z.B. Inzuchtdepression beschleunigt. In natürlichen Ökosystemen können Diversitätsverluste z.B. durch Migration genetisch diverserer Individuen ausgeglichen werden. Aufgrund des menschlichen Handels wird allerdings diese Möglichkeit des Genflusses zwischen Populationen immer stärker durch



Habitatzerschneidung oder gezielte Entnahme von Einzelorganismen (z.B. durch Bejagung) negativ beeinflusst. Deshalb muss es Ziel des Naturschutzes sein, genetische Verarmung von Freilandpopulationen frühzeitig zu erkennen und dieser mit geeigneten Maßnahmen zu begegnen. Dabei sollten auch Arten betrachtet werden, die bis heute nicht im Focus des Artenschutzes stehen.

### 4.3 Freilandstudien

Alle bisherigen Untersuchungen wurden im Labor durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass Schadstoffe wie TBT oder Cadmium die genetische Diversität von *Chironomus*-Populationen negativ beeinflussen können.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse einer Freilandstudie gezeigt, in der nicht nur die genetische Struktur von zwei Arten der Gattung *Chironomus* (*C. riparius* und *C. piger*), sondern als die Artzusammensetzung innerhalb dieser Gattung in kleinen Fließgewässern im Nordwesten Baden-Württembergs untersucht wurde (Kap. 7.1). Um Aussagen über die Toxizität dieser Sedimente zu erhalten, wurden mit *C. riparius* zusätzlich Biotests im Labor durchgeführt (Kap. 7.2). Die Quantifizierung der Organozinnverbindungen in Sedimenten an insgesamt 14 dieser Standorte sowie zusätzlich in ausgewählten Flüssen Baden-Württembergs (Kap. 7.3) erlaubt schließlich unter anderem Aussagen zur Relevanz der eingesetzten TBT-Konzentrationen im Rahmen der MGS I-III).

#### 4.3.1 Artzusammensetzung und genetische Diversität bei *Chironomus* im Freiland

Wie in allen anderen ökologischen Gemeinschaften auch, wird die Zusammensetzung von benthischen Makroinvertebraten-Gesellschaften von einer komplexen Kombination lokaler Umweltbedingungen (DOUGHERTY & MORGAN, 1991), historischen Faktoren (RICKLEFS, 1987) und lokalen biotischen Interaktionen (MINSHALL & PETERSEN, 1985, KOHLER, 1992) beeinflusst. Besonders auf kleinräumiger Ebene ist gezeigt worden, dass biotische Interaktionen die regionale Artverteilung beeinflussen kann. Unter den Umweltvariablen werden allgemein physikalische und hydrochemische Bedingungen als wichtig angesehen (PARRIS, 2004); jedoch wurde gezeigt, dass anthropogene Veränderungen, wie Schadstoffeintrag und Habitatveränderungen, limnische Artgesellschaften verändern können (MURPHY & DAVY-BROWKER, 2005).

Als Sedimentbewohner werden Chironomidenlarven allgemein als vielversprechende biologische Indikatoren der Sediment- und Wasserqualität betrachtet, insbesondere aufgrund ihrer weiten Verbreitung und großen Häufigkeit in einer Vielzahl verschiedener limnischer Ökosysteme (LINDEGAARD, 1995). Insbesondere Arten der Gattung *Chironomus* werden routinemäßig als Modellarten in der Ökotoxikologie eingesetzt (LINDEGAARD, 1995). Die Eignung als Umweltindikator im Freiland hängt jedoch allgemein von dem Einfluss ab, den die Schadstoffbelastung auf die lokale Artzusammensetzung ausübt. Bisherige Studien über die Beeinflussung der Artzusammensetzung von Zuckmücken konzentrieren sich jedoch

meist entweder auf „natürliche“ Faktoren oder auf den anthropogenen Habitat-Einfluss (MOUSAVI, 2002, RAE, 2004, NYMAN ET AL., 2005, REAL & PRAT, 2000).

In der vorgestellten Studie werden daher die meisten Faktoren mit einbezogen, von denen bekannt ist, dass sie Süßwasserlebensgemeinschaften beeinflussen können. Um die lokale Populations- und Artzusammensetzung der Gattung regional erforschen zu können, wird eine etwa 40 x 60 km große Region in der oberen Rheinebene ausgewählt (Abb. 22). Durch die hohe Bevölkerungsdichte und die Bedeutung als wichtiges Industriezentrum wird dieses Gebiet für die Untersuchung sowohl natürlicher als auch anthropogener Einflüsse als besonders geeignet erachtet.

Bisherige ökologische Freilanduntersuchungen konnten durch die schwierige Artbestimmung in dieser Gruppe nicht auf Speziesniveau durchgeführt werden und waren daher meist auf höhere taxonomische Ebenen oder ‚Larvalformen‘ beschränkt (NYMAN ET AL., 2005). Cytotaxonomische Untersuchungen an den Polytänchromosomen von *Chironomus* waren bisher die einzig sichere Methode zur Artdetermination innerhalb der Gattung. Durch den hohen Arbeitsaufwand und das benötigte Fachwissen haben jedoch nur wenige ökologische Untersuchungen diese Methode verwendet (BUTLER ET AL., 2000).

In dieser Studie werden daher molekulargenetische Methoden zur Artbestimmung von *Chironomus*-Larven aus dem Freiland entwickelt und angewandt. Ein DNA-taxonomischer Ansatz wird gewählt, um ‚molekular definierte operationale taxonomische Einheiten‘ - *molecularly defined operational taxonomic units*- (MOTU) (BAXTER, 2004) zu definieren. Um die gesammelten Freilandproben schnell und sicher identifizieren und den MOTU zuordnen zu können, wird ein DNA-Barcoding-Ansatz gewählt. Zusätzlich zur Artzusammensetzung wird untersucht, inwieweit die genetische Diversität der Schwesterarten *Chironomus riparius* und *Chironomus piger* durch natürliche Umweltfaktoren und anthropogene Einflüsse beeinträchtigt wird. Hierfür werden von allen durch Barcoding identifizierten *C. riparius* und *C. piger*-Individuen Mikrosatellitenanalysen durchgeführt (vgl. Kap. 5.2).

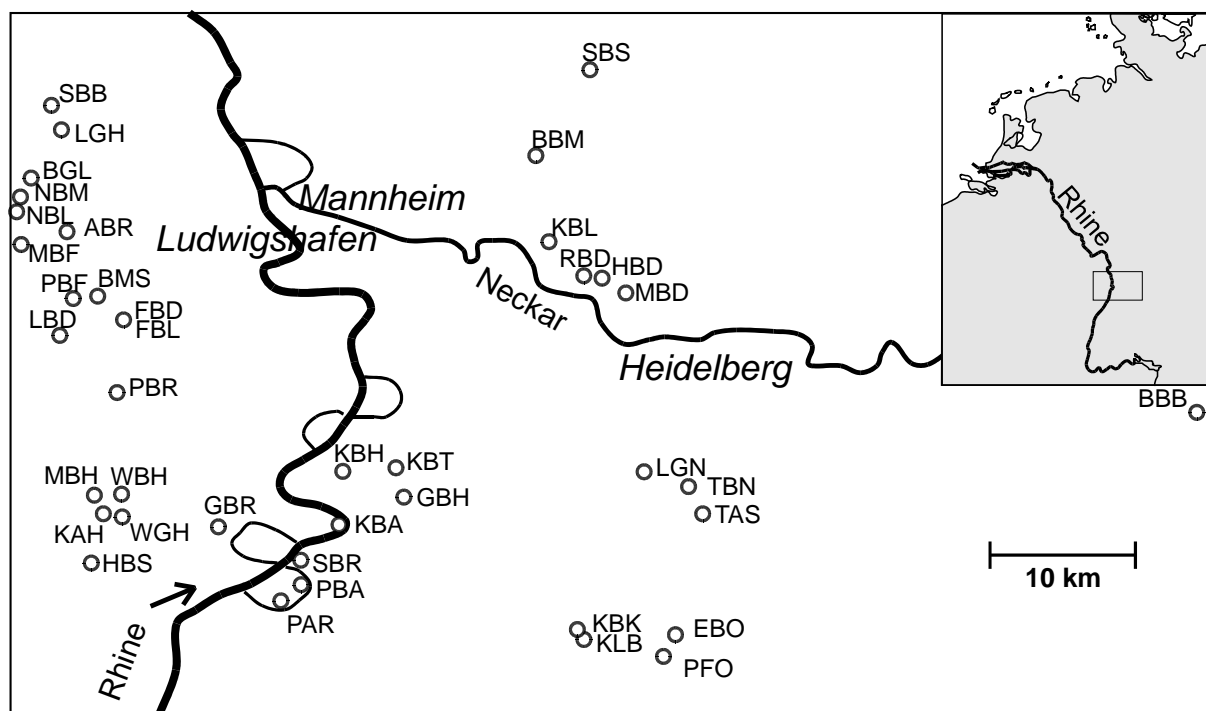
In der Studie sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Sind molekulargenetische Methoden dazu geeignet, *Chironomus*-Larven aus dem Freiland sicher in MOTUs einzuordnen und beschriebenen Arten zuzuordnen?
- 2) Gibt es nichtzufällige Muster in den beobachteten Artverteilungsmustern und können diese durch ökologische Faktoren erklärt werden?
- 3) Spielen anthropogene Einflüsse, insbesondere Schadstoffkontaminationen, eine Rolle bei der Artzusammensetzung innerhalb von *Chironomus*-Gesellschaften?

- 4) Wird die genetische Diversität von *Chironomus*-Arten durch Schadstoffbelastung beeinflusst?

*Untersuchungsgebiet, Probennahme und Aufnahme ökologischer Parameter*

Das Untersuchungsgebiet befindet sich in der Mitte der oberen Rheinebene in einem Viereck von etwa 40 x 60 km Kantenlänge zwischen 49°09' - 49°33'N und 8°10' - 8°13'E (Abb. 22). Es umfasst die Rheinebene und wird im Westen vom Pfälzer Wald und im Osten vom Odenwald begrenzt. Die Region ist hydrologisch durch das Vorhandensein vieler Gräben, kleinerer, langsam fließender Flüsse und Bäche, Altarme und den Hauptstrom des Rheins selbst charakterisiert.



**Abbildung 22:** Verteilung der Sammelpunkte in der Rhein-Neckarregion.

Die Probennahme im Freiland fand im Zeitraum zwischen Mitte September und November 2004 statt. Es wurde daher hauptsächlich die überwinternde Generation der *Chironomus*-Larven berücksichtigt. Innerhalb des gesamten Gebietes wurden Gewässer besammelt und an 39 Standorten konnten *Chironomus*-Larven gefunden werden (Tab. 23). Am Gewässergrund wurde eine Fläche von 1 x 1 m mit einem Netz (30 x 40 cm) von 0,5 mm Maschenweite besammelt. Alle gefundenen L4-Larven wurden lebend ins Labor gebracht, den klassisch verwendeten morphologischen Larvaltypen zugeordnet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

An jeder Sammelstelle wurden eine Vielzahl ökologischer und struktureller Parameter aufgenommen. (vgl. Tab. 24). An habitatstrukturellen Parametern wurden Makrophyten-

bewuchs, Sedimentart, Korngrößenverteilung und Kohlenstoffgehalt im Sediment, Art des Wasserkörpers, Tiefe und Fläche des Gewässers, Beschattungsgrad und die Art der umgebenden Landschaft berücksichtigt.

**Tabelle 23:** Probenahmestellen der Sedimente (und deren Kürzel) sowie Anzahl der gefundenen L4-Larven von *Chironomus riparius* (Abkürzung und geographische Lage mit Hoch- und Rechtswert).

Standort	Abkürzung	Geographische Position	N (Larven)
Kandelbach bei Ladenburg	<i>KBL</i>	N49°28'31"/E08°37'34"	7
Kothlachgraben bei AS Hockenheim	<i>KBH</i>	N49°19'78"/E08°29'48"	26
Kraichbach bei Talhaus	<i>KBT</i>	N49°19'88"/E08°31'49"	19
Leimbach bei Brühl	<i>LBB</i>	N49°23'56"/E08°31'69"	-
Mühlbach bei Dossenheim	<i>MBD</i>	N49°26'45"/E08°40'04"	11
Humpelsgraben bei Dossenheim	<i>HBD</i>	N49°26'99"/E08°39'25"	8
Kriegbach bei Altlußheim	<i>KBA</i>	N49°17'70"/E08°29'45"	5
Mittelgraben bei Fußgönheim	<i>MBF</i>	N49°28'26"/E08°17'52"	13
Schanzengraben bei Rheinhausen	<i>SBR</i>	N49°16'50"/E08°27'77"	12
Tümpel bei Nussloch	<i>TBN</i>	N49°19'24"/E08°42'48"	10
Affengraben bei Ruchheim	<i>ABR</i>	N49°28'66"/E08°19'24"	12
Tümpel am Schlangengrundgraben	<i>TAS</i>	N49°18'15"/E08°42'99"	6
Philipsburger Altrhein	<i>PBA</i>	N49°15'49"/E08°28'20"	5
Kriegbach bei St. Leon	<i>KBS</i>	N49°14'75"/E08°34'00"	-
Neugraben bei Maxdorf	<i>NBM</i>	N49°29'51"/E08°17'36"	9
Neugraben bei Lambsheim	<i>NBL</i>	N49°29'98"/E08°17'46"	13
Brückelgraben bei Lambsheim	<i>BGL</i>	N49°30'73"/E08°17'86"	13
Lackgraben bei Hessheim	<i>LGH</i>	N49°32'59"/E08°19'01"	23
Landgraben bei Nussloch	<i>LGN</i>	N49°19'74"/E08°40'89"	7
Schrakelbach bei Beindersheim	<i>SBB</i>	N49°33'48"/E08°18'59"	15
Sulzbächle bei Sulzbach	<i>SBS</i>	N49°34'88"/E08°38'82"	21
Rombach bei Dossenheim	<i>RBD</i>	N49°27'12"/E08°38'53"	13
Kraichbach bei Kronau	<i>KBK</i>	N49°13'70"/E08°38'43"	7
Kleiner Bach bei Kronau	<i>KLB</i>	N49°13'58"/E08°38'57"	9
Erlengraben bei Östringen	<i>EBO</i>	N49°13'58"/E08°42'03"	6
Graben bei Hockenheim	<i>GBH</i>	N49°18'86"/E08°31'84"	10
Breitenbach bei Breitenbrunn	<i>BBB</i>	N49°22'06"/E08°01'60"	12
Philipsburger Altrhein	<i>PAR</i>	N49°14'74"/E08°27'48"	10
Bach bei Mutterstadt	<i>BMS</i>	N49°26'28"/E08°20'36"	12
Floßbach bei Dannstadt	<i>FBD</i>	N49°26'18"/E08°19'50"	10
Lachgraben bei Dannstadt	<i>LBD</i>	N49°24'87"/E08°18'99"	11
Floßbach bei Limburgerhof	<i>FBL</i>	N49°25'48"/E08°21'34"	8
Hainbach bei Schwegenheim	<i>HBS</i>	N49°16'38"/E08°20'04"	8
Wooggraben bei Harthausen	<i>WGH</i>	N49°18'02"/E08°21'25"	11
Modenbach bei Harthausen	<i>MBH</i>	N49°18'20"/E08°20'64"	9
Graben bei Römerberg	<i>GBR</i>	N49°17'59"/E08°24'91"	5
Kläranlage bei Hanhofen	<i>KAH</i>	N49°18'95"/E08°21'38"	-
Woogbach bei Hanhofen	<i>WBH</i>	N49°18'87"/E08°20'17"	6
	<i>BBM</i>	N49°52'68"/E08°61'42"	13
	<i>PBF</i>	N49°43'63"/E08°32'49"	12
	<i>PBR</i>	N49°37'89"/E08°35'12"	14
	<i>PFO</i>	N49°21'37"/E08°69'36"	11
			<b>Σ 432</b>

Folgende physikochemische Parameter wurden aufgenommen: Leitfähigkeit, Wassertemperatur, Sauerstoffsättigung (WTW Multi 340i Multimeter); Ammonium-, Nitrit- und Phosphatgehalt wurden kalorimetrisch durchgeführt (Aquamerk<sup>®</sup> Quicktest); Chlorid-, CaCO<sub>3</sub>- und Nitratkonzentrationen im Gewässer wurden mit Farbtests (Merkoquant<sup>®</sup>) bestimmt; des weiteren wurde die Fließgeschwindigkeit gemessen (AMR ALMEMO<sup>®</sup>).

Zur Bestimmung der Sedimenttoxizität wurden chemische Elementanalysen, sowie Biotests im Labor mit einem Laborstamm von *Chironomus riparius* durchgeführt (Kap. 7.2).

Zur Charakterisierung der lokalen Klimaverhältnisse wurden 19 biologisch bedeutsame Klimaparameter aus der BIOCLIM-Umweltdatenbank extrahiert (Auflösung: 0,5 min) und in das Programm DIVA-GIS<sup>®</sup> 4.2 einbezogen.

### *Genetische Analysen*

Zur Identifizierung der im Untersuchungsgebiet vorkommenden evolutionären Linien wird das mitochondriale Cytochrom Oxidase I-Gen (COI) von 432 *Chironomus*-Larven von 39 Standorten sequenziert. Hierzu wird folgender Reaktionsansatz verwendet: PCR = 5 ng Templat, 1x Reaktionspuffer, 3,33 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,17 mM dNTPs, 0,13 µl je Primer (10 nM) und 0,7 units Gibco<sup>™</sup> *Taq*- Polymerase; Sequenzierung = 1 µl (10 ng) DNA, 3,8 µl „Big Dye“ Sequenziermix (Perkin Elmer), 0,5 µl Primer (Forward: TCG AGC AGA ATT AGG ACG ACC, Reverse: AGG ATC ACC CCC ACC AGC AGG), 4,7 µl VE. Die Sequenzen werden mit einem Sequenzierer Model 377 (ABI Prism<sup>®</sup>) photometrisch detektiert oder auf einen CEQ 2000 Kapillarsequenzierer (Beckman Coulter<sup>®</sup>) aufgetragen.

Desweiteren werden von 100 für den molekulartaxonomischen Ansatz ausgewählten Tieren Sequenzierungen des Cytochrom b-Gens (*cyt b*) durchgeführt. Hierfür werden zur Amplifizierung 15µl Master-Mix verwendet, bestehend aus: 0,13 mM dNTPs, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Reaktionspuffer, 0,4 µM je Primer (10 nM) (Forward: TAT GTT TTA CCA TGA GGA CAA ATA TC, Reverse: TAT TTC TTT CTT ATG TTT TCA AAA C) und 0,7 U *Taq* Polymerase. Die Sequenzierung erfolgt ebenfalls auf einem CEQ 2000 Kapillar-Sequenziergerät.

Von den 100 ausgewählten Individuen werden weiterhin Polytänchromosomen-Analysen durchgeführt, um die molekulargenetisch identifizierten MOTUs klassisch bestimmten Arten zuordnen zu können. Hierfür wird der vordere Teil des Larvarkörpers abgetrennt (der hintere Teil wurde für die DNA-Extraktion verwendet) und die Speicheldrüsen herauspräpariert. Diese werden anschließend in 50 % Essigsäure fixiert. Die Chromosomen werden mit 2 % Orcein-Essigsäure für 15 min angefärbt und auf Objektträgern fixiert. Die Artdetermination

wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Wolfgang Wülker, Freiburg im Breisgau, durchgeführt.

Aufgrund der auch mittels DNA-Barcoding schwierigen Unterscheidung zwischen den Schwesterarten *C. riparius* und *C. piger* wird weiterhin bei allen untersuchten Proben, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer der beiden Arten zuzuordnen waren, ein Restriktionsverdau des nukleären ITS-1 (internal transcribed spacer)-Fragments durchgeführt. Hierfür werden 10 µl zuvor amplifizierten ITS-Amplikons 2 h bei 60° C mit dem Restriktionsenzym MWO I geschnitten und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Zwischenberichte 1 und 2). Mit den sicher als *C. riparius* oder *C. piger* identifizierten Arten werden anschließend Mikrosatellitenanalysen durchgeführt (vgl. Kap. 5.2).

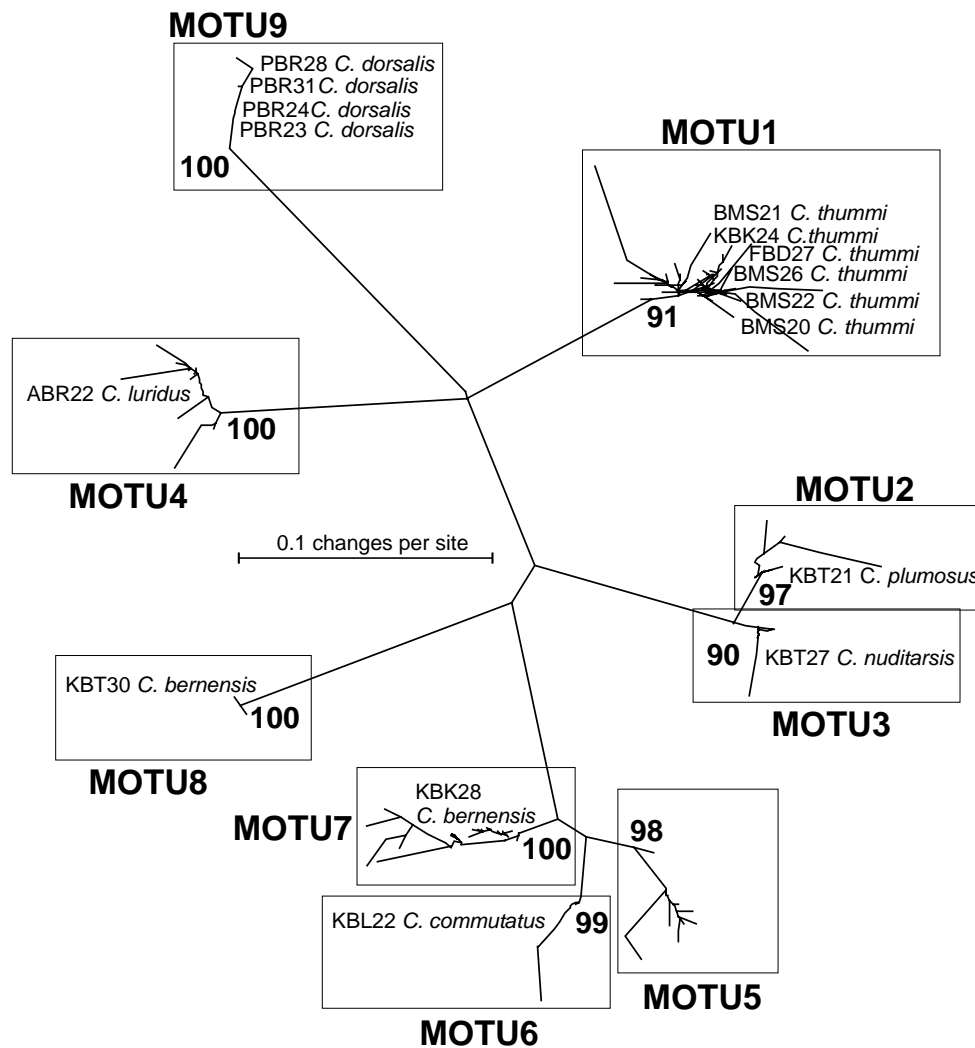
### *Statistische Auswertung*

Die MOTU werden anhand der Sequenzdivergenz bestimmt. Dazu werden paarweise Abschätzungen der Sequenzdivergenz durchgeführt. Um die Ergebnisse zu visualisieren, wird ein ungewurzelter *neighbour-joining*- Baum in dem Programm PAUP<sup>®</sup> 4.10b erstellt. MOTU werden als die umfassendsten terminalen Gruppen mit einer Bootstrap-Unterstützung von > 90 % definiert. Es wird anschließend untersucht, inwieweit sich die MOTU-Zuordnung mit der cytotaxonomischen Artbestimmung in Deckung bringen läßt. Weiterhin wurden die COI-Sequenzen im Programm TaxI (STEINKE ET AL. 2005) den MOTU zugeordnet. Neben dem polytänchromosomalen Abgleich werden publizierte Sequenzen zum Referenzdatensatz zugeordnet.

Da die Anzahl der aufgenommenen Variablen (n = 64, Tab. 24) die Zahl der Standorte übertraf, wird die Information jeder Gruppe von Variablen separat mittels Hauptkomponenten-analyse (PCA = *principal component analysis*) zusammengefasst (Tab. 25). Um Trends und Muster innerhalb der Artverteilung im Gebiet zu identifizieren, werden zwei Ordinationstechniken berücksichtigt. Erst wird die *Detrended Correspondence Analysis* (DCA) angewandt, um die Arten zu ordnieren. Die Arthäufigkeiten werden log-transformiert (n+1) und seltene Arten werden heruntergewichtet. Die Analysen werden im Programm STATISTICA<sup>®</sup> 6.0 durchgeführt. Zweitens werden im Programm CANOCO<sup>®</sup> for Windows, Version 4.5, Kanonische Korrespondenzanalysen durchgeführt, um potentielle Faktoren zu identifizieren, welche die Artzusammensetzung im untersuchten Gebiet beeinflussen könnten. Es werden nur Variablen mit einem Signifikanzlevel von  $p < 0,001$  bei den endgültigen Analysen berücksichtigt.

Um zu testen, ob die paarweisen Vorkommen von Arten zufällig verteilt sind, wird ein Permutationsverfahren in einer *Presence/Absence* Matrix angewandt. Die beobachtete

Statistik wird gegen eine Nullhypothese einer zufällig verteilten Artzusammensetzung, simuliert durch 9999 Permutationsschritte, getestet. Um auf unterschiedliche Präferenzen in den Umweltansprüchen zwischen den verschiedenen Arten zu testen, werden die PCA-Achsen (Umweltdaten) in einem ANOVA-Design getestet. Es werden hierfür ausschließlich Arten, die an mindestens drei Standorten vorkommen, berücksichtigt. Signifikante Unterschiede zwischen den Artenpaaren werden mittels *post-hoc* Bonferroni-Test ermittelt. Insgesamt werden 432 *Chironomus*-Larven genetisch untersucht, davon werden 73,2 % der *thummi*-Larvalform und 26,8 % der *plumosus*-Form zuzuordnen. 190 unterschiedliche COI-Haplotypen werden identifiziert und in die Analysen einbezogen. Der Neighbour-Joining-Baum zeigt neun verschiedene terminale Gruppen mit mindestens 90 % Bootstrap-Unterstützung (Abb. 23). Die Sequenzdivergenzen innerhalb der identifizierten MOTU variieren zwischen 0.004 (MOTU8) und 0.081 (MOTU6).

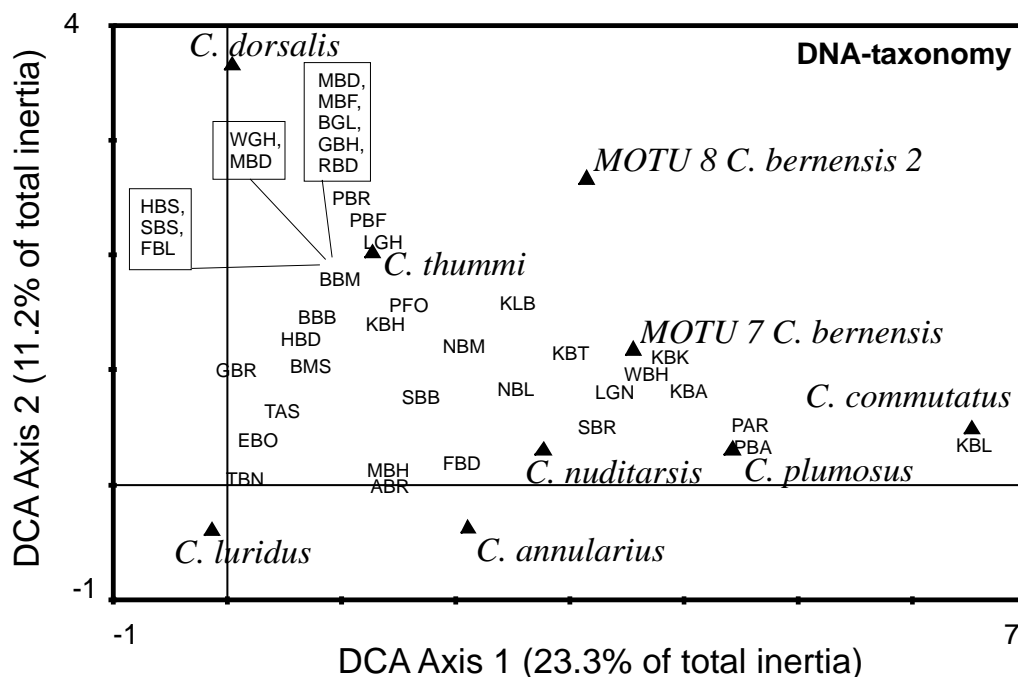


**Abbildung 23:** Ungewurzelter Neighbour-Joining Baum der ML-Distanzen zwischen den *Chironomus* COI-Haplotypen.



Dagegen beläuft sich die geringste Distanz zwischen den MOTU auf 0.057 (zwischen MOTU2 und MOTU3). Jede MOTU kann einer chromosomal identifizierten Art zugeordnet werden. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, wird nur eine chromosomale Art (*C. bernensis*) zwei hochdivergenten Linien zugeordnet (MOTU 7 und MOTU 8; Abb. 23). Für MOTU 5 existiert keine chromosomale Zuordnung. Die durch COI-Barcoding identifizierten Haplotypen können in allen Fällen bis auf einen eindeutig einer MOTU zugeordnet werden. Während mit der morphologischen Zuordnung der Individuen zu den klassisch erkannten Larvalformen keine signifikanten Muster in der Artzusammensetzung erkannt werden, kann sowohl durch den chromosomalen als auch den molekulargenetischen Artbestimmungsansatz eine genauere Auflösung erzielt werden, wobei sich die beiden letztgenannten Ansätze kaum in ihren Aussagen unterscheiden.

Über 60% der untersuchten Tiere können der *thummi*-Gruppe zugeordnet werden. Innerhalb dieses Taxons werden je 50 % *C. riparius*- und *C. piger*-Individuen mittels Restriktionsverdau des ITS-1 Fragments und der Mikrosatellitenanalysen identifiziert. Acht der insgesamt 251 gefundenen *thummi*-Larven können nicht mit einer Wahrscheinlichkeit von > 90 % einer der beiden Arten zugeordnet werden. Von diesen zeigen jedoch nur zwei Tiere eine deutlich intermediäre genetische Komposition an den Mikrosatellitenloci. Die auf den molekularen Daten basierende DCA extrahierte zwei Achsen mit Eigenwerten von über 0,1. Diese Achsen repräsentieren mehr als 33 % des gesamten Datensatzes (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Community structure der DNA-taxonomisch bestimmten *Chironomus*-Larven (Detrended Correspondence Analysis).

Achse 1 stellt Sammelpunkte gegenüber, an denen auf der einen Seite *C. commutatus*, *C. plumosus* and *C. bernensis* dominieren und auf der anderen Seite *C. dorsalis* and *C. luridus* überwiegen. Achse 2 unterscheidet zwischen den beiden letztgenannten Arten. Die Anzahl der identifizierten Arten liegt zwischen 1 und 5 (mit einem Mittelwert von 2,10 +/- 1,19). Ein Überblick über die 64 aufgenommenen ökologischen Parameter ist in Tabelle 24 gegeben.

Tabelle 25 faßt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse der jeweiligen Kategorien zusammen. Die PCA der Habitatstruktur resultiert in drei signifikanten Achsen. Achse 1 unterscheidet zwischen großen Gewässern in naturnahen Umgebungen und Kleingewässern in stark anthropogen geprägter Landschaft (Siedlungs-, Industrienähe). Die zweite Achse unterteilt in sonnige, pflanzenreiche und stark beschattete, makrophytenarme Gewässertypen. Achse 3 stellt einen 'hydroperiodischen' Gradienten von ephemeren Kleingewässern bis hin zu größeren Flüssen und Altarmen mit einer sehr geringen Austrocknungswahrscheinlichkeit dar. Diese PCA-Achsen stellen zusammen 66,8% der Habitatstrukturvariablen dar.

Die PCA-Achse 1 der physikochemischen Parameter stellt einen Gradienten von Leitfähigkeit und CaCO<sub>3</sub>-Gehalt dar, während Achse 2 mit der Sauerstoffsättigung und der Strömungsgeschwindigkeit zusammenhängt. Beide Achsen repräsentieren zusammengekommen 57,6 % der Gesamtvarianz im Datensatz.

Der organische Gehalt im Sediment variiert zwischen 3 und 86 %. Weiterhin gibt es deutliche Unterschiede in der Korngrößenverteilung. Die Sediment-PCA-Achse 1 separiert Standorte mit feinem gegenüber solchen mit eher grobem Sediment. Achse 2 stellt organisch reiche eher sandigen Sedimenten gegenüber. Die dritte Achse steht mit dem Vorhandensein von Feinsediment in Verbindung. 75 % der Gesamtvarianz werden durch diese 3 Achsen zusammengefaßt.

**Tabelle 24:** Aufgenommene Umweltparameter mit Abkürzungen und beschreibender Statistik

Variablensatz	Variable	Abk.	Mittelwert	SD	Median	Min.	Max.
ökotoxikologische Daten n = 19 (ECOTOX)	Al (µg/kg)	Al	35132.89	11688.62	33750.00	7150.00	70600.00
	Cr (µg/kg)	Cr	51.92	17.90	52.10	10.50	104.10
	Mn (µg/kg)	Mn	446.76	319.13	406.00	51.00	1670.00
	Fe (µg/kg)	Fe	16850.26	7368.85	16150.00	1640.00	34400.00
	Co (µg/kg)	Co	8.99	2.93	8.90	1.90	15.10
	Ni (µg/kg)	Ni	22.81	8.51	21.70	7.30	48.60
	Cu (µg/kg)	Cu	44.74	48.95	28.55	6.20	250.60
	Zn (µg/kg)	Zn	274.99	209.39	194.50	33.60	884.00
	As (µg/kg)	As	23.32	28.45	12.50	2.10	129.20
	Cd (µg/kg)	Cd	0.71	0.79	0.34	0.07	2.95
	Sn (µg/kg)	Sn	4.54	2.71	3.80	1.40	13.50
	Pb (µg/kg)	Pb	69.41	69.45	39.60	15.00	341.00
	Rh (µg/kg)	Rh	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
	Mittlerer Schlupfzeitpunkt	EMERGENCE	18.54	0.70	18.51	16.76	19.99
	Anzahl produzierter Eigelege	CLUTCHES	0.91	0.18	0.90	0.47	1.29
	Gelegegröße	CLUTCHSIZE	529.90	45.85	526.22	448.59	632.54
	Anteil unfruchtbarer Eigelege	INFEGGS	17.26	21.16	11.00	0.00	100.00
	Mortalität (%)	MORTAL	7.96	8.71	5.33	0.00	44.00
	Weibchenanteil (%)	FEMALES	48.61	6.04	48.00	39.00	66.00
Habitatstruktur n = 7 (HABSTRUC)	Makrophytenbewuchs	MACROPHYT	1.32	0.84	2.00	0.00	2.00
	Sedimentart (kategorisch)	SEDIMENT	0.13	0.34	0.00	0.00	1.00
	Gewässerart (kategorisch)	WATERBODY	1.47	0.80	1.00	0.00	4.00
	Gewässerbreite (kategorisch)	BREADTH	1.89	0.39	2.00	0.00	2.00
	Tiefe (kategorisch)	DEPTH	0.26	0.45	0.00	0.00	1.00
	Umgebende Landschaft	LANDSCAPE	0.50	0.89	0.50	0.00	3.00
	Beschattungsintensität	SHADOW	1.21	0.66	1.00	0.00	2.00
Sediment Variablen n = 8 (SEDIMENT)	Organischer Gehalt im	ORGCNT	16.03	12.91	12.57	3.06	85.80
	Korngröße >4mm (%)	4MM	12.76	12.40	10.00	0.67	66.67
	Korngröße <4mm>2mm (%)	2MM	8.86	5.80	7.33	0.67	28.00
	Korngröße <2mm>1mm (%)	1MM	9.38	5.20	10.00	0.67	22.00
	Korngröße <1mm>630µm (%)	630UM	11.35	6.97	9.33	3.33	34.00
	Korngröße <630µm>500µm (%)	500UM	18.23	12.19	16.00	0.00	50.67
	Korngröße <500µm>250µm (%)	250UM	20.60	12.21	19.33	0.67	50.67
Korngröße <250µm (%)	<250UM	18.86	18.95	10.00	1.33	80.00	
Bioklima n = 19 (CLIMATE)	Höhe über Meeresspiegel (m)	ALTITUDE	110.00	30.06	100.50	93.00	242.00
	Mittlere Temp. (°C)	ANNTEMP	10.22	0.14	10.22	9.84	10.43
	Monatl. Temperaturspanne (°C)	TEMPRANGE	8.67	0.04	8.67	8.58	8.78
	Isothermie (°C)	ISOTERM	32.95	0.18	32.94	32.67	33.27
	Jahreszeitl. Temp.	SEASONTEMP	676.30	3.86	676.73	668.98	682.38
	Max Temp. wärmster Monat	MAXWARM	24.69	0.20	24.65	24.10	25.00
	Min. Temp. kältester Monat (°C)	MINCOLD	-1.63	0.15	-1.60	-2.30	-1.50
	Jahrestemperaturspanne (°C)	ANNRANGE	26.31	0.11	26.35	26.10	26.50
	Mittl. Temp. feuchteste	MTEMPWET	18.46	0.17	18.48	18.05	18.68
	Mittl. Temp. trockenste	MTEMPDRY	3.07	0.14	3.10	2.53	3.27
	Mittl. Temp. wärmste Jahreszeit	MTEMPWARM	18.46	0.17	18.48	18.05	18.68
	Mittl. Temp. kälteste Jahreszeit	MTEMPCOLD	1.84	0.13	1.86	1.37	1.98
	Jährl. Niederschlag (mm)	ANNPREC	659.45	23.09	664.50	617.00	701.00
	Niederschlag feuchtester Monat	PRECWET	75.97	4.06	77.00	69.00	83.00
	Niederschlag trockenster Monat	PRECDRY	41.89	1.71	42.00	39.00	45.00
	Jahreszeitl. Niederschlag (mm)	SEASONPREC	20.11	0.89	19.73	18.95	21.77
	Mittl. Niederschlag feucht.	MPRECWET	211.76	8.74	214.00	197.00	228.00
	Mittl. Niederschlag trock.	MPRECDRY	130.84	4.55	132.00	122.00	139.00
	Mittl. Niederschlag wärm.	MPRECWARM	211.76	8.74	214.00	197.00	228.00
Mittl. Niederschlag kält. Jahresz.	MPRECCOLD	141.39	4.14	142.50	134.00	149.00	
Physikochemische Parameter n = 11 (PHYSICHEM)	pH	PH	7.70	0.39	7.68	6.87	8.70
	Leitfähigkeit (µS/cm)	CONDUCT	845.76	455.45	886.50	118.00	2030.00
	Strömungsgeschwindigkeit (m/s)	VELOCITY	0.06	0.10	0.02	0.00	0.41
	Wassertemperatur (°C)	H2OTEMP	9.25	2.88	8.55	4.40	15.50
	O <sub>2</sub> (mg/L)	O2	6.93	2.62	7.05	0.60	11.80
	Nitrat (mg/L)	NITRATE	21.97	81.55	0.00	0.00	500.00
	Nitrit (mg/L)	NITRITE	0.16	0.18	0.10	0.00	1.00
	Phosphat (mg/L)	PO4	0.79	0.72	0.50	0.00	3.00
	Ammonium (mg/L)	NH4	1.07	1.73	0.50	0.00	7.00
CaCO <sub>3</sub> (mg/L)	CACO3	269.81	134.39	373.80	53.40	462.80	
Chlorid (mg/L)	CL	16.03	12.91	12.57	3.06	85.80	

**Tabelle 25:** Ergebnisse der PCA mit den aufgenommenen Umweltfaktoren

Datensatz	PCA-Achse	Eigenwert	% der tot. Varianz	Variable	Achsenkorrelation
ökotoxikologische Daten (ECOTOX)	1	4.17	32.1	Co	-0.871
				Ni	-0.861
				Cr	-0.859
				Fe	-0.797
	2	3.07	23.6	Cd	-0.845
				Zn	-0.797
				Pb	-0.664
	3	1.86	14.27	Sn	0.820
				Cu	0.783
Habitatstruktur (HABSTRUC)	1	2.09	29.09	BREADTH LANDSCAPE	-0.742 0.750
	2	1.45	20.70	MACROPHYT SHADOW	-0.719 0.691
	3	1.19	17.00	WATERBODY	-0.691
Sedimentcharakteristik (SEDIMENT)	1	2.71	33.91	2MM	0.798
				1MM	0.897
				<250UM	-0.786
	2	2.11	26.35	ORGCNT	-0.852
				630UM	0.737
				4MM	-0.712
3	1.18	14.70	250UM	0.902	
Klimadaten (CLIMATE)	1	10.30	51.53	PRECDRY	-0.896
				PRECWET	-0.888
				ANNPREC	-0.887
				MPRECWET	-0.868
				MPRECWARM	-0.868
				SEASONTEMP	-0.867
				ISOTERM	0.843
				MPRECCOLD	-0.784
				ANNTEMP	-0.783
	2	6.35	31.78	ALTITUDE	-0.961
				MINCOLD	0.941
				MTEMPCOLD	0.866
				MTEMPDRY	0.839
				TEMPRANGE	0.872
Physikochemische Parameter (PHYSICHEM)	1	3.41	28.39	CONDUCT	0.892
				CACO3	0.864
	2	1.94	16.19	O2	-0.835
				VELOCITY	-0.592
				NH4	-0.761
3	1.564	13.04	PO4	-0.606	

Die Spanne der ermittelten Elementkonzentrationen übertrifft in den meisten Fällen eine Größenordnung, mit einer recht großen Variationsbreite zwischen den einzelnen Standorten. Es werden weiterhin signifikante ökotoxikologische Effekte im Sedimentbiotest ermittelt (Kap. 7.2). Jedoch tragen die ökotoxikologischen Parameter nicht zu den signifikanten ECOTOX PCA-Achsen bei. Diese stellen Gradienten von Schwermetallen dar (zum Beispiel Fe, Co, Ni, Cr). Die ersten drei Achsen stellen 70 % der Gesamtvariation im Datensatz dar. Die Variation in den Klimadaten war mit höchstens 1°C Temperaturdifferenz und 17 % Niederschlagsmengendifferenz zwischen den Standorten relativ gering. Die Klimaachse 1 stellt einen Niederschlagsgradienten dar, während Achse 2 die Varianz in den mittleren

Wintertemperaturen repräsentiert. Achse 3 repräsentiert die mittlere monatliche Temperaturspanne. Die drei Achsen stellen 92,9 % der Variation in den Klimavariablen dar. Die multiple Regression aller PCA-Achsen der Umweltparameter auf die *sample site scores* der DCA-Achsen 1 und 2 zeigt nur für die erste Achse signifikante Korrelationen (Tab. 26). Die Variablen HABSTRUC PCA3 (temporäre gegen permanent wasserführende Gewässer,  $\beta = 0.495$ ,  $p < 0.000$ ), HABSTRUC PCA2 (sonnenbeschienene, pflanzenreiche gegen schattige, pflanzenarme Standorte  $\beta = -0.480$ ,  $p < 0.000$ ), CLIMATE PCA2 (Gradient von Jahresminimum-Temperatur und Höhenlage,  $\beta = 0,394$ ,  $p < 0,003$ ) and PHYCHEM PCA2 (O<sub>2</sub>-Gehalt und Fließgeschwindigkeit,  $\beta = -0,266$ ,  $p = 0,015$ ) erklären zusammen einen signifikanten Anteil der Gesamtvariation ( $R^2 = 0,68$ ,  $F_{(5,31)} = 13,0$ ,  $P < 0,000$ ). Zusammengefaßt stellt die DCA Achse 1 *Chironomus*-Gesellschaften in sauerstoff- und pflanzenreichen Fließgewässern in tieferen Lagen mit milden Wintertemperaturen denen schattiger, sauerstoffarmer Teiche und Pfützen höherer Lagen mit niedrigen Wintertemperaturen gegenüber.

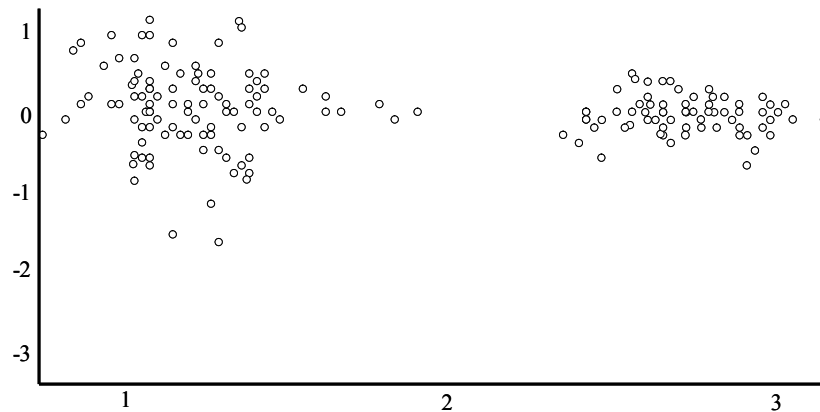
**Tabelle 26:** Ergebnisse der multiplen Regression der Umwelt-PCA-Achsen an DCA-Achse 1

Abhängige Variable	Variablen im Modell	beta	$p$	multiple R <sup>2</sup>	F <sub>(5, 31)</sub>	$p$
DCA1	HABSTRUC PCA3	0.495	<0.000	0.68	13.0	<0.000
	HABSTRUC PCA2	-0.480	<0.000			
	CLIMATE PCA2	0.349	0.003			
	PHYSCHEM PCA2	-0.266	0.015			

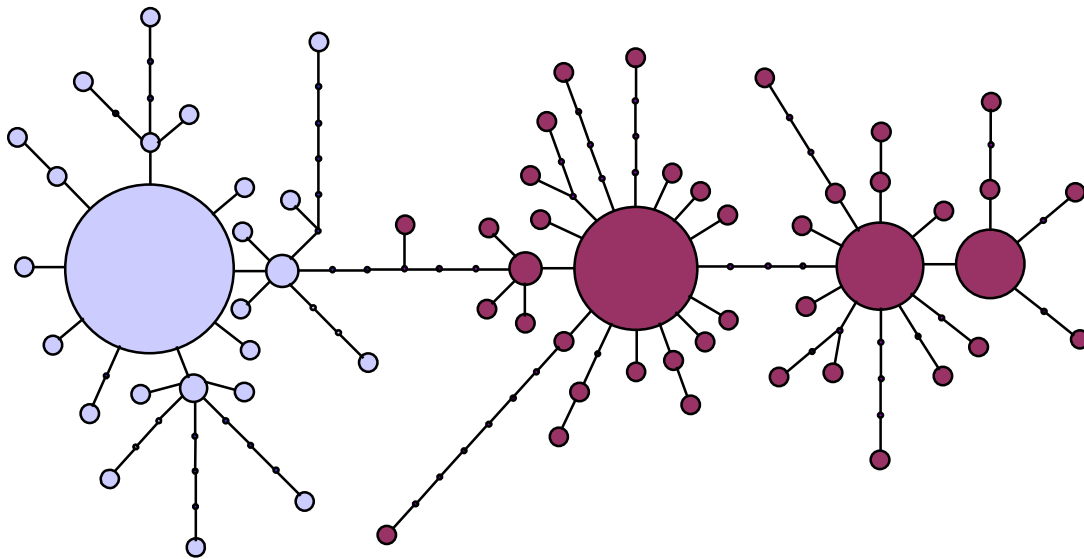
Die Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse sind denen der oben genannten Ergebnisse sehr ähnlich und werden daher nicht separat gezeigt. Auch hier wird ein Muster offensichtlich, welches kleine Gewässer kühlerer Standorte größeren Wasserkörpern in milderer Lagen gegenüberstellt.

Neben der Analyse der Artzusammensetzung wird nach Mustern der genetischen Diversität bei den Schwesterarten *C. riparius* und *C. piger* gesucht. Da beide Arten nicht sicher durch DNA-Barcoding aufgetrennt werden können, werden die nukleären Daten (Mikrosatelliten und ITS-1 Restriktionsanalyse; siehe oben) mit den mitochondrialen Barcodes abgeglichen. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen sind in Abbildung 25 gezeigt. Wie zu erkennen ist, verteilen sich die Individuen innerhalb der *thummi*-Gruppe in zwei deutlich voneinander getrennte Cluster. Die Artzugehörigkeit wird mittels Polytänchromosomenuntersuchung an ausgewählten Individuen überprüft. Hierbei kann jeder Cluster eindeutig einer der beiden Arten *C. riparius* und *C. piger* zugeordnet werden. Abbildung 26 zeigt das mitochondriale

Haplotypnetzwerk der als *C. thummi* identifizierten Individuen. Die mittels Mikrosatellitenanalysen zugeordneten nukleären Befunde wurden mit in das Netzwerk integriert. Es wird deutlich, dass beide Arten auch mitochondrial klar voneinander differenziert sind.

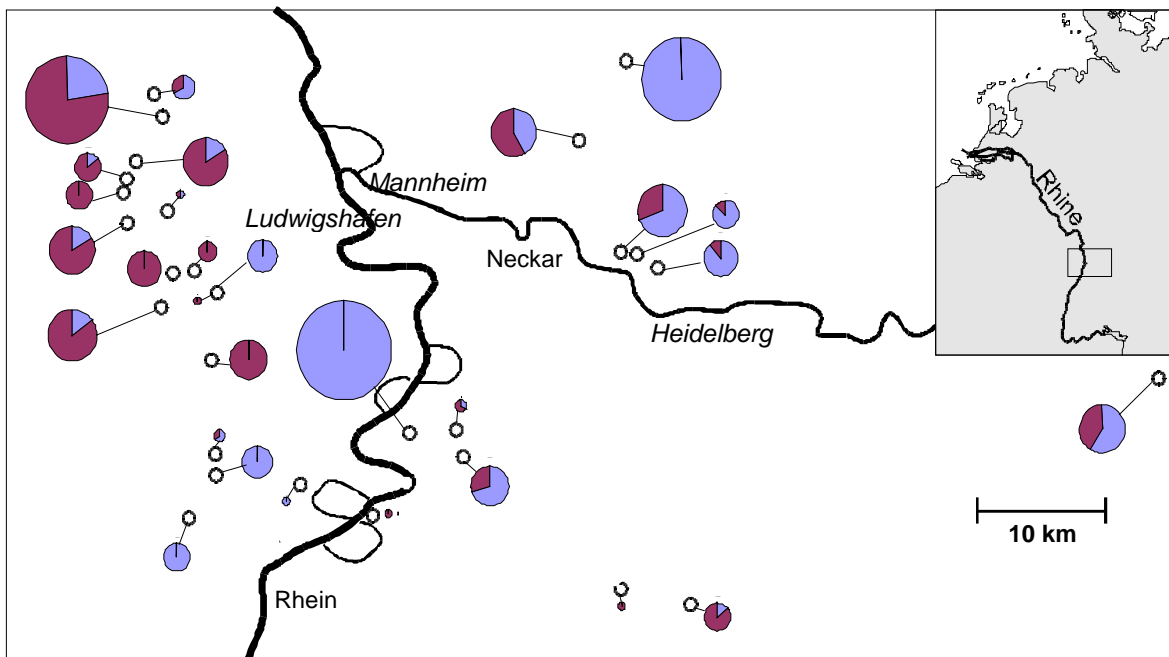


**Abbildung 25:** Zweidimensionale Darstellung der genetischen Struktur der mittels Mikrosatellitenanalyse untersuchten *C. thummi*-Gruppe. Die Analyse wurde im Programm GenAlEx 6 durchgeführt.



**Abbildung 26:** Haplotypnetzwerk der mittels COI-Barcoding identifizierten *C. thummi*-Individuen. Jeder Kreis stellt einen Haplotypen dar. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an Individuen, denen der jeweilige Haplotyp zugeordnet werden konnte. Jede Linie stellt einen Mutationsschritt dar. Punkte stellen hypothetische Haplotypen dar, die jedoch nicht in den Analysen identifiziert wurden. Blaue Kreise: nukleär als *C. riparius* identifizierte Individuen; violette Kreise: Nukleär als *C. piger* zugeordnete Haplotypen.

Anhand der genetischen Zuordnung wird die Verteilung der beiden Schwesterarten im Freiland untersucht (Abb. 27). Hierbei ergeben sich jedoch keine signifikanten Zusammenhänge mit ökologischen oder ökotoxikologischen Faktoren.



**Abbildung 27:** Verteilung der Schwesterarten *C. riparius* und *C. piger* im Untersuchungsgebiet. Blau: *C. riparius*, violett: *C. piger*. Die Kreisgröße korreliert mit der Anzahl gefundener Individuen.

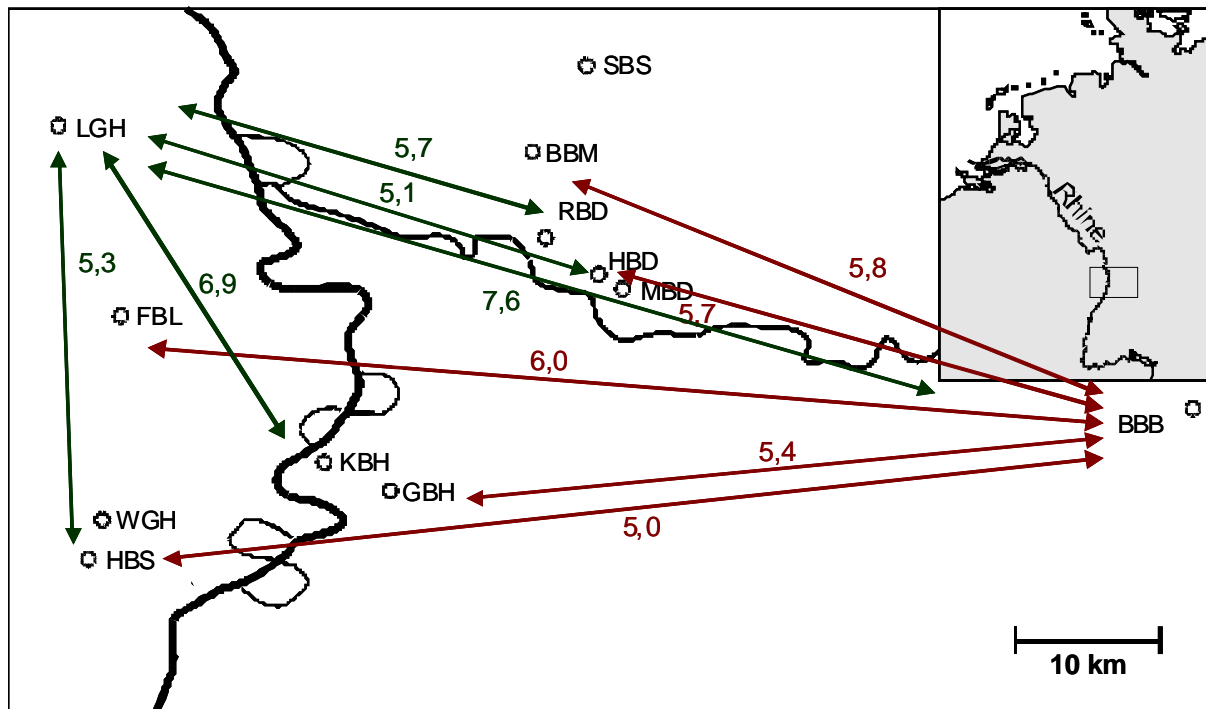
Für die Analyse der genetischen Struktur im Freiland werden alle Standorte ausgewählt, an denen mindestens fünf Individuen von *C. riparius* in die Analysen einbezogen werden können. Zunächst wird überprüft, ob es signifikante genetische Muster im Untersuchungsgebiet gibt, die auf eine genetische Differenzierung zwischen den einzelnen Standorten hinweist. Tatsächlich wird eine signifikante Differenzierung gefunden ( $P < 0,001$ ), jedoch auf einem geringen Level (weniger als 5% der Varianz im Datensatz befindet sich zwischen den Populationen), dass man die Individuen aller Standorte als eine einzige große Population bezeichnen kann (Tab. 27).

**Tabelle 27:** Ergebnisse einer Molekularen Varianzanalyse (AMOVA) zur Bestimmung des Grades an genetischer Differenzierung innerhalb des Untersuchungsgebietes.

Ursprung	df	SS	%	P
Zwischen Pop.	11	58,250	5%	
Innerhalb Pop.	103	378,186	95%	0,001
Gesamt	114	436,436		

PhiPT = 0,046

Im Programm GenAlEx 6 wird weiterhin der Genfluss zwischen den Standorten abgeschätzt. Abbildung 28 zeigt nur besonders hohe Genflussraten von über fünf Migranten pro Jahr an zwei ausgewählten Standorten. Es wird deutlich, dass hohe Migrationsraten für die mangelnde Populationssubstrukturierung innerhalb des Gebietes verantwortlich sind. Insgesamt zeigen die Migrationsraten aller paarweisen Standortvergleiche keinen Wert unter 2,5 Migranten pro Jahr ( $N_m$ ) auf.



**Abbildung 28:** Anhand der Mikrosatellitendaten geschätzte Genflußraten innerhalb des Untersuchungsgebietes bei *C. riparius*. Die Werte geben die geschätzte Anzahl an Migranten pro Jahr zwischen den Standorten an ( $Nm$ ). Gezeigt sind nur die Genflußraten von zwei Standorten (LGH und BBB), sowie Raten von  $Nm > 5$ .

Neben der genetischen Differenzierung wird auch die genetische Diversität an den 12 Standorten untersucht. Da an den meisten Standorten weniger als 10 Tiere untersucht werden konnten, stellt die erwartete Heterozygotie hier die bessere Diversitätsabschätzung dar. Die Werte für diesen Parameter schwanken zwischen 0,555 und 0,694 und können als ausnahmslos sehr hoch angesehen werden.

**Tabelle 28:** Genetische Diversität von *C. riparius* im Freiland. Berücksichtigt wurden alle Standorte, an denen Mikrosatellitenanalysen an mind. Fünf Tieren durchgeführt werden konnten. N = Anzahl untersuchter Tiere,  $H_e$  = erwartete Heterozygotie,  $H_o$  = beobachtete Heterozygotie, A = Allele pro Locus. \* = signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht an mind. einem Genort.

Pop.	N	$H_e$	$H_o$	A
BBB	7	0,653	0,543	4,4
BBM	5	0,564	0,640	4,4
FBL	8	0,638	0,650	4,6
GBH	7	0,575	0,533	3,8
HBD	6	0,616	0,527*	4,4
HBS	7	0,565	0,457	4,4
KBH	24	0,669	0,616	5,8
LGH	5	0,619	0,630	4,0
MBD	8	0,694	0,775	5,4
RBD	9	0,681	0,733	5,4
SBS	21	0,605	0,577*	5,0
WGH	8	0,555	0,450	4,4



Mit Hilfe statistischer Analysen kann kein Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität und des Belastungsgrades an den Standorten festgestellt werden. Jedoch wird beispielsweise am *C. riparius*-Standort mit der höchsten TBT-Belastung (GBH) die niedrigste Anzahl an Allelen bei den untersuchten Individuen gemessen. Weiterhin konnte am einzigen Standort, an dem bei dem Sedimenttoxizitätstest (Kapitel 7.2) ein klarer Effekt auf die Mortalität gefunden wurde, eine signifikante Abweichung vom HWG an Locus 2 gemessen werden.

Die meisten molekulargenetisch definierten MOTU können cytotaxonomisch identifizierten Arten zugeordnet werden und stellen daher eine Verbindung zwischen modernen DNA-Ansätzen und klassischer Taxonomie her. Die Verwendung von Bootstrap-Werten zur Abgrenzung von MOTU hat sich in dieser Studie als nützlich erwiesen, da sie eine statistische Unterstützung der gebildeten Einheiten liefern. Dies ist in diesem Fall besonders wichtig, da die COI-Sequenzen aufgrund der unidirektionalen Sequenzierung mit 416 bp vergleichsweise kurz waren. Nichtsdestotrotz können fast alle COI-Sequenzen sicher den MOTU und damit in fast allen Fällen auch den ‚klassischen‘ Arten zugeordnet werden. Die vorliegende Studie ist damit ein weiterer Beleg für die Nützlichkeit des DNA-Barcoding-Ansatzes insbesondere in Studien an taxonomisch schwierigen Invertebraten-Gruppen (z.B. (BALL & HERBERT, 2005; HEBERT ET AL., 2003; HOGG & HEBERT, 2004) und unterstreicht auch die Bedeutung für die Eignung einfacher molekulargenetischer Verfahren für ökologische Studien.

Durch die morphologische Gruppierung in den *plumosus*- und den *thummi*-Larvaltyp können keine klaren und konsistenten Ergebnisse bei der Untersuchung der *community structure* erzielt werden. Mängel hinsichtlich der taxonomischen Auflösung bei der Untersuchung von *Chironomus*-Gesellschaften sind in der Literatur bereits erwähnt worden (BUTLER ET AL., 2000). Die Ergebnisse des cytotaxonomischen und DNA-taxonomischen Ansatzes kamen zu sehr ähnlichen Ergebnissen, daher wird sich im Folgenden auf die Diskussion der molekulargenetischen Daten beschränkt. Die beiden Achsen der DCA repräsentierten nicht mehr als 34,5 % der gesamten Variation in der Artzusammensetzung. Der hohe Anteil der verbleibenden Variation ist am ehesten auf die große Stochastizität bei der Artverteilung durch hohe Migrations- und Kolonisierungsraten zwischen den untersuchten Standorten, die bei dieser Organismengruppe zu erwarten sind (DELETTRE & MORVAN, 2000, TOKESHI, 1995), zurückzuführen. Weiterhin ist sicherlich auch die begrenzte Anzahl an untersuchten Larven pro Standort zu berücksichtigen. Da jedoch erst spät im Jahr gesammelt wurde und damit hauptsächlich die im Gewässer überwinterte Generation betrachtet wurde, welche im nächsten Frühjahr die Gründerpopulationen der nächsten Generation bildet, sollten die

erhaltenen Artverteilungen repräsentativ für den jeweiligen Standort sein. Obwohl man aufgrund der ähnlichen Ressourcennutzung und der Fähigkeit von Chironomiden, innerhalb kurzer Zeit große Populationen zu bilden, eine starke Konkurrenz zwischen den verschiedenen Arten um Nahrung und Raum erwarten sollte, werden an den meisten Standorten mehrere Arten sympatrisch vorkommend an einem Standort gefunden. Tatsächlich wird ein kompetitives Muster der Artzusammensetzung identifiziert, welches jedoch eher auf unterschiedliche Habitatpräferenzen bei einigen Arten zurückzuführen ist. Höchstwahrscheinlich ist für das Phänomen, dass bis zu fünf Arten gleichzeitig in einer Probe gefunden wurden, weniger ökologische Differenzierung, als eine bei *Chironomus* besonders hohe Besiedlungsdynamik verantwortlich.

Wie die Ergebnisse der CCA und der DCA der Umweltparameter zeigen, kann nur ein geringer Teil der Variation in der Artzusammensetzung an den Standorten durch die Variation der Umweltbedingungen erklärt werden. Dieses Resultat deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen vergleichbarer Untersuchungen (MOUSAVI, 2002, NYMAN ET AL., 2005). Die verbleibende Variation ist demnach entweder durch nicht berücksichtigte Faktoren oder durch die oben angesprochene Stochastizität der Artgemeinschaften zu erklären.

Es können jedoch verschiedene Umweltparameter ermittelt werden, die einen signifikanten Einfluss auf die Artverteilung im untersuchten Gebiet ausüben. Unter den Habitatstrukturparametern haben die Größe und Austrocknungswahrscheinlichkeit des Gewässers den größten Einfluss. Temporäre Kleinstgewässer beherbergen hauptsächlich Arten mit großer Verbreitungs- und Kolonisierungskapazität, während stabilere, größere Gewässertypen eher konkurrenzstarke Formen beherbergen sollten. Daher ist in stabilen Ökosystemen eine größere Artenvielfalt zu erwarten, was hier auch zumindest tendenziell bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Alle Analysen indizieren einen Einfluss selbst recht geringer mittlerer Temperaturunterschiede (weniger als 1° C) auf die Artzusammensetzung. Der Einfluss der mittleren Wintertemperaturwerte deutet dabei auf mögliche Bedeutung der Einfrierungswahrscheinlichkeit des Gewässers hin. Die eher überraschende Erkenntnis, dass das lokale Klima eine signifikante Bedeutung für die Artverteilung von Chironomiden selbst auf lokaler Maßstabsebene hat, unterstreicht den wahrscheinlichen Einfluss der drohenden globalen Klimaerwärmung auf die Verteilung und Struktur von Lebensgemeinschaften.

Obwohl andere Umweltfaktoren, wie etwa der organische Gehalt im Sediment oder der pH-Wert im Gewässer, in anderen Studien als Ursache für das Vorkommen von

Chironomidenspezies ermittelt wurden (RAE, 2004, NYMAN ET AL., 2005), können hier keine anderen für die *community structure* der Gattung *Chironomus* bedeutenden Parameter identifiziert werden. Neben der unterschiedlichen taxonomischen Auflösung, zeigen einige Parameter, wie der pH-Wert, nur eine geringe Variationsbreite im Untersuchungsgebiet, was nichts über den generellen Einfluss dieser Parameter aussagt.

Insgesamt wird kein Einfluss von anthropogener Umweltbelastung auf die Artverteilung in der Untersuchungsregion festgestellt. Natürlich deckt die durchgeführte Elementanalytik nur einen Bruchteil der tatsächlich im Sediment vorhandenen Schadstoffe ab, weshalb zusätzlich ein Life-Cycle Experiment mit Sedimenten von allen Standorten durchgeführt wurde. Jedoch zeigen nur sehr wenige Sedimente einen negativen Einfluß auf den Testorganismus *Chironomus riparius*. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Schadstoffbelastung im Sediment in der Region keinen wesentlichen negativen Einfluss auf *Chironomus*-Arten ausübt.

Auch die Artzusammensetzung innerhalb der *thummi*-Gruppe (*C. riparius* und *C. piger*) zeigt keine Abhängigkeit von ökologischen oder toxikologischen Parametern. Jedoch kann gezeigt werden, dass der Artstatus beider Gruppen zumindest im Untersuchungsgebiet durchaus gerechtfertigt ist, da kaum Hinweise auf Hybridisierungsereignisse gefunden werden konnten und beide Linien sich nukleär und mitochondrial klar trennen ließen. Aufgrund des sehr hohen Genflusses zwischen den Standorten im Untersuchungsgebiet konnten keine signifikanten Effekte von Schadstoffbelastung auf die genetische Diversität ermittelt werden. Jedoch gab es einige Hinweise auf einen Einfluß an den stark belasteten Standorten. Wie die Ergebnisse des Biotests zeigen (Kap. 7.2), gab es insgesamt im Untersuchungsgebiet nur geringe Effekte bei *C. riparius*. Der Grad an Schadstoffbelastung und das damit einhergehende Ausmaß der Verringerung der effektiven Populationsgröße sind sicher ein wichtiger Faktor, wenn nach Effekten auf die genetische Diversität im Freiland gesucht wird. Desweiteren herrscht bei Zuckmücken ein ausgeprägtes Migrationsverhalten, welches mit hohem Genfluß zwischen Standorten einhergeht und so genetische Diversität effektiv „erneuern“ kann.

#### 4.3.2 Biotests mit Freilandsedimenten

Im Rahmen der Untersuchungen werden 38 Freilandsedimente (vgl. Tab. 23) aus dem nordwestlichen Teil Baden-Württembergs auf deren Toxizität für die Zuckmücke *C. riparius* im Rahmen von Laborbiotests untersucht.

### *Charakterisierung der Sedimente*

Für die Sedimente wird der Anteil an organischem Kohlenstoff sowie die Korngrößenverteilung ermittelt. Weiterhin wird das Sediment auf ausgewählte Schwermetalle untersucht. Für die Bestimmung des organischen Kohlenstoffanteils werden die Sedimente homogenisiert und anschließend 30 g Feuchtgewicht (FG) entnommen. Die Proben werden 2-3 Tage im Trockenschrank getrocknet und anschließend das Trockengewicht mit einer Feinwaage (Satorius, Typ 2255) bestimmt. Auf diesen Schritt folgend werden die Sedimentproben 4 h bei 1000 °C vermuffelt (Carbolite, Typ Elf 11-6B) und erneut das Gewicht bestimmt. Die Gewichts Differenz und der prozentuale Anteil dieser Differenz zum Trockengewicht wird für jede Sedimentprobe berechnet.

Für die Ermittlung der Korngrößenverteilung werden 150 g Sediment (FG) entnommen. Für die Auftrennung werden sechs Analysensiebe (DIN-ISO33101) der Firma Retsch mit unterschiedlichen Maschenweiten verwendet (250, 500 und 630 µm; 1, 2 und 4 mm). Alle Siebe werden zu Beginn mit Wasser durchgespült und jeder Siebboden mit einer Laborwaage gewogen. Danach wird eine Siebkolonne erstellt und das Probevolumen auf den obersten Siebboden gegeben und die Probe gründlich mit Wasser durchgespült. Anschließend wird mit der Laborwaage für jede Fraktion das Gewicht bestimmt. Durch die Korrektur des zuvor bestimmten Eigengewichts der Siebe, wird die Masse der einzelnen Fraktionen berechnet.

Weiterhin werden von den homogenisierten Sedimenten jeweils 100 g in ein Falcon<sup>®</sup> Tube gegeben und anschließend wieder eingefroren. Die eingefrorenen Probenröhrchen werden zur Elementanalyse unter Kühlung an das umweltanalytische Labor des Internationalen Hochschulinstituts Zittau (IHI) geschickt. Die Analysen erfolgen für die Elemente Aluminium, Chrom, Mangan, Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer, Zink, Arsen, Cadmium, Zinn, Blei und Rhodium nach mikrowellenunterstütztem Druckaufschluss mittels ICP-MS (*ELAN 5000*, Perkin Elmer, Überlingen) (Oetken, 1999).

### *Durchführung der Biotests*

Mit 38 Freilandsedimenten wird ein Life-Cycle Experiment durchgeführt. Für die Life-Cycle Experimente werden Chironomiden aus der GEN-Population (MGS I, Generation 6) eingesetzt. Die Durchführung der Experimente erfolgt in Anlehnung an die OECD-Standardmethode 218 (OECD, 2004a). Das Experiment wird ebenfalls in einem Klimaraum mit Standardlaborbedingungen durchgeführt. Für jeden Standort werden jeweils drei Replikate mit 80 g Sediment verwendet. Zusätzlich werden zwei unabhängige Kontrollen (jeweils 3 Replikate) mit dem modifizierten Standardsediment nach VOGT ET AL. (2007a) durchgeführt. Die Bechergläser werden mit Sediment und rekonstituiertem Wasser befüllt und

acht Tage lang zur Gleichgewichtseinstellung stehengelassen. Danach werden aus 10 fruchtbaren Gelegen jeweils 25 vitale L1-Larven pro Replikat eingesetzt. Anschließend wird das Versuchsschema wie in den Experimenten zuvor weitergeführt und alle Endpunkte aufgenommen.

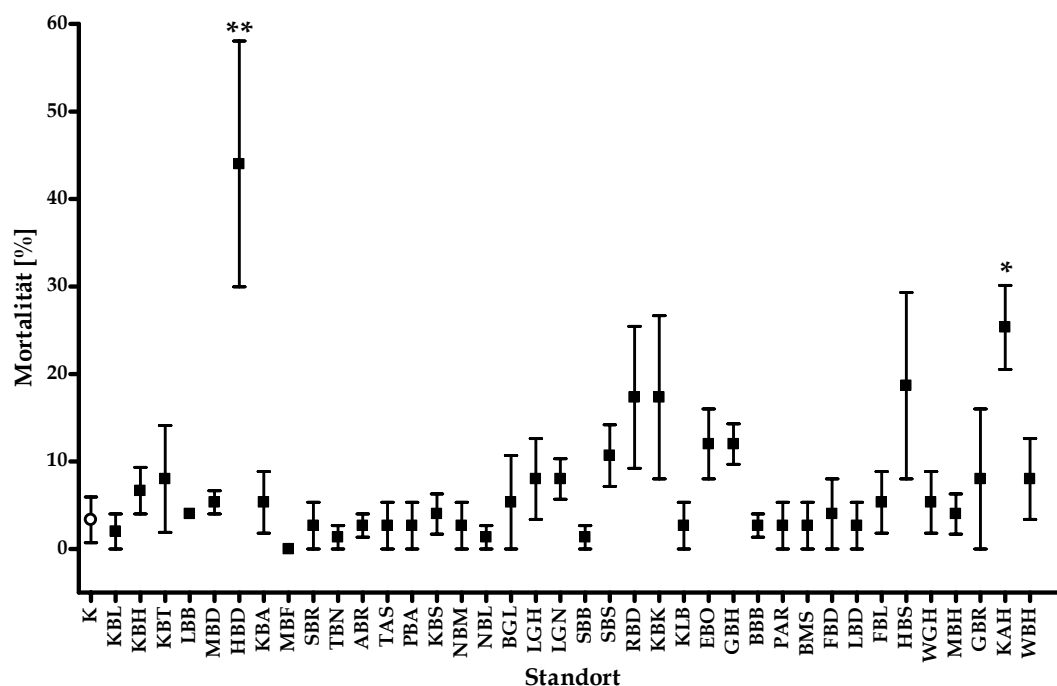
In beiden Kontrollen werden die Validitätskriterien der OECD Guideline 218 (OECD, 2004a) eingehalten. Die Mortalität in den Kontrollen beträgt weniger als 30% und der Hauptschlupf der findet zwischen dem 13. und 23. Versuchstag statt. Ebenfalls werden die geforderten physiko-chemischen Parameter der Guideline eingehalten.

### Charakterisierung der Sedimente

An den in Tabelle 23 dargestellten Standorten werden Sedimentproben für die Biotests entnommen. Detailliert sind die Ergebnisse der Elementanalysen, des organischen Kohlenstoffgehaltes und der Korngrößenverteilung in KLEY (2005) beschrieben.

### Mortalität und Weibchenanteil

Im Allgemeinen werden kaum erhöhte Mortalitäten in den untersuchten Freilandsedimenten festgestellt, wobei diese bei fast allen Probenahmestellen weniger als 15% beträgt (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Mortalität (MW ± SEM) von *Chironomus riparius* im Life-Cycle Experiment mit Sedimenten der unterschiedlichen Standorte (Abkürzung vgl. Tab. 23). Signifikante Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA, Dunnett's post Test) zwischen der Kontrolle (K, offener Kreis, n = 6) und den jeweiligen Sedimenten der Standorte (geschlossenes Viereck, n = 3) ermittelt (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

Leicht erhöhte Mortalitäten werden bei drei der untersuchten 38 Sedimente festgestellt (RBD, KBK und HBS), wobei die Mortalitäten unter 20% liegen. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind an zwei Standorten (HBD,  $p < 0,01$ ; KAH  $p < 0,05$ ; t-Test) festzustellen. Für den Weibchenanteil können keine Abweichungen von der Gleichverteilung von 1:1 festgestellt werden.

#### *Mittlerer Emergenzzeitpunkt ( $EmT_{50}$ )*

Der mittlere Emergenzzeitpunkt liegt bei den Männchen der Kontrolle bei ca. 20 Tagen und die Hälfte der Weibchen ist nach ca. 22,5 Tagen geschlüpft (Ergebnisse nicht dargestellt; KLEY, 2005). In den Freilandsedimenten sind die  $EmT_{50}$ -Werte beider Geschlechter zumeist im Vergleich zur Kontrolle verfrüht (KLEY, 2005). So können signifikante Unterschiede für die Männchen an 27 Standorten und für die Weibchen an 30 Standorten berechnet werden ( $p < 0,05$ ; t-Test). In den restlichen Freilandsedimenten werden keine Unterschiede zu den Kontrolltieren ermittelt.

#### *Gelege pro Weibchen und Gelegegröße*

Die Anzahl an Gelegen pro Weibchen beträgt im Mittel in beiden Kontrollen ca. 0,9 (Ergebnisse nicht dargestellt; KLEY, 2005). Bei den Sedimenten der Freilandstandorte schwankt die Gelegezahl pro Weibchen zwischen 0,4 und 1,2. In den Experimenten kann nur eine signifikante Abweichung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. So legen die Weibchen, welche in Sedimenten des Schrakelbachs bei Beindersheim (SBB) aufgezogen wurden, signifikant ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ -Test) weniger Gelege. Alle anderen Sedimente weisen keinen Effekt hinsichtlich der Gelegezahl pro Weibchen auf.

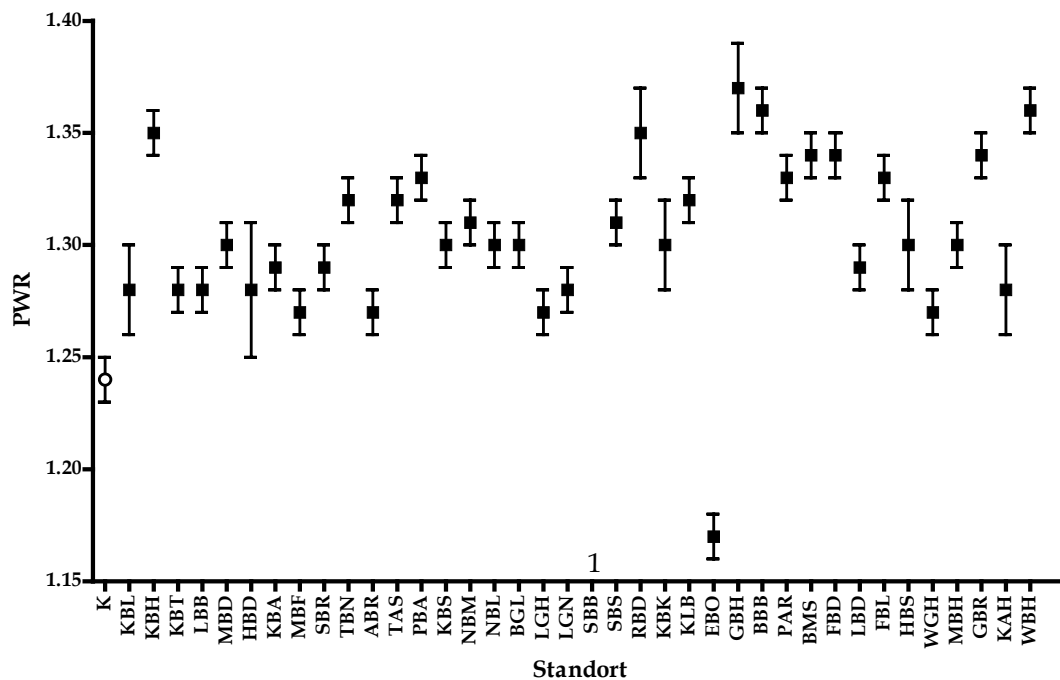
Von allen Gelegen der Kontrollegruppe sind ca. 65% entwicklungsfähig. Die meisten Gelege aus den Experimenten mit den Freilandsedimenten sind entwicklungsfähig. Signifikante Unterschiede werden bei den Sedimenten der Standorte KBL, MBD, HBD, KBA, TAS, PBA, KBS, BBB, BMS, FBD, LBD ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ -Test) sowie KBH, SBR, NBM, NBL, RBD, KLB, EBO und GBR festgestellt ( $p < 0,01$ ,  $\chi^2$ -Test), wobei mehr Gelege fertil sind als in der Kontrolle. Allerdings können auch zwei Standorte ermittelt werden, bei denen der Anteil an entwicklungsfähigen Gelegen niedriger als in der Kontrolle ist (SBB, EBO).

Hinsichtlich der Gelegegröße werden in der Kontrolle mittlere Werte von 500 Eiern pro Gelege ermittelt (Ergebnisse nicht dargestellt; KLEY, 2500). Ähnliche Werte werden auch bei Tests mit den Freilandsedimenten festgestellt. Hierbei variieren die Gelegegrößen zwischen 450 und 630 Eiern pro Gelege. Allerdings schwanken die Gelegegrößen wie auch in den

anderen Experimenten stark und es kann nur ein signifikanter Unterschied am Standort WBH festgestellt werden ( $p < 0,05$ ; U-Test), dabei sind die Gelege signifikant größer.

### Populationswachstumsrate (PWR)

Die mittlere PWR beträgt in beiden Kontrollen 1,24  $d^{-1}$ . Die meisten Freilandsedimente fördern die Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius* und es werden häufig höhere PWR im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abb. 30).



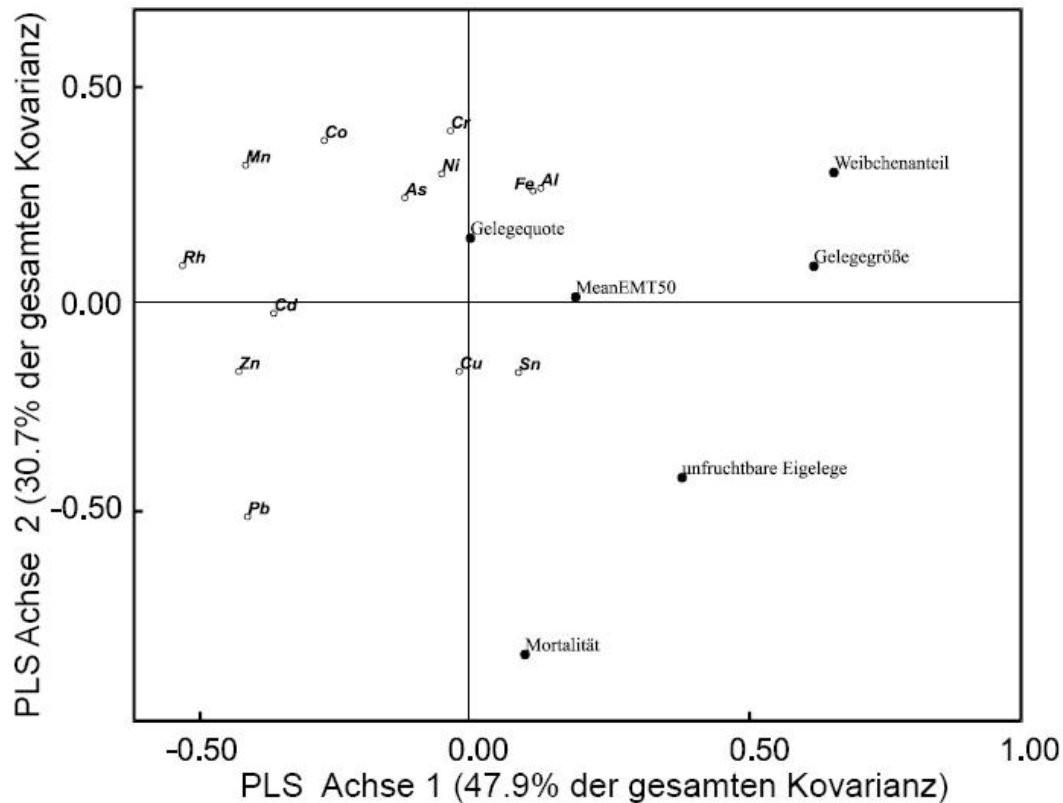
**Abbildung 30:** Populationswachstumsrate ( $\pm$  SD, in  $d^{-1}$ ) von *Chironomus riparius* im Life-Cycle Experiment mit Freilandsedimenten (Abkürzung vgl. Tab. 23). Index 1 – Populationswachstumsrate = 0, da keine entwicklungsfähigen Gelege produziert wurden (K, Kontrolle – offener Kreis, Freilandsediment – geschlossenes Viereck).

Die Werte schwanken dabei zwischen 1,25 und 1,35  $d^{-1}$ . Allerdings gibt es auch einen Standort (SBB) bei dem die Weibchen keine entwicklungsfähigen Gelege produzieren und die Population damit ausstirbt (PWR = 0). An einem weiteren Standort wird ebenfalls eine niedrige PWR von 1,17  $d^{-1}$  festgestellt (EBO).

### Erklärung der Life-Cycle Parameter durch die Elementdaten

Der Einfluss der analysierten Elemente auf die Life-Cycle Parameter von *Chironomus riparius* ist in Abbildung 31 an den Ergebnissen der Partial Least Square Analyse veranschaulicht. Sie zeigt, dass der Weibchenanteil an Standorten, deren Sedimente weniger Blei enthalten, höher ist. Desweiteren ist zu erkennen, dass die Gelege an Standorten mit wenig Zink und Cadmium größer sind. Außerdem ist der Anteil an unfruchtbaren Gelegen an

Standorten mit viel Kobalt (Co), Mangan (Mn) und Rhodium (Rh) höher. Für die Mortalität, die Gelegeanzahl pro Weibchen und den mittleren Schlupfzeitpunkt gibt es keine erkennbaren Einflüsse.



**Abbildung 31:** Ergebnisse der Partial Least Square-Analyse. Die erste Achse enthält 47,9 % der gesamten Kovarianz im Datensatz, die zweite Achse enthält 30,7% der gesamten Kovarianz. Es wurden 13 Elementparameter als unabhängige Variablen und 6 Life-Cycle Parameter als abhängige Variablen eingesetzt. Die schwarzen Kreise symbolisieren die einzelnen Life-Cycle Parameter und die weißen Kreise die Elementparameter.

#### *Effekte der Sedimentbelastung auf Life-Cycle Parameter von Chironomus riparius*

Die Ergebnisse der Biotests zeigen deutlich, dass 37 der 38 Freilandsedimente keine akut toxischen Wirkungen auf die Entwicklung und Reproduktion von *C. riparius* haben. In fast allen Experimenten werden Populationswachstumsraten oberhalb von  $1,0 \text{ d}^{-1}$  festgestellt und nur an einem Standort (SBB) konnte die Chironomiden-Population keine F1-Generation aufbauen. In den Experimenten werden deshalb subletale Effekte bei moderaten Schadstoffkonzentrationen ermittelt. Da es sich allerdings bei den Sedimenten um ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Substanzen handelt, ist es nicht möglich einzelne Chemikalien für die beobachteten Effekte verantwortlich zu machen. Zahlreiche Studien mit Chironomiden haben gezeigt, dass die Larvalmortalität ein geeigneter Endpunkt für die



Abschätzung von Sedimenttoxizitäten ist (PASCOE ET AL., 1989; GROENENDIJK ET AL., 1998, 1999; OETKEN, 1999; OETKEN ET AL., 2001). Dieses trifft allerdings nur für erhöhte Konzentrationen von Schadstoffen zu, da Chironomiden in der Lage sind, selbst an extremen Standorte zu überleben. Sie besiedeln z.B. Standorte mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen oder extremen pH-Werten (ARMITAGE ET AL., 1995).

In den Experimenten wird nur an zwei Standorten eine signifikant erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Dieses betrifft die Sedimente der Standorte HBD und KAH. An diesen Standorten kann deshalb von einem erhöhten toxischen Sedimentpotential gegenüber Chironomiden ausgegangen werden. Anhand der Ergebnisse der Elementanalytik kann allerdings festgestellt werden, dass keine erkennbar erhöhten Schadstoffbelastungen damit einhergehen. Deshalb liegt die Annahme nahe, dass andere nicht analysierte Umweltschadstoffe (z.B. PAK) für die erhöhte Mortalität verantwortlich sind. Da es sich bei dem Standort KAH um den Abfluss einer Kläranlage handelt, kann eine Belastung mit weiteren Schadstoffen möglich sein.

Gegenüber der Kontrolle kann kein signifikanter Effekt der verschiedenen Freilandssedimente bezüglich des Weibchenanteils der geschlüpften Tiere festgestellt werden. Dieser Parameter erweist sich auch in den anderen Experimenten nicht als sensitiv und es sind keine Substanzen bekannt, welche das Geschlechterverhältnis effektiv verschieben können. Hinsichtlich der Reproduktionsparameter können nur für einen Standort (SBB) signifikante Effekte auf die Gelegeanzahl pro Weibchen ermittelt werden. Dieser Effekt könnte auch durch Schadstoffe ausgelöst werden, was die Vorexperimente mit Cadmium und TBT deutlich gezeigt haben (VOGT ET AL., 2007a).

Weitere Effekte in Bezug auf die Reproduktion sind anhand des Anteils unfruchtbarer Gelege zu erkennen. Dabei wird deutlich, dass die Sedimente an den Standorten SBB und EBO einen negativen Einfluss auf den Anteil unfruchtbarer Gelege haben, wobei bei beiden Standorten ein erhöhter Anteil an unfruchtbaren Gelegen festgestellt wird. Auffällig ist dabei, dass am Standort SBB überhaupt keine fruchtbaren Gelege von den Weibchen produziert werden.

Allerdings gibt es für dieses Ergebnis wenige Studien, welche den Zusammenhang zwischen Schadstoffexposition und Entwicklungsfähigkeit der Gelege bestätigen können. So zeigten KIM und LEE (2004) für die Substanz Di-2-Ethylhexylphthalat (DEHP), dass die Fruchtbarkeit der Gelege bei *C. riparius* negativ beeinträchtigt wird. Möglicherweise sind weitere Substanzen, wie beispielsweise ubiquitär verbreitete Phtalate, in den Sedimenten der Standorte SBB und EBO für die beobachtete Abnahme der Entwicklungsfähigkeit der Gelege

verantwortlich. Dafür würde ebenfalls sprechen, dass wie bereits gezeigt am Standort SBB die Anzahl an Gelegen pro Weibchen signifikant negativ beeinflusst wurde.

Auch am Standort WBH ist ein Effekt bezüglich der Gelegegröße feststellbar. Dabei werden von den Weibchen signifikant größere Gelege produziert als in der Kontrolle. Dieser Effekt von größeren Gelegen wurde auch in den letzten Generationen der MGS I beobachtet und deutet auf eine Veränderung des Life-Cycles hin. Solche Beobachtungen wurden auch in einer Mehrgenerationenstudie von POSTMA und DAVIDS (1995) bei Cadmiumstress gemacht. Möglich wäre auch hier, wie schon beim mittleren Schlupfzeitpunkt, dass der organische Kohlenstoffgehalt einen Einfluss auf die Gelegegröße hat. Dafür würde auch sprechen, dass der Standort WBH sowohl den frühesten  $EmT_{50}$ -Wert, als auch die größten Gelege aufweist. Insgesamt kann auf Basis der Befunde aus dem Biotest festgestellt werden, dass die Sedimentbelastung im untersuchten Gebiet generell als gering einzustufen ist.

#### *Korrelation von Schwermetallbelastung mit Life History Parametern*

Wie die Ergebnisse der Partial Least Square Analyse zeigen, gibt es Korrelationen zwischen einigen Schwermetallkonzentrationen und den im Biotest beobachteten Life-Cycle Parametern. Demnach ist der Weibchenanteil höher an den Standorten, die weniger mit Blei belastet sind. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Blei das Geschlechterverhältnis beeinflusst. In diesem Fall sind die Auswirkungen allerdings weniger drastisch, da es keine signifikanten Änderungen des Geschlechterverhältnisses an den verschiedenen Standorten gab. Das Bleivorkommen könnte deshalb lediglich für geringe Änderungen des Weibchenanteils verantwortlich sein. Bisher gibt es noch keine veröffentlichten Studien, die den Einfluss von Blei auf das Geschlechterverhältnis von Chironomiden bestätigen würden. Ein weiteres Ergebnis zeigt, dass die Gelege an Standorten mit wenig Zinn und Cadmium größer sind. Das könnte bedeuten, dass diese beiden Schwermetalle einen Einfluss auf die Gelegegröße von *C. riparius* haben.

Aus der letzten Korrelation der Ergebnisse kann man schließen, dass die Schwermetalle Kobalt, Mangan und Rhodium einen negativen Einfluss auf die Fertilität der Gelege von *C. riparius* haben. Für die Substanz Di-2-Ethylhexylphthalat (DEHP) konnten KIM und LEE (2004) bei *C. riparius* zeigen, dass diese die Fruchtbarkeit der Gelege beeinträchtigt. Studien über *C. riparius*, welche die gleiche Wirkung für Kobalt, Mangan und Rhodium aufweisen, sind bisher nicht bekannt. Allerdings wäre es möglich, dass diese Schwermetalle entwicklungsbiologische Prozesse bei der Bildung der Gelege stören.

Insgesamt kann in den vorliegenden Experimenten deutlich gezeigt werden, dass die Sedimente kleinerer Fließgewässer aus dem Norden Baden-Württembergs keine erhöhten

Sedimenttoxizitäten für Chironomiden besitzen. Im Allgemeinen können nur geringe Effekte der Sedimente auf die Entwicklung- und Reproduktion von *Chironomus riparius* gezeigt werden.

#### 4.3.3 Monitoring von Organozinnverbindungen

Im Nordwest-Baden-Württembergs werden innerhalb eines 40 x 60 km großes Areal (Details vgl. Kap. 7.1) in insgesamt 14 Bächen Sedimentproben entnommen und nach der DIN 19744 (DIN, 2003) auf 8 Organozinnverbindungen (OZV) untersucht. Zu Vergleichszwecken werden weiterhin Sedimente aus größeren Flüssen Baden-Württembergs beprobt und ebenfalls auf OZV untersucht.

**Tabelle 29:** Übersicht über gemessene Sedimentkonzentrationen an Organozinnverbindungen in Bächen Nordwest-Baden-Württembergs sowie in Rhein, Neckar und Donau. Die jeweiligen Verbindungen wurden nach der DIN 19744 (DIN, 2003) quantifiziert (<1 = unterhalb der Bestimmungsgrenze); Abkürzungen vgl. Kap. 7.1.

Probestelle	Kürzel	MBT	DBT	TBT	TTBT	MOT	DOT	TcHT	TPT
<b>Bäche</b>									
					µg/kg TG				
Kothlachgraben (Hockenheim)	<i>KBH</i>	3.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Kraichbach bei Talhaus	<i>KBT</i>	33.5	19.8	3.8	<1	5.5	4.2	<1	<1
Leimbach bei Brühl	<i>LBB</i>	44.6	16	9	<1	5.3	4.2	<1	<1
Mühlbach bei Dossenheim	<i>MBD</i>	24.3	4.1	<1	<1	3.2	2.4	<1	<1
Kriegbach bei Altlußheim	<i>KBA</i>	11.8	3.2	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Schanzengraben (Rheinhausen)	<i>SBR</i>	20.4	4.8	1.4	<1	1.4	1.7	<1	<1
Philipsburger Altrhein	<i>PBA</i>	24.9	10.4	7.6	<1	2	1.9	<1	<1
Kriegbach bei St. Leon	<i>KBS</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Landgraben bei Nußloch	<i>LGN</i>	11.8	3.4	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Sulzbächle bei Sulzbach	<i>SBS</i>	19	5.4	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Kraichbach bei Kronau	<i>KBK</i>	13.9	6.6	2.5	<1	1.9	<1	<1	<1
Kleiner Bach bei Kronau	<i>KLB</i>	8.6	2.9	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Graben bei Hockenheim	<i>GBH</i>	3.6	2.7	8.8	<1	<1	<1	<1	<1
Breitenbach bei Breitenbrunn	<i>BBB</i>	5.4	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Flüsse</b>									
Donau bei Ingolstadt	-	6.2	2.3	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Donau bei Abbach	-	12.2	3.7	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Donau bei Jochenstein	-	4.4	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Albbruck - Dogern	-	7	2.7	1.2	<1	<1	<1	<1	<1
Birsfelden	-	6.5	2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1
Stauhaltung Weisweil oberhalb Gamsheim	-	7.1	2.7	1.4	<1	33.2	42.1	<1	<1
Kochendorf	-	13.1	9	6	<1	4.3	4.6	<1	<1
Neckarsteinach	-	13.3	5.3	2.2	<1	<1	<1	<1	<1
Plochingen/Deizisau	-	14	6.1	2.3	<1	<1	<1	<1	<1
Hofen	-	7.5	2.6	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Poppenweiler	-	10.9	4.5	2	<1	<1	<1	<1	<1
Hesigheim	-	5.6	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Stauhaltung Weisweil II	-	21.1	9	2.6	<1	<1	<1	<1	<1
	-	8.4	5.3	2	<1	131	209	<1	<1

Wie aus Tabelle 29 deutlich wird, können in einigen Bachsedimenten TBT-Konzentrationen zwischen 1,4 µg/kg TG (SBR) und 9 µg/kg TG (LBB) gemessen werden. Auch die Metabolite des TBT (Dibutylzinn, DBT und Monobutylzinn, MBT) sind an diesen Probestellen erhöht. Auffällig ist, dass in den Flüssen keine gegenüber den Bächen erhöhten TBT-Konzentrationen ermittelt werden können, dies gilt auch für die Stauhaltungen.

Insgesamt können die gemessenen Werte als relativ niedrig angesehen werden. Aufgrund der Tatsache, dass die oberen 0-2 cm Sediment beprobt wurden, kann das Bewertungsschema der ARGE ELBE für schwebstoffbürtige Sedimente zur Beurteilung der Sedimentbelastung mit OZV herangezogen werden. Demzufolge sind alle untersuchten Sedimente, bezogen auf das TBT, in die Belastungsklasse I-II einzustufen (ARBE-ELBE, 1999). Bezogen auf den Metaboliten MBT sind zumindest einige Sedimente höher belastet und somit in die Klasse II-III einzuordnen. Dies gilt insbesondere für die Probestellen KBT und LBB.

Die im Rahmen der Multigenerationsstudien verwendeten TBT-Konzentrationen liegen durchaus im Bereich der Umweltkonzentrationen, dies gilt insbesondere für die in der MGS I eingesetzten Konzentration von 4,5 µg Sn/kg TG (= 10,98 µg TBT/kg TG).

## 4.4 Weitere Arbeiten

### 4.4.1 Einfluss verschiedener genetischer Diversität von *C. riparius* unter Cd-Exposition

In kleinen, isolierten Populationen kann Inzucht zu genetischer Verarmung, verminderter Fitness (Inzucht-depression) und sogar zum Aussterben der gesamten Population führen (FRANKHAM ET AL., 2002). Jedoch ist bisher wenig über die Auswirkungen von Inzucht und verminderter Diversität in Populationen auf die Toleranz gegenüber Schadstoffen bekannt.

Verschiedene Faktoren können die genetische Diversität von Populationen beeinflussen. Generell wird genetische Diversität durch Migration, Mutation und genetische Drift beeinträchtigt (STATON ET AL., 2001). Insbesondere bei isolierten, kleinen Populationen kann genetische Drift zum Verlust von Allelen führen (FRANKHAM ET AL., 2004). Dies wird durch umweltbiologische Stressfaktoren wie Klimaveränderung, Umweltverschmutzung und Biotopverkleinerung verstärkt (KRISTENSEN et al., 2003). Desweiteren existiert in isolierten Populationen ein gewisser Grad an Inzucht, welcher ebenfalls die genetische Diversität verringert und zu einer Reduktion von Fitnessparametern führen kann (FRANKHAM et al., 2004). Inzucht ist bei der Paarung von Verwandten in kleinen isolierten Populationen unabwendbar (FRANKHAM et al., 2004). Studien mit Inzuchtpopulationen von *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die Überlebensrate von Populationen bei geringer Populationsgröße stärker abnimmt (REED ET AL., 2003). Außerdem zeigen Inzuchtlinien eine signifikant überregulierte Expression des Hitzeschock-Proteins Hsp 70 und reduzierte Fruchtbarkeit (PEDERSEN ET AL., 2005). Der negative Effekt von Inzucht auf die Fitness von Organismen wird als Inzuchtdepression bezeichnet (CHARLESWORTH und CHARLESWORTH, 1987; CHEPTOU, 2006) und erhöht die Aussterbewahrscheinlichkeit von Populationen (BIJLSMA ET AL., 2000). Dies konnte ebenso bei wild lebenden Populationen beobachtet werden (NEWMAN und PILSON, 1997; SACCHERI ET AL., 1998). Inzuchtdepression kann sich nach dem Einbringen zusätzlicher Schadstoffe weiter erhöhen. Eine Meta-Analyse hat gezeigt, dass sich die Inzuchtdepression von gestressten Populationen bei 34 betrachteten Datensätzen Mittel zu 76% erhöht (ARMBRUSTER und REED, 2005).

In diesem Kapitel soll untersucht werden, inwieweit die Faktoren Inzucht und genetische Diversität die Fitness von *C. riparius* unter Cadmiumexposition beeinflussen. Hierzu werden *C. riparius*-Populationen mit unterschiedlichen Inzuchtkoeffizienten generiert und in einem Life-Cycle-Test verschiedenen Cadmiumkonzentrationen exponiert. Die Ergebnisse werden in Hinblick auf ihre Bedeutung für den angewandten Artenschutz, aber auch für die Anwendung ökotoxikologischer Biotestverfahren diskutiert.

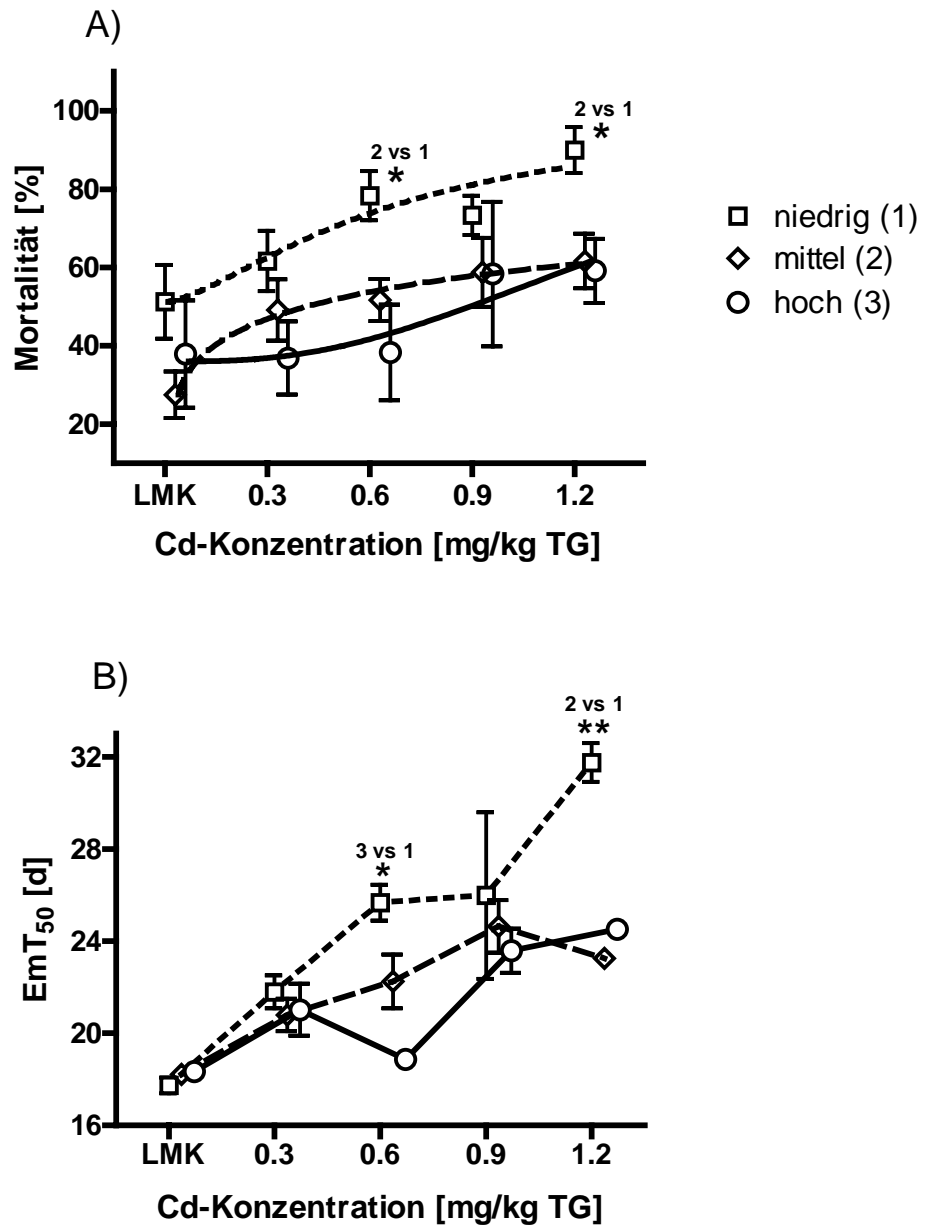
Durch verschiedene Kreuzungsansätze werden je 3 Laborpopulationen mit 3 unterschiedlichen Inzuchtniveaus generiert (Tabelle 30). Hierzu wird die GEN<sup>+</sup>-Zucht der Generation 7 der MGS III als Ausgangspopulation verwendet. Als „hoch“-diverse Ansätze werden Zuchten aus jeweils acht Eigelegen von GEN<sup>+</sup> etabliert, die aus der Multigenerationsstudie III stammen (vgl. Kap. 6.1.3). Um einen hohen Grad an Inzucht zu generieren („niedrig“ divers), werden in zwei aufeinanderfolgenden Generationen die Nachkommen eines einzigen Eigeleges hochgezüchtet und miteinander verpaart. Ein intermediäres Inzuchtniveau („mittel“) wird etabliert, indem die Nachkommen von zwei Eigelegen miteinander gekreuzt werden. Um von jedem Diversitätsniveau unabhängige Replikate zu erhalten, werden alle Kreuzungsansätze jeweils drei mal parallel unter Verwendung unterschiedlicher Eigelege durchgeführt.

**Tabelle 30:** Kreuzungsansätze der Zuchten mit 3 unterschiedlichen Niveaus an genetischer Diversität. F = Inzuchtkoeffizient, H<sub>E</sub> = erwartete Heterozygotie, SD = Standardabweichung (n = 3).

„Diversität“	F	H <sub>E</sub> (±SD)
niedrig	0,375	0,20 (± 0,04)
mittel	0,125	0,27 (± 0,03)
hoch	0	0,29 (± 0,02)

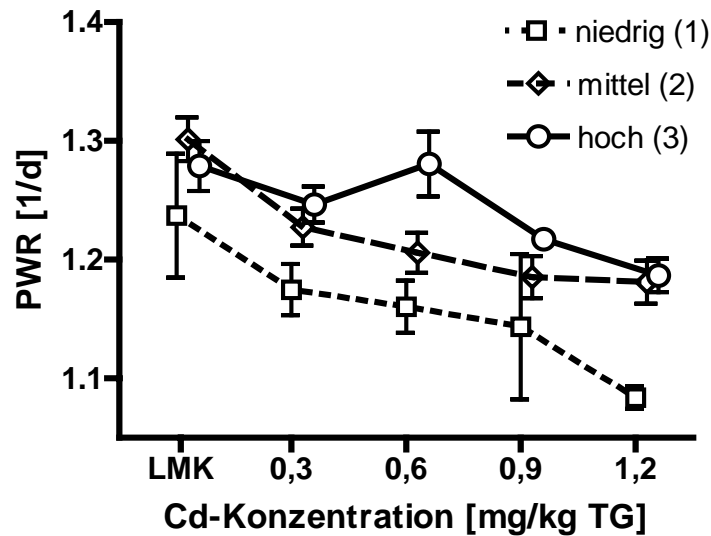
Die genetische Diversität der Zuchtansätze wird mit Hilfe von Mikrosatellitenanalysen an fünf variablen Genorten nach Nowak ET AL. (2006) bestimmt (vgl. Kap. 5.2). Es werden 24 Individuen pro Diversitätsniveau und Replikat untersucht. Mit den Nachkommen aller Zuchten wird ein Life-Cycle-Test mit Cadmiumbelastetem Sediment in Anlehnung an die OECD Guideline 218 (OECD, 2004a) durchgeführt. Es werden vier Cd-Konzentrationen und eine entsprechende Lösemittelkontrolle verwendet und die Endpunkte Mortalität, der mittlere Schlupfzeitpunkt (EmT50) und die PWR berücksichtigt.

Die mittlere Mortalität und der EmT50 steigen in allen Ansätzen mit erhöhter Cadmiumkonzentration an. Dabei reagieren die Populationen mit dem niedrigsten Diversitätsniveau eindeutig am sensitivsten (Abb. 32). Die Populationswachstumsrate wird ebenfalls bei Populationen mit niedriger genetischer Diversität am stärksten verringert (Abb. 33). Insbesondere beim EmT50 kann eine signifikante Interaktion ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA) zwischen dem Inzuchtniveau und dem Belastungsgrad festgestellt werden.



**Abbildung 32:** Mortalität und mittlerer Schlupfzeitpunkt (EmT<sub>50</sub>) von 3 verschiedenen genetisch diversen Zuchtansätzen (siehe Legende für das Diversitätsniveau). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n = 3). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle wurden mittels ungepaarten t-Tests berechnet.

Während sich unter Cadmiumbelastung bei verschiedenen Parametern signifikante Einflüsse des Inzuchtniveaus zeigen, können unter Kontrollbedingungen keine Tendenzen festgestellt werden. Insgesamt erfüllen vier der neun Ansätze die Validitätskriterien der OECD-Richtlinie für *Chironomus*-Tests.



**Abbildung 33:** Populationswachstumsrate von 3 verschiedenen genetisch diversen Zuchtansätzen (siehe Legende für das Diversitätsniveau) bei Exposition gegenüber unterschiedlichen Cadmiumkonzentrationen im Sediment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n = 3).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Inzucht die Fitness von *C. riparius*-Populationen unter Cadmium-Belastung erniedrigt. In der Kontrolle können keine Unterschiede in der EmT50 beobachtet werden; demgegenüber zeigen nur die stark ingezüchteten und genetisch verarmten Populationen unter hoher Cadmiumbelastung einen dramatisch verzögerten Schlupfzeitpunkt. Die Ergebnisse der *two-way* ANOVA zeigen weiterhin die Bedeutung der Aufnahme verschiedenster Fitnessparameter bei der Untersuchung der Auswirkungen von Umweltstress und Inzucht auf Life History-Parameter. Einige Endpunkte waren weder von Cadmium noch von Inzucht beeinflusst, während bei anderen entweder ein Einfluß der Belastung, der Inzucht oder beider Faktoren festgestellt werden konnte. Eine signifikante Interaktion der beiden Stressoren wird beim mittleren Schlupfzeitpunkt festgestellt.

Die Ergebnisse haben sowohl für die Durchführung von *Chironomus*-Tests als auch für den Artenschutz Relevanz. Zum einen kann Inzucht in Laborzuchten die Ergebnisse von Expositionstudien beeinflussen und zum anderen könnte das Aussterberisiko kleiner, isolierter Populationen im Freiland bereits durch eine geringfügige Belastung mit Schadstoffen erhöht werden. Inzucht kann folglich zumindest einen Teil der in *Chironomus*-Tests häufig beobachteten Abweichungen zwischen verschiedenen Tests erklären und die Ergebnisse sollten auch auf andere, sich sexuell reproduzierende Organismen übertragbar sein.



Wenngleich *Chironomus riparius* im Freiland eine hohe genetische Diversität aufweist und in der Regel nicht von Inzucht bedroht scheint, so sollten die Ergebnisse jedoch auch auf andere Organismengruppen zu übertragen sein. Inzucht und genetische Verarmung treten insbesondere bei lokal isolierten und kleinen Populationen auf (Reliktpopulationen, endemische und vom Aussterben bedrohte Arten). Unseren Ergebnissen zufolge könnten diese Arten eine erhöhte Schadstoffsensitivität zeigen, als dies bei häufigen, verwandten Arten der Fall ist. Daher scheinen insbesondere seltene und bedrohte Arten übermäßig durch Schadstoffeintrag bedroht zu sein, während häufige und individuenstarke Arten nicht nur durch eine größere demographische Toleranz und eine größere Anpassungsfähigkeit, sondern auch durch eine niedrigere Schadstoffsensitivität „geschützt“ sind.

#### 4.4.2 Reaktion genetisch charakterisierter *C. riparius* -Populationen auf Cd-Streß

Es ist bekannt, dass sich unterschiedliche Arten deutlich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Schwermetallbelastung unterscheiden können (BROWN & PASCOE, 1988). Jedoch haben bisher erst wenige Studien die innerartliche Variabilität der Reaktion auf Schadstoffexposition untersucht. Untersuchungen an sich hauptsächlich klonal reproduzierenden Organismen, wie *Daphnia magna* (BARATA ET AL., 2002), *Folsomia candida* (BARATEIRO ET AL., in Vorbereitung) oder *Potamopyrgus antipodarum* (JENSEN & FORBES, 2001) zeigen, dass verschiedene Genotypen unterschiedliche Toleranzen gegenüber Chemikalienstress aufweisen können. Insbesondere bei sexuell sich fortpflanzenden Arten sind die Verhältnisse durch Genfluss und den Einfluss von Inzucht und genetischer Diversität innerhalb von Populationen besonders komplex, weshalb molekulargenetische Untersuchungen wichtige Erkenntnisse über mögliche Ursachen von Toleranzunterschieden bringen könnten.

Im vorliegenden Kapitel werden sechs für ökotoxikologische Testverfahren verwendete Laborzuchten der Zuckmücke *C. riparius* aus insgesamt fünf Ländern auf ihre *Life-History*-Reaktion gegenüber Cadmium getestet. Die Populationen werden mittels Mikrosatellitenanalyse genetisch charakterisiert. Insbesondere zwei Fragen sollen in der Untersuchung beantwortet werden:

A: Gibt es signifikante Unterschiede in der Reaktion auf Cd-Exposition in den untersuchten *C. riparius*-Zuchten?

B: Lassen sich diese Unterschiede durch die genetische Struktur der Zuchten erklären?

Die Ergebnisse haben insbesondere in Hinsicht auf die Vergleichbarkeit von ökotoxikologischen Daten, die in *Chironomus*-Testverfahren generiert wurden, als auch auf die Übertragbarkeit von Labordaten auf die komplexen Verhältnisse im Freiland Relevanz.

Mit sechs verschiedenen Populationen aus europäischen Labors (Deutschland, Frankreich, Niederlande, Portugal) werden gleichzeitig und randomisiert *Life-Cycle*-Tests unter standardisierten Laborbedingungen nach OECD-Richtlinie 218 (OECD, 2004a) durchgeführt (Tab. 31).

**Tabelle 31:** Abkürzungen und Herkunft der verwendeten Laborstämme von *C. riparius*.

Abk.	Ursprung
AMS	University of Amsterdam, Niederlande
ECT	ECT Ökotoxikologie GmbH, Flörsheim, Deutschland
FFM	Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland
LYO	Cemagref, Lyon, Frankreich
PTG	University of Aveiro, Portugal
RIZ	RIZA, Lelystad, Niederlande

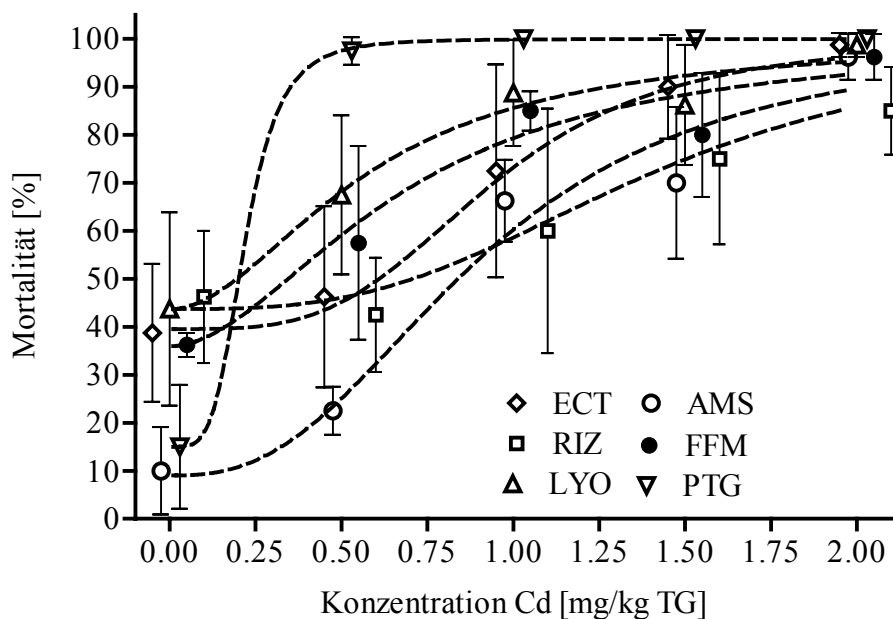
Als Endpunkte werden die Larvalmortalität, der Schlupfzeitpunkt und die Fruchtbarkeit bestimmt. Pro Populationen und Behandlungsgruppe werden 4 Replikate mit je 20 Tieren angesetzt. Neben einer unbelasteten Lösemittelkontrolle werden die Tiere verschiedenen Cadmiumkonzentrationen über das Sediment exponiert (0.5, 1.0, 1.5 und 2.0 mg Cd/kg TG). Genetische Struktur und Variabilität (dargestellt als ‚Erwartete Heterozygotie‘) innerhalb der Populationen werden mittels fünf variablen Mikrosatellitenmarkern bestimmt (NOWAK ET AL., 2006). Die einzelnen ökotoxikologischen und genetischen Parameter werden wie in den vorhergegangenen Kapiteln beschrieben berechnet. Weiterhin wird für jeden aufgenommenen *Life-History*-Parameter eine *two-way* ANOVA durchgeführt, um den Einfluß von Cadmium und dem Grad an genetischer Diversität auf die Variabilität im Datensatz zu bestimmen und mögliche Interaktionen zwischen den „Stressoren“ zu testen. Hierzu werden die drei verarmtesten (PTG, LYO, ECT; „*low level*“) und die drei diversesten Populationen (AMS, FFM, RIZ; „*high level*“) zu einem genetischen „Diversitätslevel“ zusammengefasst.

Die Analyse der genetischen Diversität bestätigt die in Kapitel 3.3.3 dargestellten Ergebnisse. Wie aus Tabelle 32 deutlich wird, sind alle Populationen gegenüber den Freilandpopulationen genetisch verarmt, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zuchten festgestellt werden können ( $H_E$  von 0 (PTG) bis 0,31 (AMS)).

**Tabelle 32:** Genetische Diversität von sechs untersuchten Laborstämmen von *C. riparius*. Dargestellt sind die erwartete ( $H_E$ ) und beobachtete ( $H_O$ ) Heterozygotie, sowie der Shannon Index (SI), die durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Locus ( $N_A$ ) und die Stichprobengröße (N).

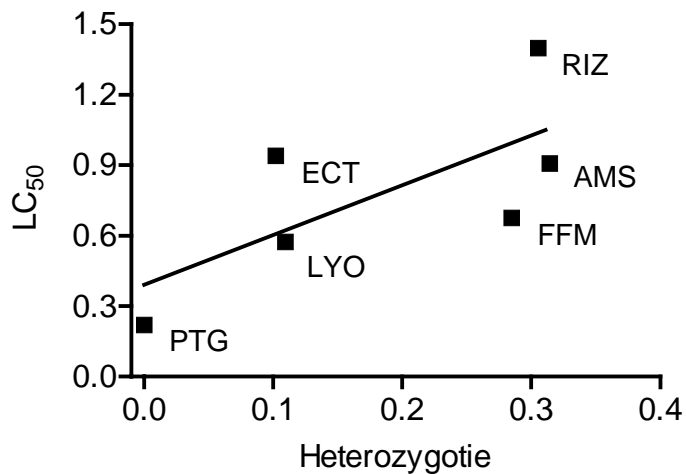
Stamm	$H_E$	$H_O$	SI	$N_A$	N
AMS	0,314	0,367	0,456	1,8	24
ECT	0,102	0,092	0,138	1,2	24
FFM	0,285	0,235	0,426	1,8	24
LYO	0,101	0,127	0,158	1,4	22
PTG	0	0	0	1	23
RIZ	0,305	0,282	0,442	1,8	22

Cadmium hat bei allen sechs Populationen klare Effekte auf die Larvalmortalität, wobei signifikante Unterschiede in der Sensitivität beobachtet werden können. Während bei PTG die Mortalität schon bei 0,5 mg Cd/kg TG nahezu 100% erreicht, treten bei RIZ erst bei der höchsten Belastungsstufe (2 mg Cd/kg TG) signifikante Effekte auf (Abb. 31).



**Abbildung 34:** Larvalmortalität von sechs Chironomus-Zuchten bei verschiedenen Cd-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung basierend auf je 4 Replikaten pro Population und Behandlungsgruppe.

Es zeigt sich ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen der Schadstoffsensitivität (als  $LC_{50}$ ) und dem Grad an genetischer Variation in den Zuchten (Abb. 35).



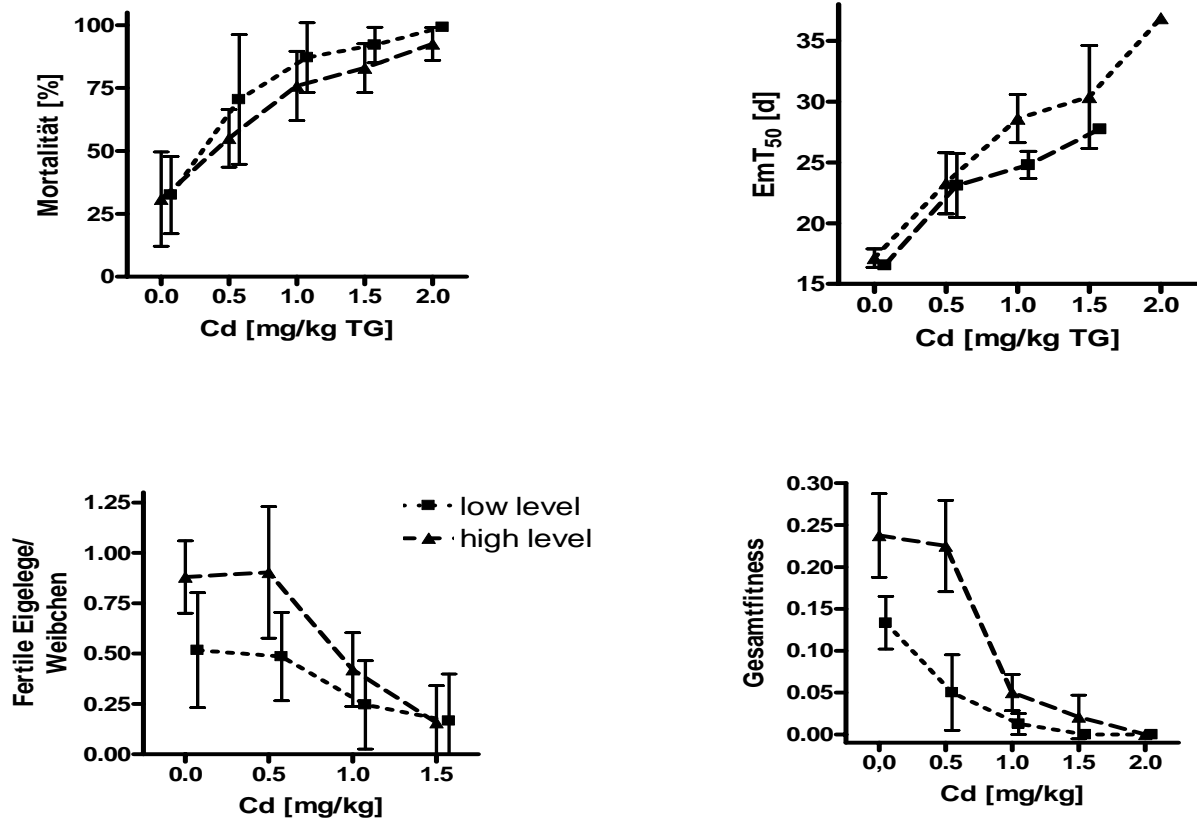
**Abbildung 35:** Korrelation zwischen LC50 und genetischer Variabilität (als erwartete Heterozygotie) bei sechs *Chironomus*-Zuchten ( $r^2 = 0,49$ ;  $p = 0,12$ ).

Unter Kontrollbedingungen kann eine signifikante Korrelation zwischen der Heterozygotie und der Populationswachstumsrate, jedoch nicht bei einem Einzelparameter gefunden werden. Unter leichtem Cadmiumstress wird die Korrelation stärker, jedoch verschwindet dieser Effekt bei höheren Cd-Konzentrationen wieder. (Tab. 33).

**Tabelle 33:** PEARSON Korrelation zwischen der erwarteten Heterozygotie und der Mortalität von sechs *C. riparius*-Zuchten bei verschiedenen Cadmiumkonzentrationen (mg/kg TG). Die Werte geben den Korrelationskoeffizienten  $r$  bei der jeweiligen Cadmiumkonzentration (mg/kg TG) an. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . „-“ = keine Berechnung möglich

Endpunkt	r (0.0)	r (0.5)	r (1.0)	r (1.5)	r (2.0)
Mortalität	0,0981	-0,799	-0,741	-0,961**	-0,6679
EmT50	0,253	0,695	0,847	-	-
Reproduktion	0,7805	0,6467	0,4614	-0,0831	-
Fitness	0,888*	0,944**	0,844*	0,485	

Die Einteilung der Zuchten in einen genetisch höher und einen weniger diversen Ansatz ergibt einen signifikanten Einfluß der genetischen Diversität auf die Gesamtfitness, sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter leichter Cd-Belastung (Abb. 36; Tab. 34). Bei höheren Belastungsstufen verschwindet der Diversitätseffekt jedoch durch hohe Mortalitäten in allen Populationen wieder. Dieser Effekt spiegelt sich in den wichtigen Einzelkomponenten Mortalität und Reproduktion wieder (Abb. 36). Auch hier kann unter leichten Stressbedingungen ein erhöhter Diversitätseinfluß gemessen werden, der bei extremen Belastungsstufen wieder verschwindet.



**Abbildung 36:** Anzahl produzierter befruchteter Eigelege pro eingesetzte Larve bei verschiedenen Cd-Konzentrationen. Die gestrichelte Linie und Dreiecke zeigen die 3 genetisch diversesten Zuchten an, die gepunktete Linie und Quadrate zeigen die 3 verarmtesten Populationen.

**Tabelle 34:** Ergebnisse einer 2-way-ANOVA mit den Faktoren Population (Herkunft) und Cadmium-Belastung, und der abhängigen Variable Mortalität, EmT<sub>50</sub>, Reproduktion (fruchtbare Eigelege pro geschlüpftem Weibchen) und Gesamtfitness (als Anzahl befruchteter Eigelege/eingesetztem Individuum). Gezeigt ist der Anteil an der Gesamtvarianz [%], der durch den jew. Faktor erklärt werden kann. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  \*\*\* =  $p < 0,001$

Effekt	Mortalität	EmT <sub>50</sub>	Reproduktion	Fitness
Interaktion	3,18	2,67	5,89	10,53**
Gen. Diversität	7,03*	2,54	11,95*	20,21***
Belastung	71,19***	71,74***	46,25**	60,00***

Beim Vergleich der sechs Einzelzuchten zeigen sich signifikante Unterschiede in der Reaktion auf eine Belastung mit Cadmium. Es kann gezeigt werden, dass die Schadstofftoleranz zumindest teilweise mit dem Grad an allelischer Variation, die an den Mikrosatellitenloci gemessen wurde, korreliert. Diese Ergebnisse harmonisieren mit den in Kapitel 8.1 gezeigten Daten zum Einfluß von Inzucht auf die Cadmiumtoleranz bei *C. riparius*. Daher ist davon auszugehen, dass Inzucht auch bei den hier gemessenen Unterschieden ein wichtiger Faktor ist. Insbesondere bei der PTG-Population, die bereits hochsensitiv gegenüber leichter

Belastung reagiert, kann eine extreme Verarmung mit dem molekulargenetischen Testsystem festgestellt werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die genetische Struktur von Testzuchten die Ergebnisse von Expositionsstudien beeinflussen kann. Genetische Analysen können bei der Identifizierung potentiell abweichender Zuchten hilfreich sein, wie die Untersuchung der genetischen Variabilität der sechs ausgewählten *Chironomus*-Zuchten zeigen. Durch regelmäßige Analysen können möglicherweise stark abweichend reagierende Populationen identifiziert und so die Vergleichbarkeit einzelner Studien und deren Freilandrelevanz deutlich erhöht werden.

Die Übereinstimmung mit den in Kapitel 8.1 ermittelten Ergebnissen zeigt auch noch einmal die Relevanz der Daten für den Schutz seltener und bedrohter Populationen in belastungsgefährdeten Habitaten. Auch in diesem Versuch reagiert die genetisch am stärksten verarmte Population am sensitivsten auf die Umweltbelastung und zeigt das bei weitem höchste Aussterberisiko. Die häufig nachgewiesene Tatsache, dass Inzucht und genetische Verarmung gerade kleine und lokal beschränkte Populationen gefährden (FRANKHAM ET AL., 2004), bestätigt die Bedeutung einer Reduzierung der Chemikalienbelastung für den Schutz und den Erhalt bedrohter Populationen und Arten.

#### 4.4.3 Temperaturexperimente mit verschiedenen Populationen

In den letzten 100 Jahren hat sich das Weltklima zwischen 0,3 und 0,6°C erwärmt (MCCARTY, 2001; FENT, 2003). Diese Erwärmung erfolgte vor allem in den Perioden 1925-1944 und 1978-1997 (JONES ET AL., 1999; FENT, 2003) und variierte geographisch (EASTERLING ET AL., 2000). Seit über 1000 Jahren war das 20. Jahrhundert das wärmste und 1990-2000 das wärmste Jahrzehnt des ganzen Jahrtausends. Änderungen des Klimas werden durch zahlreiche Treibhausgase wie z.B. Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), Methan (CH<sub>4</sub>), und Lachgas (N<sub>2</sub>O) verursacht. Die gegenwärtige Klimaerwärmung ist dabei im Gegensatz zu früheren Warmzeiten vor allem auf einen anthropogenen Ursprung zurückzuführen. Die Emission von CO<sub>2</sub> durch die uneingeschränkte Verbrennung fossiler Energieträger und Veränderungen in der Landnutzung (Waldrodung) ist der Hauptfaktor des anthropogenen Treibhauseffekts (Anteil 64%, FENT, 2003). Das Problem der Klimaerwärmung wurde bereits in den letzten Jahrzehnten des vergangenen Jahrhunderts diskutiert und erst heute wurde der neue UN-Klimabericht vorgestellt. Beispielsweise drohen Deutschland wärmere Sommer mit extremen Dürreperioden und mildere, feuchtere Winter. Im Kyoto-Protokoll haben sich die Industriestaaten zu einer Reduktion der Treibhausgasemission verpflichtet. Dieses Protokoll schreibt den Industriestaaten bis zur Bemessungsperiode 2008-2012 eine Reduktion ihrer

Treibhausgase um mindestens 5% (EU und Schweiz 8%) gegenüber dem Stand von 1990 vor (FENT, 2003). Selbst wenn es gelingt, die Konzentration der Treibhausgase zu stabilisieren, kommt es vermutlich zu einer weiteren signifikanten Erwärmung und eines Anstiegs des Meeresspiegels (MEEHL ET AL., 2005). Verschiedene Untersuchungen prognostizieren bis Ende des 21. Jahrhunderts eine Zunahme der globalen Temperatur um 1,5-5,8°C (HOUGHTON ET AL., 2001; FENT, 2003).

Mit dieser weiteren Klimaerwärmung sind tiefgreifende Veränderungen in Ökosystemen verbunden. Eine Vielzahl von Arbeiten hat bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Klimas und beobachteten Veränderungen der Funktion und Komposition ökologischer Gemeinschaften, sowie der Phenologie und Verbreitung vieler Arten besteht (PARMESAN, 1996; BROWN ET AL., 1999; PARMESAN ET AL., 1999; POUNDS ET AL., 1999). Auch der Rückgang von Populationen, sowie lokales und globales Artensterben konnten mit der globalen Temperaturerwärmung in den letzten Jahren in Verbindung gebracht werden (MCCARTY, 2001). Das Klima hat folglich weitreichende Effekte auf Arten und Ökosysteme. Die direkten Effekte der Temperatur auf die Physiologie von Organismen sind bereits sehr gut dokumentiert und viele auftretende Mechanismen wurden identifiziert (WIESER, 1973; WOOD & MCDONALD, 1996). Indirekte Effekte dagegen stellen eine unerwartete Herausforderung für den Schutz der biologischen Vielfalt dar. Ein gegenläufiger Effekt zu den negativen Auswirkungen der Temperaturerhöhung auf Population ist die Anpassungsfähigkeit. So sind Populationen in der Lage sich auf neue Umweltbedingungen einzustellen. Eine wichtige Ressource für die mögliche Anpassungsfähigkeit an sich verändernde Umweltbedingungen ist die genetische Variabilität. Sie stellt eine wichtige Basis in Form von Allelen und Genotypen für zukünftige Generationen dar (FRANKHAM, 2005). In den Experimenten soll deshalb überprüft werden, ob genetisch unterschiedliche Populationen der Zuckmücke *C. riparius* unterschiedlich auf eine moderate Temperaturschwankung von  $\pm 3$  °C reagieren und inwieweit die genetische Vielfalt durch die Temperaturveränderung beeinflusst wird.

Die Experimente werden ähnlich wie das TBT-Vorexperiment in 600 mL Bechergläsern, welche mit 100 g Quarzsand und 400 mL rekonstituiertem Wasser befüllt wurden durchgeführt (Vogt ET AL. 2007a). Als Temperaturen werden 17, 20 und 23 °C ausgewählt. Die gesamten Experimente erfolgen in regelbaren Temperaturschränken (BK 600, SORVALL Heraeus, Kendro Laboratory Products). Zum genauen Einstellen der Temperatur wird zu Beginn der Experimente die Wassertemperatur mehrmals überprüft und im Falle von

Abweichungen diese entsprechend nachgeregelt. Da die Temperaturverteilung innerhalb der Klimaschränke geringe Unterschiede aufwies, werden die Bechergläser täglich randomisiert. Nach der Gleichgewichtseinstellung über drei Tage werden jeweils 20 frisch geschlüpfte L1 Larven aus sechs unterschiedlich diversen Populationen eingesetzt (Tab. 35). Diese werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Lösemittelkontrollen der parallel dazu durchgeführten MGS I & III sowohl aus der GEN+ als auch aus der GEN-Population entnommen. Weiterhin wird eine zusätzliche *C. riparius* Population (ECT Ökotoxikologie GmbH, Flörsheim) in die Versuche integriert. Die Versuchsdurchführung sowie die Aufnahme der Endpunkte erfolgt ebenfalls wie im TBT-Vorexperiment. Um Temperatureffekte auf die genetische Diversität zurückführen zu können, werden zwei Populationen (GEN+I\_6 & GEN-I\_6) in der F1-Generation mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht.

**Tabelle 35:** Ausgewählte Populationen für die Temperaturexperimente

Populationsbezeichnung	Herkunft
GEN+I_6	GEN+ (Generation 6, MGSI)
GEN-I_6	GEN- (Generation 6, MGSI)
GEN+I_8	GEN+ (Generation 8, MGSI)
GEN- I_8	GEN- (Generation 8, MGSI)
GEN+ III_3	GEN+ (Generation 3, MGS III)
ECT	GEN- (ECT Ökotoxikologie GmbH)

In den durchgeführten Life-Cycle Experimenten werden die Validitätskriterien nach der OECD Guideline 218 (OECD, 2004a) in der Kontrollbehandlung (LMK bei 20 °C) mit Ausnahme des Experimentes mit der ECT-Population erfüllt. Dabei schlüpfen in der Kontrolle stets mehr als 70% aller eingesetzten Tiere, die Temperatur liegt zwischen 20±1 °C und die Hauptschlupfphase findet zwischen dem 12. und 23. Versuchstag statt. Im Experiment mit der ECT-Population wird in der Lösemittelkontrolle (20 °C) eine mittlere Mortalität von ca. 60% beobachtet und das Experiment kann dadurch nur eingeschränkt ausgewertet werden.

#### *Genetische Diversität der Ausgangspopulationen*

Die genetischen Analysen zeigen, dass die GEN+I\_6 Population die höchste genetische Diversität der sechs eingesetzten Populationen besitzt (Tab. 36). GEN+III\_3 weist im Gegensatz dazu schon eine deutlich niedrigere Diversität, bedingt durch die Erhöhung des Inzuchtlevels im Fortgang der MGS auf (NOWAK ET AL., 2007). So beträgt die erwartete Heterozygotie ( $H_e$ ) der GEN+I\_6 mit 0,536 ca. 1,5 mal soviel wie die erwartete Heterozygotie ( $H_e = 0,343$ ) der GEN+III\_3. Beide GEN-Populationen besitzen eine deutlich niedrigere

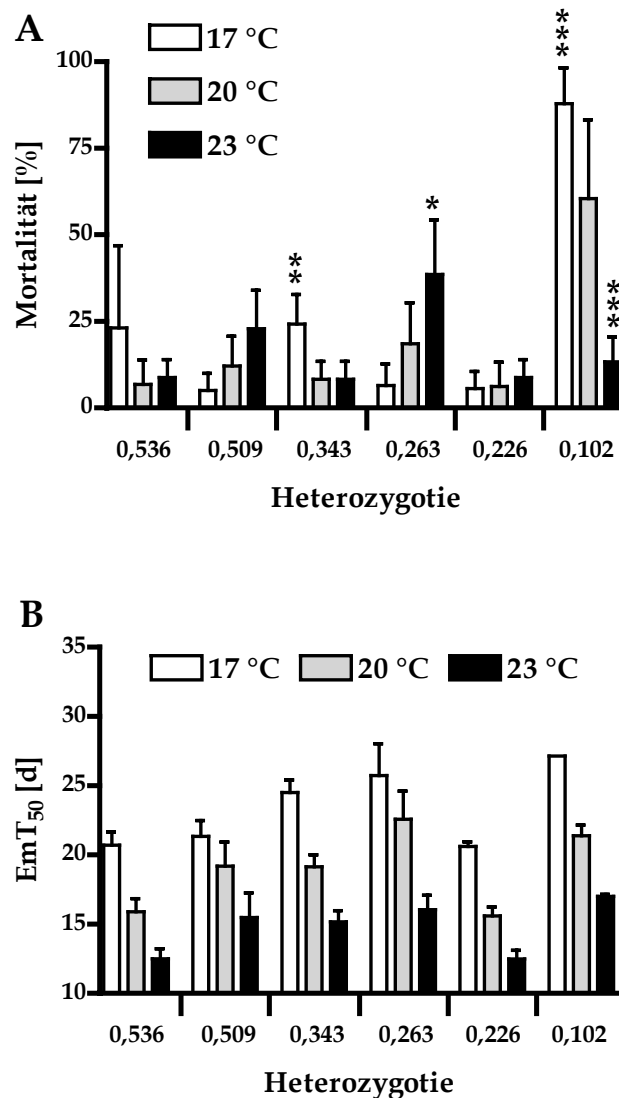


genetische Diversität als die drei GEN+Populationen auf. Die niedrigste genetische Variabilität wird bei der ECT-Population mit einer erwarteten Heterozygotie von 0,102 festgestellt.

**Tabelle 36:** Genetische Diversität der eingesetzten Populationen für die Temperaturexperimente.

Population	Erwartete Heterozygotie
GEN+I_6	0,536
GEN+I_8	0,509
GEN+ III_3	0,343
GEN- I_8	0,263
GEN-I_6	0,226
ECT	0,102

In den Experimenten ist deutlich zu erkennen, dass die Mortalität der genetisch variableren Population in den Lösemittelkontrollen bei Temperaturschwankungen von  $\pm 3$  °C nicht beeinflusst wird (Abb. 37A). So betragen die maximalen Mortalitäten in beiden Experimenten mit GEN+I\_6 ( $H_e = 0,536$ ) und GEN+I\_8 ( $H_e = 0,509$ ) temperaturunabhängig ca. 25%. Im Gegensatz dazu werden deutliche Effekte der Temperaturschwankung bei den Populationen GEN+III\_3 ( $H_e = 0,343$ ) und GEN-I\_8 ( $H_e = 0,263$ ) beobachtet. So erhöht sich die Mortalität signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test) bei GEN+III\_3 bei einer Temperaturerniedrigung von 3 °C. Im Vergleich dazu erhöht sich die Mortalität bei GEN-I\_8 bei Temperaturerhöhung signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test). Für GEN-I\_6 werden keine Effekte der Temperaturveränderung auf die Mortalität festgestellt, wobei diese ein niedriges Niveau von ca. 8% aufweisen. Dramatische Effekte werden bei der ECT-Population ( $H_e = 0,102$ ) beobachtet. Diese bricht bei 17 °C mit einer Mortalität von ca. 85% fast völlig zusammen. Auch bei der Standardtemperatur von 20 °C werden im Gegensatz zur 23 °C Behandlungsgruppe erhöhte Mortalitäten festgestellt. Im Allgemeinen konnte kein signifikanter Einfluss der genetischen Diversität auf die Mortalität bei den drei Temperaturen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ; Pearson-Korrelation). Auch unabhängig von der genetischen Diversität besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Mortalität ( $p > 0,05$ ; Pearson-Korrelation).



**Abbildung 37:** *Chironomus riparius*. Mortalität (MW  $\pm$  SD, in %) (A) und EmT<sub>50</sub> (MW  $\pm$  SD, in d) (B) unterschiedlich genetisch diverser Populationen (erwartete Heterozygotie). Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test zwischen den Behandlungsgruppen bei 17 bzw. 23 °C und der Behandlungsgruppe bei Standardtemperatur (20 °C) ermittelt (★  $p < 0,05$ ; ★★★  $p < 0,001$ ,  $n = 6-12$ ). Bei der EmT<sub>50</sub> sind die Behandlungsgruppen bei den Temperaturen von 17 und 23 °C stets signifikant von (★★★  $p < 0,001$ ) der Behandlungsgruppe bei 20 °C verschieden.

#### Mittlerer Emergenzzeitpunkt (EmT<sub>50</sub>)

In den Experimenten kann deutlich der Einfluss der Temperatur auf den mittleren Emergenzzeitpunkt der Tiere beobachtet werden, wobei die Imagines unabhängig von der genetischen Diversität bei niedrigeren Temperaturen einen signifikant ( $p < 0,001$ , Pearson-Korrelation) verzögerten Emergenzzeitpunkt im Vergleich zu den höheren Temperaturen aufweisen (Abb. 37B,  $p < 0,001$ , Pearson-Korrelation). Auffällig ist der sehr gute lineare Zusammenhang zwischen dem mittleren Emergenzzeitpunkt und der Temperatur in allen

Populationen, wobei stets Korrelationskoeffizienten oberhalb von 0,96 berechnet werden. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die genetische Diversität keinen Einfluss auf den mittleren Emergenzzeitpunkt hat ( $p > 0,05$ , Pearson-Korrelation).

#### *Gelege pro Weibchen und Gelegegröße*

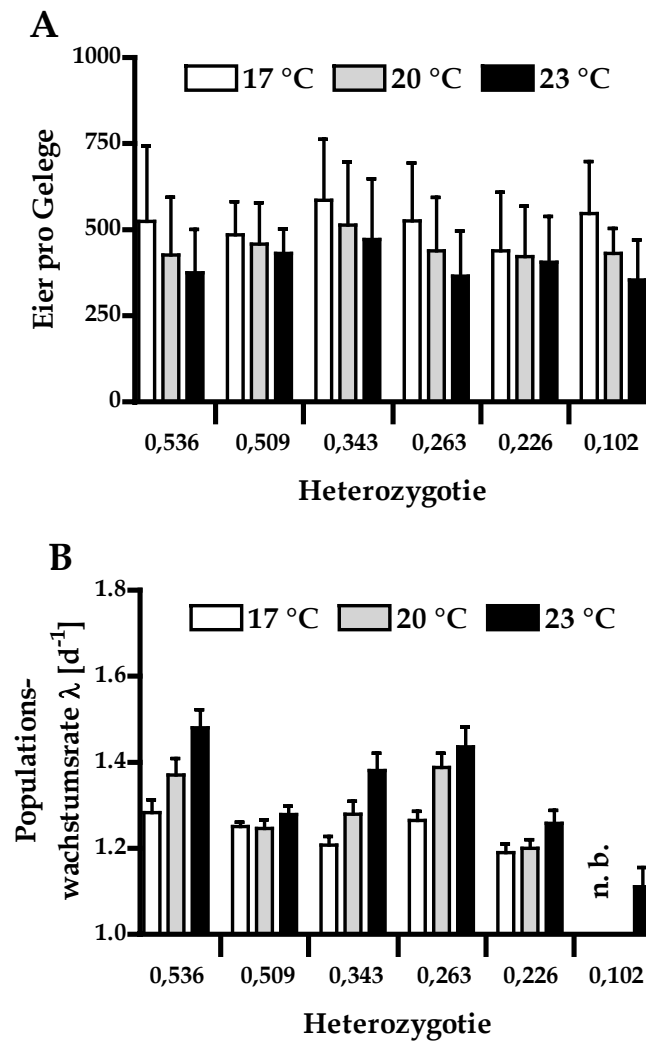
Im Hinblick auf die Gelegezahl pro Weibchen kann festgestellt werden, dass die Tiere aller Populationen, mit Ausnahme der ECT-Population, temperaturunempfindlich sind und die Gelegeanzahl pro Weibchen zwischen 0,67 und 1,40 schwankt (Tab. 37). Die Entwicklungsfähigkeit der produzierten Gelege wird durch die Temperatur ebenfalls nicht beeinflusst, wobei in diesen fünf Experimenten stets mehr als 55% aller produzierten Gelege entwicklungsfähig sind. Die Anzahl an fertilen Gelegen pro Weibchen schwankt zwischen 0,39 und 0,98. Auffällig ist allerdings, dass bei der ECT-Population, welche die niedrigste genetische Diversität aufweist ( $H_e = 0,100$ ), wenige Gelege pro Weibchen produziert werden. Weiterhin sind bei den Temperaturen von 17 und 20 °C keine entwicklungsfähigen Gelege zu beobachten. Bei der höchsten Temperatur produziert jedes Weibchen ca. 0,66 Gelege und davon sind nur 8% entwicklungsfähig. Im Allgemeinen kann anhand dieses Parameters kein signifikanter Temperatureinfluss festgestellt werden ( $p > 0,05$ , Pearson-Korrelation). Allerdings spielt die genetische Diversität temperaturunabhängig eine wichtige Rolle, wobei Populationen mit einer geringeren genetischen Diversität signifikant ( $p < 0,05$ , Pearson-Korrelation) weniger Gelege pro Weibchen (gesamt) produzieren. Im Hinblick auf die entwicklungsfähigen Gelege pro Weibchen verstärkt sich dieser Zusammenhang sogar ( $p < 0,01$ , Pearson-Korrelation).

**Tabelle 37:** Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil) und mittlere Gelegegröße ( $\pm$  SD,  $n$ ) der Temperaturexperimente bei 17, 20 und 23 °C mit den vier Populationen (n.b. nicht bestimmbar aufgrund zu hoher Mortalität).

Behandlung	Gelege pro Weibchen (gesamt bzw. fertil)		
	17 °C	20 °C	23 °C
GEN+I_6	1,31/0,98	1,34/0,96	1,00/0,92
GEN+I_8	1,00/0,77	0,93/0,51	0,67/0,39
GEN+III_3	0,67/0,51	0,98/0,62	1,04/0,76
GEN-I_6	0,98/0,54	1,40/0,93	0,84/0,64
GEN-I_8	0,71/0,52	0,74/0,53	0,78/0,48
ECT	0,22/0,00	0,54/0,00	0,66/0,05

Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Gelegegröße unabhängig von der genetischen Diversität durch die Temperaturveränderung beeinflusst wird (Abb. 38A). Je höher die

Temperatur, desto kleiner werden die Gelege ( $p < 0,05$ , Pearson-Korrelation). Allerdings kann dieser Zusammenhang zwischen den Temperaturansätzen einzelner Populationen aufgrund der großen Schwankungen innerhalb des Datensatzes nicht ermittelt werden. Weiterhin kann kein signifikanter Einfluss der genetischen Diversität auf die Gelegegröße festgestellt werden ( $p > 0,05$ , Pearson-Korrelation).



**Abbildung 38:** *Chironomus riparius*. Eier pro Gelege (MW  $\pm$  SD) (A) und Populationswachstumsrate ( $\pm$  SD, in  $d^{-1}$ ) (B) der unterschiedlich genetisch diversen Populationen (erwartete Heterozygotie).

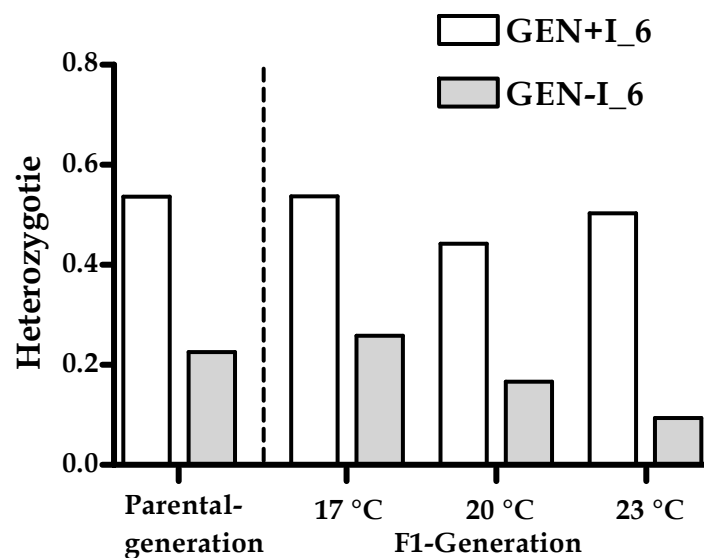
#### Populationswachstumsrate

Bei der ECT-Population kann, aufgrund der nicht vorhandenen entwicklungsfähigen Gelege pro Weibchen nur für die höchste Temperatur eine PWR berechnet werden (Abb. 38B). Die anderen fünf Populationen weisen bei den drei Temperaturniveaus stets PWR oberhalb von  $1,2 d^{-1}$  auf und es kann ein signifikanter ( $p < 0,05$ ; Pearson-Korrelation) Zusammenhang zwischen der Temperatur und der PWR festgestellt werden. Je höher die Temperaturen sind,

desto höher sind auch die PWR. Die genetische Diversität hat allerdings auf die Populationswachstumsrate keinen Einfluss.

### *Genetische Diversität*

Es können kaum Effekte der Temperaturexposition auf die Folgegeneration der GEN+I\_6 Population festgestellt werden. So weist die erwartete Heterozygotie nur eine geringe Schwankungsbreite in der F1-Generation zwischen 0,443 und 0,537 auf. Bei der GEN-I\_6 kann allerdings eine deutliche Abnahme der genetischen Diversität in der 23 °C Behandlungsgruppe in der F1-Generation beobachtet werden. Die erwartete Heterozygotie sinkt hier im Vergleich zur Parentalgeneration von 0,226 auf 0,093 ab (Abb. 39).



**Abbildung 39:** *Chironomus riparius*. Erwartete Heterozygotie der Parentalgeneration und der F1-Generation bei den Populationen GEN+I\_6 (weißer Balken) und GEN-I\_6 (grauer Balken), welche gegenüber den Temperaturen von 17, 20 und 23 °C exponiert wurden.

In den Experimenten kann deutlich gezeigt werden, dass eine moderate Temperaturveränderung von  $\pm 3$  °C deutliche Effekte auf die Life-Cycle Parameter von *Chironomus riparius* Populationen hat. So schlüpfen die Tiere bei wärmeren Temperaturen deutlich früher und produzieren kleinere Gelege. Weiterhin kann gezeigt werden, dass die genetische Diversität die Anzahl an fruchtbaren Gelegen pro Weibchen und damit die erfolgreiche Reproduktion temperaturunabhängig beeinflusst. Genetisch verarmte Populationen sind kaum noch in der Lage, entwicklungsfähige Gelege auf Grundlage der F1-Generation zu produzieren.

#### 4.4.4 RNA/DNA Verhältnis bei Cadmium-exponierten *C. riparius*-Larven

Molekulare Methoden zur Bestimmung von Expressionsänderungen als Folge von Schadstoffexposition setzen sich in der Ökotoxikologie immer mehr durch. Während Methoden wie Microarrays oder RT-PCR lange Entwicklungszeiten und einen hohen Kostenaufwand bedeuten, ist der Bedarf an schnellen und kostengünstigen Alternativen zur Messung von zellulärer Stressinduktion als Antwort auf Chemikalienbelastung hoch. Im Rahmen dieses Projektes wird ein Verfahren entwickelt, mit dem Änderungen in der RNA-Produktion bei *Chironomus riparius* gemessen werden können. Um die Eignung der Methode zu überprüfen, werden L4-Larven akut an Cadmium exponiert und das Verhältnis von RNA zum DNA-Gehalt der exponierten Individuen gemessen.

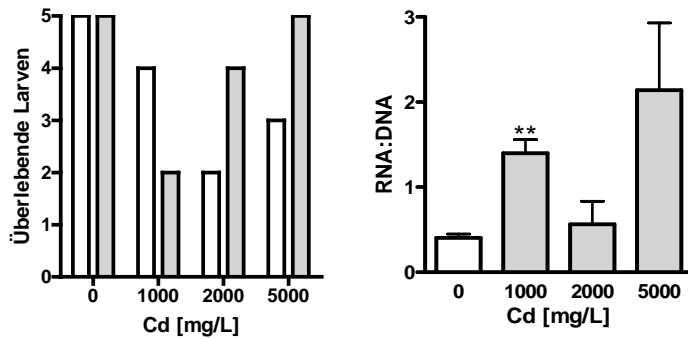
##### *Akutttest*

Ein Akutttest wird mit 3 Cadmiumkonzentrationen + Kontrolle durchgeführt. Es werden pro Behandlungsgruppe zwei Replikate mit je fünf L4-Larven verwendet. Die Tiere werden über 24 h verschiedenen Cd-Konzentrationen (0, 1000, 2000, and 5000 mg/L) exponiert. Zum Versuchsende wird die Mortalität bestimmt und pro Behandlungsgruppe werden fünf lebendige Tiere für die Nukleinsäure-Extraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren.

##### *RNA/DNA-Extraktion*

Gefrorene Tiere werden mit einem kalten Pistill homogenisiert. Nach Zugabe von 750 µl DSS Puffer + 4 µl Proteinase K wird das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend eine Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt (2x). Die in der Lösung enthaltenen Nukleinsäuren werden über Nacht mit 1 Vol + 2 M LiCl gefällt und am nächsten Tag 2x mit Ethanol (70%) vorsichtig gewaschen. Nach einer Trocknung bei 37° C wird das Pellet in 50µl DEPC-behandeltem Reinstwasser gelöst. 10 µl der Lösung werden einem separaten Eppendorf-Gefäß einem RNA-Verdau unterzogen. Das RNA:DNA-Verhältnis wird durch photometrische Messung (260/280 nm) des Nucleinsäuregehaltes der teilverdauten und unbehandelten Proben bestimmt.

Während alle Larven unter Kontrollbedingungen überleben, tritt bei allen exponierten Ansätzen Mortalität auf (Abb. 40 A). Das gemessene RNA:DNA-Verhältnis nimmt bei allen Cd-Ansätzen im Verhältnis zur Kontrolle zu, wenngleich ein signifikanter Anstieg nur bei 1000 mg/L Cd festgestellt werden kann.



**Abbildung 40:** Anzahl an überlebenden Larven im Akuttest (A). Dargestellt sind je zwei Replikate pro Behandlungsgruppe. B: RNA:DNA-Verhältnis in den Kontrollen (weiß) und exponierten Ansätzen (grau). \*\* =  $p < 0,01$ ; ungepaarter t-Test.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei akuter Cd-Exposition der RNA-Level in den exponierten Tieren messbar ansteigt (Abb. 40B). Somit ist eine generelle Eignung der Methode für die Bestimmung zellulärer Stressantworten auf Schadstoffexposition gegeben. Der Ansatz ist jedoch nur als Vorversuch konzipiert, um eine generelle Eignung der Methode zu überprüfen; daher können hier keine weitergehenden Aussagen getroffen werden. Messungen des RNA:DNA-Verhältnisses wurden an verschiedenen Organismen vorgenommen, jedoch nur selten als Parameter bei der Reaktion auf Chemikalienexposition verwendet (BARBER ET AL., 1994; IBIAM & GRANT, 2005; KNOWLES & MCKEE, 1987). So kommen bisherige Studien zu teils konträren Ergebnissen, die eine generelle Eignung der Methode in Frage zu stellen scheinen. Besonders die Sensitivität der Methode gegenüber umweltrelevanten Schadstoffkonzentrationen muss daher genauer überprüft werden. Das RNA:DNA-Verhältnis könnte jedoch durchaus als schnelles und effizientes Werkzeug zum „Vorscreening“ auf eventuelle Expressionsänderungen in der Zelle dienen.

## 5 PRAKTISCHE VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE

Das Forschungsvorhaben war überwiegend im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelt. Dennoch ergeben sich auch für die Praxis einige Empfehlungen, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

- Es konnte gezeigt werden, dass Laborzuchten empfindlicher reagieren, wenn sie genetisch verarmt sind. Um ein solches *inbreeding* zu vermeiden, sollten Laborzuchten regelmäßig „genetisch aufgefrischt“ werden. In den Richtlinien zur Durchführung ökotoxikologischer Tests (bspw. OECD guideline) sollte ein bestimmtes Maß an genetischer Diversität der Testorganismen definiert werden, um die Ergebnisse aus Tests im Rahmen der Stoffprüfung besser miteinander vergleichen zu können.

- Genetische Diversität sollte stärker als Schutzgut berücksichtigt werden. Der Verlust genetischer Diversität kann nur durch Genfluss zwischen Populationen kompensiert werden. Daher sollten insbesondere im Bereich des Natur- und Artenschutzes Trittsteinbiotope in einer Weise existieren, dass ein Genfluss gewährleistet ist. In diesem Zusammenhang sind sowohl die Mobilität als auch die Reproduktionsmodi einzelner Spezies zu berücksichtigen.
- Das TBT-Monitoring in Fließgewässern im Nord-Westen Baden-Württembergs hat gezeigt, dass die Sedimente lediglich gering belastet sind. Dies gilt ebenfalls für eine Reihe von Schwermetallen. Biotests mit diesen Sedimenten ergaben in der Mehrzahl keine Evidenzen hinsichtlich letaler oder subletaler Effekte.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Arambarri, I.; Garcia, R.; Millan, E. (2003): Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere* **51**, 643–649.
- ARBE-ELBE (1999): Herkunft und Verteilung von Organozinnverbindungen in der Elbe und in Elbenebenflüssen. Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe, März 1999, 93S.
- 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 & Hall, London.
- Ball, S.L., Hebert, P.D.N. (2005): Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* **24**, 508-524.
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M.V.M. (2002): Among- and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 1058-1064.
- Barateiro, J., Soares, P., Nowak, C.: Differences reaction to phenmedipham exposure in three genetically characterized strains of the collembolan test species *Folsomia candida*. In Vorbereitung.
- Barber, I., Baird, D.J., Calow, P. (1990): Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects. *Functional Ecology* **4**, 409-414.
- Barber, I., Baird, D.J., Calow, P. (1994): Effect of cadmium and ration level on oxygen consumption, RNA concentration and RNA-DNA ratio in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **30**, 249-258.
- Baxter, M.L. (2004): The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, **359**, 669-679.
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L. (2001): Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research – Review in Mutation Research*, **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.
- Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E. (1996): TBT induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **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. *Mutation Research*, **463**, 33-51.
- Bijlsma, R., Bundgaard, J., Boerema, A.C. (2000): Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: Predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 502-514.
- Bliefert, C. (2002): Umweltchemie, 3. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, Deutschland.
- Brown, A., Pascoe, D. (1988): Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates. 5. The acute toxicity of cadmium to twelve species of macroinvertebrates. *Archives of Hydrobiology*, **114**, 311-319.
- Brown, J.L., Li, S.H., Bhagabati, N. (1999): Long-term trend toward earlier breeding in an American bird: a response to global warming? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **94**, 5565-5569.
- BUA (1988): Tributylzinnoxid (Bis-[tri-n-butylzinn]oxid). Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.) - BUA Stoffbericht 36. VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.
- BUA (2003): Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.) - 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.
- Butler, M.G., Rezanka, R.L., Giovannelli, K.M. (2000): Utility of species level identification of *Chironomus* larvae in biological assessment of prairie lakes. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, **27**, 273-277.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. (1987): Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 237-268.
- Cheptou, P.O. (2006): The ecology of inbreeding depression. *Heredity*, **96**, 110.
- Dahlgaard J., Hoffmann A.A. (2000): Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conservation Biology*, **14**, 1187-1192.
- 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 & Pollution*, **129**, 167-179.
- De Lange, H.J., DeHaas, E.M., Mass, 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.
- Delettre, Y.R., Morvan, N. (2000): Dispersal of adult aquatic Chironomidae (Diptera) in agricultural landscapes. *Freshwater Biology*, **44**, 399-411.

- 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 (2003): DIN 19744 - Identifizierung und Quantifizierung von Organozinnverbindungen in Feststoffen (Böden, Sedimente, Abfälle). Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin
- Dougherty J.E., Morgan, M.D. (1991): Benthic community response (primarily Chironomidae) to nutrient enrichment and alkalization in shallow, soft water humic lakes. *Hydrobiologia*, 215:73-82.
- Duan, Y., Guttman, S.I., Oris, J.T. (1997): Genetic differentiation among laboratory populations of *Hyalella azteca*: implications for toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 691-695.
- Easterling, D.R., Evans, J.L., Ya Groisman, P., Karl, T.R., Kunkei, K.E., Ambenje, P. (2000): Observed variability and trends in extreme climate events: a brief review. *Bulletin of the American Meteorological Society* **81**, 417-425.
- Fargasova, A. (1998): Comparison of tributyltin compound effects on the alga *Scenedesmus quadricauda* and the benthic organisms *Tubifex tubifex* and *Chironomus plumosus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, 222-230.
- Fent, K. (2003): Ökotoxikologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Forbes, V.E., Calow, P. (1996): Costs of living with contaminants: implications for assessing low-level exposures. *Biol. Eff. Low Level Exp. Newsletter* **4**.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 78-86.
- Frankham, R. (2005): Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131-140.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2002): Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, 618 Seiten.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2004): A primer of conservation genetics. University Press, Cambridge, United Kingdom
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1836-1844.
- 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 Biology*, **8**, 153-164.
- Groenendijk, D., Zeinstra, L.W.M., Postma, J. F. (1998): Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) from a metal contaminated river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 1999-2005.

- Groenendijk, D., Kraak, M.H.S., Admiraal, W. (1999): Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1225-1231.
- Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **72**, 3961–3965.
- Guo, S.W., Thompson, E.A. (1992): Performing the Exact Test of the Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Hägele, K. (1970): DNS-Replikationsmuster der Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomiden. *Chromosoma*, **59**, 91-138.
- Hahn, T., Schulz, R. (2002): Ecdysteroid synthesis and imaginal disc development in the midge *Chironomus riparius* as biomarkers for endocrine effects of tributyltin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **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.
- Hankeln, T., Rozynek, P., Schmidt, E.R. (1988): The nucleotide sequence and in situ localization of a gene for a dimeric haemoglobin from the midge *Chironomus thummi piger*. *Gene*, **64**, 297-304.
- Hansson, B., Westerberg, L. (2002): On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2467-2474.
- Havas, M., Hutchinson, T.C. (1982): Aquatic invertebrates from the Smoking Hills, Northwest Territories: effect of pH and metals on mortality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**, 890-903.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. (2003): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**, 96-99.
- Heß, M. (2005): Genetische und ökotoxikologische Charakterisierung von TBT-vorexponierten Zuckmücken (*Chironomus riparius*) unter dem Einfluss der chemischen Stressors Cadmium. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Hirthe, G., Fisher, T.C., Crane, M., Callaghan, A. (2001): Short-term exposure to sub-lethal 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. (1995): Physiologie der Insekten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Hogg, I.D., Hebert, P.D.N. (2004): Biological identification of springtails (Hexapoda : Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie*, **82**, 749-754.

- 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 <sup>14</sup>C-cypermethrin on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *Journal of Applied Ecology*, **40**, 1049-1059.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Nogeur, M., van der Linden, P.J., Xiaosu, D. (2001): Climate Change 2001-The Scientific Basis: The Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge.
- Ibiam, U., Grant, A. (2005): RNA/DNA ratios as a sublethal endpoint for large-scale toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1155-1159.
- IMO (2002): Anti-fouling systems. International Maritime Organisation - Focus on IMO, 31 pp., [www.imo.org](http://www.imo.org). [03.07.2006]
- Jacobs, W., Renner, M. (1988): Biologie und Ökologie der Insekten, 2 Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Jensen, A., Forbes, V.E. (2001): Interclonal variation in the acute and delayed toxicity of cadmium to the European prosobranch gastropod *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40** (2): 230-235.
- Johnson, F.M. (1998): The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research*, **410**, 123-140.
- Jones, P.D., New, M., Parker, D.E., Martin, S., Rigor, I.G. (1999): Surface air temperature and its changes over the last 150 years. *Reviews of Geophysics*, **37**, 173-199.
- 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*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 155-160.
- Kalbfus, W., Zellner, A., Frey, S., Stanner, E. (1991): Gewässergefährdung durch organozinnhaltige Antifoulinganstriche. Bayerische Landesamt für Wasserwirtschaft – Institut für Wasserforschung. Forschungsvorhaben 126 05 010 des UBA, Berlin, UBA Berichts-Nummer 91-072, September 1991.
- Kim, E.J., Lee, S.K. (2004): Reduced viability of F1 egg ropes in *Chironomus riparius* exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *Journal of Environmental Biology*, **25**, 259-261.
- Kley, C. (2005): Artenzusammensetzung innerhalb der Gattung *Chironomus* in unterschiedlich belasteten Freilandsedimenten. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Knowles, C., McKee, M. J. (1987): Protein and nucleic acid content in *Daphnia magna* during chronic exposure to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **13**, 290-300.
- Koehn, R.K.; Bayne, B.L. (1989): Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society*, **37**, 157-171.

- Kohler, S.L. (1992): Competition and structure of a benthic stream community. *Ecological Monographs*, **62**, 2164-2176.
- Kristensen, T.N., Dahlgaard, J., Loeschcke, V. (2003): Effects of inbreeding and environmental stress on fitness - using *Drosophila buzzatii* as a model organism. *Conservation Genetics*, **4**, 453-465.
- Kuballa, J., Hempel, M., Jantzen, E., Hintelmann, H., Steffen, D. (1995): Methylquecksilber- und Organozinn-Spezies in Sedimenten niedersächsischer Flüsse. *Vom Wasser*, **83**, 35-45.
- Lacy, R.C. (1987): Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, **1**, 143-158.
- 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.
- 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.
- Lindegaard, C. (1995): Classification of water-bodies and pollution. In *The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges*. Edited by Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV. London: Chapman & Hall.
- Lopes, C., Pery, A.R.R., Chaumot, A., Charles, S. (2005): Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, **188**, 30-40.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R. (2004): Genetic determination of tolerance to lethal and sublethal copper concentrations in field populations of *Daphnia longispina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **46**, 43-51.
- Maier, K.J., Kosalwat, P., Knight, A.W. (1990): Culture of *Chironomus decorus* (Diptera, Chironomidae) and the effect of temperature on its life-history. *Environmental Entomology*, **19**, 1681-1688.
- 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 Pollution*, **60**, 395-403.
- McCarty, J.P. (2001): Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, **15**, 320-31.
- Meehl, G.A., Washington, W.M., Collins, W.D., Arblaster, J.M., Hu, A.X., Buja, L.E., Strand, W.G., Teng, H.Y. (2005): How much more global warming and sea level rise? *Science*, **307**, 1769-1772.
- Merck Schuchardt OHG (2006a): Sicherheitsdatenblatt Tributylzinnchlorid zur Synthese gemäß EG-Richtlinie 91/155/EWG. [www.merck.de](http://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](http://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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 845-854.
- Minshall, G.W., Petersen, R.C. (1985): Towards a theory of macroinvertebrate community structure in stream ecosystems. *Archiv für Hydrobiologie*, **104**, 49-76.
- Mitton, J.B. (1997): *Selection in Natural Populations*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- 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.
- Mousavi, S.K. (2002): Boreal chironomid communities and their relations to environmental factors - the impact of lake depth, size and acidity. *Boreal Environment Research*, **7**, 63-75.
- Mukhopadhyay, J., Rangel, E.F., Gosh, K., Munstermann, L.E. (1997): Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**, 216-221.
- Murphy, J.F., Davy-Browker, J. (2005): Spatial structure in lotic macroinvertebrate communities in England and Wales: relationship with physical, chemical and anthropogenic stress variables. *Hydrobiologia*, 534:151-164.
- Navio, J.A., Marchena, F.J., Cerrilos, C., Pablos, F. (1993): UV photolytic degradation of butyltin chlorides in water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A – Chemistry*, **71**, 97-102.
- Newman, D., Pilson, D. (1997): Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution*, **51**, 354-462
- 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). *Journal of Medical Entomology*, **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). *Molecular Ecology Notes*, **6**, 915-917.
- Nowak, C., Vogt, C., Barateiro Diogo, J., Schwenk, K. (2006): Genetic impoverishment in *Chironomus* cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, im Druck.
- Nyman, M., Korhola, A., Brooks, S.J. (2005): The distribution and diversity of Chironomidae (Insecta: Diptera) in western Finnish Lapland, with special emphasis on shallow lakes. *Global Ecology and Biogeography*, **14**, 137-153.
- OECD (1998): *Daphnia magna* reproduction test. Organisation for Economic Development and Cooperation - Guideline for testing chemicals no. 211. adopted September 1998, Paris, Frankreich.
- OECD (2004a): Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Organisation for Economic Development and Cooperation - Guideline for testing chemicals no 218, adopted 13th April 2004, Paris, Frankreich.

- OECD (2004b): Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water. Organisation for Economic Development and Cooperation - Guideline for testing chemicals no 219, adopted 13th April 2004, Paris, Frankreich.
- Oehlmann, J., Markert, B. (1997): Humantoxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland.
- Oetken, M. (1999): Biologisches Effektmonitoring zur Überwachung gering bis kritisch belasteter Fließgewässer am Beispiel der Neiße unter besonderer Berücksichtigung von Schwermetallen. Internationales Hochschulinstitut Zittau, IHI-Schriften **14**, 164 pp.
- Oetken, M., Ludwichowski, K.U., Nagel, R. (2001): Validation of the Preliminary EU-concept of Assessing the Impact of Chemicals to Organisms in Sediment by Using Selected Substances. Report R&D project 29967411. German Federal Environment Agency, Berlin, 97 pp.
- 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. *Environmental Pollution*, **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. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **49**, 353-361.
- Oetken, M., Schwenk, K., Vogt, C., Nowak, C., Hess, M., Pupp, A., Kley, C. (2005c): Zweiter Zwischenbericht: Genetische Verarmung als Folge von Schadstoffstress bei Wirbellosen - Ein Beitrag zur Biodiversitätsforschung. Landsanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Deutschland.
- Olivier, D.R. (1971): Life history of the Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, **16**, 211-230.
- Oliver, M.A. (1997): Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Sciences*, **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.
- Parmesan, C. (1996): Climate and species' range. *Nature*, **382**, 765-766.
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Killberg, J., Tammaru, T., Tennent, W.J., Thomas, J.A., Warren, M. (1999): Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*, **399**, 579-583.
- Parris, K.M. (2004): Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. *Ecography*, **27**, 392-400.
- 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.



- Pedersen, K.S., Kristensen, T.N., Loeschke, V. (2005): Effects of inbreeding and rate of inbreeding in *Drosophila melanogaster* – Hsp 70 expression and fitness. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 756-762.
- Pedina, A. (2001): Vergleichende Sensitivitätsuntersuchungen mit ausgewählten organischen und anorganischen Kontaminanten im Sedimentbiotest (Dosis-Wirkungsbeziehung). Diplomarbeit, Studiengang Ökologie und Umweltschutz, Fachhochschule Zittau-Görlitz, Deutschland.
- Pinder, L.C.V. (1986): Biology of freshwater Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, **31**, 1-23.
- Postma, J., Davids, C. (1995): Tolerance induction and life-cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **30**, 195-200.
- Postma, J.F.; Nugteren, P.V.; Buckert-De Jong, M.B. (1996) Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 332-339.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Campbell, J.H. (1999): Biological responses to climate change on a tropical mountain. *Nature*, **398**, 611-615.
- Pupp, A. (2005): Genetische Diversität beim Testorganismus *Chironomus riparius* Meigen 1804 unter Temperaturstress und Exposition mit Tributylzinn (TBT). Diplomarbeit, Studiengang Biologie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland.
- Rae, J.G. (2004): The colonization response of lotic chironomid larvae to substrate size and heterogeneity. *Hydrobiologia*, **524**, 115-124.
- 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. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Razzoli, M., Papa, R., Valsecchi, P., Marzano F.N. (2003): AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Heredity*, **94**, 507-511.
- Real, M., Rieradevall, M., Prat, N. (2000): *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae) in the profundal benthos of Spanish reservoirs and lakes: factors affecting distribution patterns. *Freshwater Biology*, **43**, 1-18.
- Reed, D.H., Lowe, E.H., Briscoe, D.A., Frankham, R. (2003): Inbreeding and extinction: Effects of rate of inbreeding. *Conservation Genetics*, **4**, 405-410.
- Ricklefs, R.E. (1987): Community diversity: relative roles of local and regional processes. *Science*, **235**, 167-171.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1772-1777.

- Roark S.A., Andrews J.F., Guttman, S.I. (2001): Population genetic structure of the western mosquitofish, *Gambusia affinis*, in a highly channelized portion of the San Antonio River in San Antonio, TX. *Ecotoxicology*, **10**, 223-227.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankara, M., Vikman, P., Fortelius, W., Hanski, I. (1998): Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* **392**, 491-494.
- Sankarperumal, G., Pandian, T.J. (1991): Effect of temperature and chlorella density on growth and metamorphosis of *Chironomus circumdatus* (Kieffer) (Diptera). *Aquatic Insects* **13**, 167-177.
- Sattelberger, R. (2002): Organozinnverbindungen in der aquatischen Umwelt. BE-214. Umweltbundesamt GmbH, Wien, Österreich.
- Schmidt, E.R., Keyl, H.G., Hankeln, T. (1988): In situ localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus*. *Chromosoma*, **96**, 353-359.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide for using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, **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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 336-345.
- Sildanchandra, W., Crane, M. (2000): Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* Meigen on toxic effects of cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2309-2313.
- SRU (2004) Umweltgutachten 2004 – Umweltpolitische Handlungsfähigkeit sichern. Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen, Berlin.
- Staton, J.L., Schizas, N.V., Chandler, G.T., Coull, B.C., Quattro, J.M. (2001): Ecotoxicology and population genetics: The emergence of “phylo-geographic and evolutionary ecotoxicology”. *Ecotoxicology*, **10**, 217-222.
- Steinke, D., Vences, M., Salzburger, W., Meyer, A. (2005): TaxI - A software tool for DNA barcoding using distance methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, **360**, 1975-1980.
- Stewart, C., De Mora, S.J. (1990): A review of the degradation of tri(n-butyl)tin in the marine environment. *Environmental Technology*, **11**, 565-570.
- Taylor, S.R., McLennan, S.M. (1985): The continental crust: its composition and evolution. Blackwell, Oxford, Großbritannien.
- ter Braak CJF, Smilauer P: CANOCO for Windows. 4.5 edition. Biometris - Plant Research International; 2002.
- Tokeshi, M. (1995): Randomness and Aggregation - Analysis of Dispersion in an Epiphytic Chironomid Community (Vol 33, Pg 3, 1995). *Freshwater Biology*, **34**, 567-578.
- Triffault-Bouchet, G.L., Clement, B., Blake, G. (2005): Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/sediment microcosm assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2243-2253.

- UBA (2001): Organische Zinnverbindungen, Alkylphenole und Bisphenol A in marinen und limnischen Biota der Umweltprobenbank. Umweltbundesamt Texte 06/01, Berlin, Deutschland.
- UBA (2002): Daten zur TBT-Konzentrationen in Sedimenten und Schwebstoffen in Fließgewässern Deutschlands der ARGE Elbe und LAWA zur Berichterstattung gemäß EG-RL 76/464, Umweltbundesamt 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.
- Vogt, C. (2003): Effekte von endokrin aktiven Arzneimitteln auf die Zuckmücke *Chironomus riparius* und die Wasserassel *Asellus aquaticus*. Diplomarbeit, Studiengang Ökologie und Umweltschutz, 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-. *Journal of Environmental Science and Health – Part A*, im Druck.
- Vogt, C., Nowak, C., 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.
- Watts, M., Pascoe, D. (2000): Comparison of *Chironomus riparius* MEIGEN and *Chironomus tentans* FABRICIUS (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 1885-1892.
- Wentzel, R., McIntosh, A., Atchison, G. (1977): Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on the midge larvae (*Chironomus tentans*). *Hydrobiologia*, **6**, 153-156.
- Wieser, W. (1973): Effects of temperature on ectothermic organisms. Springer Verlag, New-York.
- Williams, K.A., Green, D.W.J., Pascoe, D., Gower, D.E. (1986): The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia*, **70**, 362-366.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R. (1993): Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics*, **9**, 407.
- Wood, C.M.; McDonald, D.G. (1996): Global warming: implications for freshwater and marine fish. Cambridge University Press, New-York.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 1067-1074.
- Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Briscoe, D.A., Frankham, R. (2002): Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications. *Conservation Genetics*, **3**, 277-288.

Xue, R.D.; Ali, A. (1994): Relationship between winglength and fecundity of a pestiferous midge, *Glyptotendipes paripes* (Diptera, Chironomidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **10**, 29-34.