



Institut für Hygiene und Umwelt

Hamburger Landesinstitut für Lebensmittelsicherheit
Gesundheitsschutz und Umweltuntersuchungen



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Erfassung und Sicherstellung des Sauerstoffgehalts im
Fischei-Sedimentkontakttest

Bachelorarbeit

Umwelttechnik

Vorgelegt von

Dennis Theel

Matrikel-Nr. 1994162

Hamburg

am 27. August 2013

Gutachter: Prof. Dr.

Gutachter: Dr.

Carolin Floeter (HAW Hamburg)

Beate Baier (Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg)

Die vorliegende Bachelorarbeit wurde am Institut für Hygiene und Umwelt der Freien und Hansestadt Hamburg erstellt.

Institut für Hygiene und Umwelt
Bereich Umweltuntersuchungen
Abteilung Wasseruntersuchungen
Referat Biologische Untersuchungen
Marckmannstraße 129 b
20539 Hamburg



Erklärung zur Bachelorarbeit

Ich erkläre hiermit Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, den _____

(Unterschrift)

Dennis Theel

Abstract

Das Ziel dieser Bachelorarbeit war die Erfassung und die Sicherstellung einer Mindestsauerstoffkonzentration im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttests mit Fischeiern des Zebraäbrblings (*Danio rerio*). Die Arbeit wurde im Rahmen einer Untersuchung am Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) angefertigt.

Des Weiteren sollten mit Messungen im Überstandswasser Informationen über die Verteilung der Sauerstoffkonzentration gewonnen werden.

Diesbezüglich wurden zwei verschiedene Mikrosonden-Messsysteme auf ihre Labortauglichkeit für den Routinebetrieb getestet. Durch die Steigerung der Schüttelfrequenz eines Horizontalschüttlers konnte weiterer Sauerstoff in die Probe eingetragen werden. Mit dem optischen LDO-Messverfahren der Firma PreSens (Regensburg, Deutschland) konnte schließlich eine ausreichende Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser nachgewiesen werden.

Versuche, die speziell die Auswirkungen der Schüttelfrequenzen auf die Fischeier untersuchten, ergaben, dass mit dem Anstieg der Schüttelfrequenz auch die Häufigkeit der letalen Effekte bei den Embryonen des Zebraäbrblings stieg.

Abstract

The objective of this Bachelor thesis was to identify and secure the minimum concentration of oxygen necessary in the supernatant water of a sediment contact test using eggs of the zebra fish (*Danio rerio*). The thesis was written within the framework of a study undertaken at the Institute of Hygiene and Environment (Hamburg).

Furthermore, measurements with microprobes in the supernatant water were supposed to give information about the distribution of the oxygen concentration.

To this effect, two different microprobe measurement systems were tested with regard to their suitability in the laboratory during routine operations. By increasing the shaking frequency of a horizontal shaker, further oxygen could be added to the sample. Finally, by using the optical LDO (Luminescent Dissolved Oxygen) measurement technique by the company PreSens (Regensburg, Germany), a sufficient oxygen concentration was identified.

Experiments which tested the effects of the shaking frequency on the fish eggs rendered an increase in the frequency of lethal effects in the zebra fish embryos which corresponded with the increase in the shaking frequency.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Carolin Floeter für die Betreuung meiner Bachelorarbeit bedanken. Ich bedanke mich bei Frau Dr. Beate Baier für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) anzufertigen, die interessante Fragestellung und die unentwegte Bereitschaft für Fragen und Diskussion.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Dr. Beate Baier für die freundliche Aufnahme, die entspannte Arbeitsatmosphäre und den vielen hilfreichen Ratschlägen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Heike Apelt für die Einführung in das Labor sowie die entsprechenden Arbeitstechniken. Dank dir für die vielen netten Gespräche über „Gott und die Welt“. Desweiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Robert Dannenberg, der für mich immer eine offene Tür hatte.

Bei meiner Gemeinde und meinen Freunden, die mir während dieser Zeit im Gebet sowie mit Wort und Tat Beistand leisteten, möchte ich mich herzlich bedanken. Ihr seid toll!
Thanks God!

Insbesondere möchte ich meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums danken. Bei meinem Bruder Torben, seiner Freundin Githa und meiner Freundin Maike für die Geduld bei Korrekturen und den Aufmunterungen die sie mir während der gesamten Zeit entgegengebracht haben.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
TABELLENVERZEICHNIS	3
EINLEITUNG	4
I. ÜBERGREIFENDE GRUNDLAGEN	7
I.1. FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST MIT DEM ZEBRABÄRBLING (<i>DANIO RERIO</i>)	7
I.1.1. TOXIKOLOGISCHE ENDPUNKTE DER DIN EN ISO 15088-6.....	8
I.2. VERSUCHSTIER ZEBRABÄRBLING (<i>DANIO RERIO</i>)	10
I.2.1. ALLGEMEINE INFORMATIONEN	10
I.2.2. HÄLTERUNG.....	13
I.2.3. ZUCHT	14
I.2.4. EMBRYONALE ENTWICKLUNG.....	15
I.2.5. SAUERSTOFFBEDARF VON ZEBRABÄRBLING EMBRYONEN (<i>DANIO RERIO</i>)	21
I.2.6. SAUERSTOFFBEDARF DES ZEBRABÄRBLINGS (<i>DANIO RERIO</i>).....	22
I.2.7. SAUERSTOFFBEDARF EINIGER FISCHARTEN DER ELBE.....	23
II. SAUERSTOFFMESSSYSTEM	26
II.1. EINLEITUNG	26
II.2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN FÜR SAUERSTOFFMESSSYSTEME	27
II.2.1. CLARK-SONDE	27
II.2.2. LDO-SONDEN	30
II.3. MATERIAL UND METHODEN	34
II.3.1. DIE MESSSYSTEME	34
II.3.2. VERSUCHSVORAUSSETZUNGEN	36
II.3.3. VERSUCHSAUFBAU	37
II.4. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNGEN	41
II.4.1. HANDHABUNG UND LABORROUTINE.....	41
II.4.2. ANSPRECHZEIT	42
II.4.3. MESSGENAUIGKEIT	43
II.4.4. MESSSTABILITÄT	44

II.4.5. KOSTENBILANZ	48
II.5. DISKUSSION.....	50

III. SAUERSTOFFMESSUNGEN IM ÜBERSTANDSWASSER.....53

III.1. EINLEITUNG	53
III.2. MATERIAL UND METHODEN	54
III.2.1. CHEMIKALIEN UND GERÄTE	54
III.2.2. ÜBERSICHT DER DURCHFÜHRTEN VERSUCHE	57
III.2.3. EINTEILUNG DER KRISTALLISIERSCHALE IN MESSZONEN	58
III.2.4. RÄUMLICHE VERTEILUNG DER SAUERSTOFFKONZENTRATION IM ÜBERSTANDSWASSER.....	58
III.2.5. EFFEKTE AN DEN FISCHEIERN BEI VERSCHIEDENEN SCHÜTTELFREQUENZEN	61
III.2.6. FISCHEI-SEDIMENTKONTAKTTTEST NACH STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP).....	61
III.3. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNGEN.....	62
III.3.1. RÄUMLICHE VERTEILUNG DER SAUERSTOFFKONZENTRATION.....	62
III.3.2. EFFEKTE AN DEN FISCHEIERN BEI VERSCHIEDENEN BEWEGUNGSFREQUENZEN AUF QUARZSAND.....	74
III.3.3. FISCHEI-SEDIMENTKONTAKTTTEST NACH (SOP)	78
III.3.4. GESAMTÜBERSICHT DER FISCHEI-SEDIMENTKONTAKTTTEST ERGEBNISSE.....	80
III.4. DISKUSSION.....	81

ZUSAMMENFASSUNG.....87

LITERATURVERZEICHNIS88

ANHANG I

ANHANG I. MAXIMAL IM WASSER GELÖSTE SAUERSTOFFKONZENTRATION IN ABHÄNGIGKEIT DER TEMPERATUR BEI NORMDRUCK.....	II
ANHANG II. ERGEBNISSE: VERSUCH (12) SEDIMENT (FISCHERHOF), OHNE BEWEGUNG.....	III
ANHANG III. ERGEBNISSE: VERSUCH (13) SEDIMENT (FISCHERHOF), 70 UPM	IV
ANHANG IV. ERGEBNISSE: VERSUCH (14) SEDIMENT (FISCHERHOF), 90 UPM	V
ANHANG V. ERGEBNISSE: VERSUCH (15) SEDIMENT (FISCHERHOF), 110 UPM	VI
ANHANG VI. ERGEBNISSE: VERSUCH (A) QUARZSAND, 50 UPM	VII
ANHANG VII. ERGEBNISSE: VERSUCH (B) QUARZSAND, 70 UPM	VIII
ANHANG VIII. ERGEBNISSE: VERSUCH (C) QUARZSAND, 90 UPM	IX
ANHANG IX. ERGEBNISSE: VERSUCH (D) QUARZSAND, 110 UPM	X

ANHANG X.	ERGEBNISSE: VERSUCH (E) QUARZSAND, 130 UPM.....	XI
ANHANG XI.	ERGEBNISSE: VERSUCH (16), SEDIMENT (FISCHERHOF) SOP, 90 UPM.....	XII
ANHANG XII.	2. ENTWURF: STANDARD OPERATING PROCEDURE – SOP	XIII

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG I.1 FEHLENTWICKLUNGEN VON EMBRYONEN	9
ABBILDUNG I.2 ZEBRABÄRBLING (<i>DANIO RERIO</i>). OBEN: WEIBCHEN, UNTEN: MÄNNCHEN	10
ABBILDUNG I.3 DIE HERKUNFT DES ZEBRABÄRBLINGS	11
ABBILDUNG I.4 GESCHLECHTLICHE UNTERSCHIEDE <i>DANIO RERIO</i> . LINKS: WEIBCHEN, RECHTS: MÄNNCHEN	12
ABBILDUNG I.5 ZEBRABÄRBLING IM LAICHBECKEN MIT PFLANZENATTRAPPE	14
ABBILDUNG I.6 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER ZYTOGENEN PHASE	15
ABBILDUNG I.7 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER ZELLEILUNGSPHASE	16
ABBILDUNG I.8 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER BLASTULA PHASE	17
ABBILDUNG I.9 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER SEGMENTIERUNGSPHASE	18
ABBILDUNG I.10 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER PHARYNGULA PHASE	19
ABBILDUNG I.11 ENTWICKLUNG DES ZEBRABÄRBLINGS IN DER SCHLUPFFHASE	20
ABBILDUNG II.1: AUFBAU DER WTW CELLOX 325 SAUERSTOFFSONDE	27
ABBILDUNG II.2: AUFBAU EINES MIKROSENSORS	28
ABBILDUNG II.3: AUFBAU DER WTW FDO 925 SAUERSTOFFSONDE	31
ABBILDUNG II.4: AUFBAU DES PRESENS MICROX TX3 NEEDLE-SENSORS, SENSORGRÖÖE: 140 µM	32
ABBILDUNG II.5: PRINZIP DER DYNAMISCHEN LUMINESZENZLÖSCHUNG DURCH MOLEKULAREN SAUERSTOFF	33
ABBILDUNG II.6 UNISENSE OX-500 SONDE	34
ABBILDUNG II.7 1000 ML BECHERGLAS WALDEHOE.AT (2013)	38
ABBILDUNG II.8 VERSUCHSAUFBAU 20 ML KRISTALLISIERSCHALE	38
ABBILDUNG II.9 ANSPRECHZEIT (T_{90}) DES OPTISCHEN MESSSYSTEMS PRESENS MICROX TX 3	43
ABBILDUNG II.10 ÜBER ZWEI STUNDEN AUFGEZEICHNETE MESSWERTE DER UNISENSE OX 500	45
ABBILDUNG II.11 ZEITLICHE DRIFT DER SONDEN, BEI LANGSAMER ÄNDERUNG DER TEMPERATUR	47
ABBILDUNG III.1 DIFFUSIONS- UND ZEHRUNGSZONE IM FISCHER-SEDIMENTKONTAKTTEST	58
ABBILDUNG III.2 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM VERDÜNNUNGSWASSER BEI 20 °C	62
ABBILDUNG III.3 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM VERDÜNNUNGSWASSER BEI 26 °C	63
ABBILDUNG III.4 ZEITLICHER VERLAUF DES SAUERSTOFFGEGHALTS IN ABHÄNGIGKEIT DER TEMPERATUR	64
ABBILDUNG III.5 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFSÄTTIGUNG IN ABHÄNGIGKEIT DER TEMPERATUR	65
ABBILDUNG III.6 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IN DER NEGATIV- SEDIMENTKONTROLLE	66
ABBILDUNG III.7 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IN DER POSITIV-KONTROLLE	67
ABBILDUNG III.8 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM ÜBERSTANDSWASSER EINER ZEHRENDEN SEDIMENTPROBE (FISCHERHOF)	68
ABBILDUNG III.9 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM ÜBERSTANDSWASSER EINER ZEHRENDEN SEDIMENTPROBE (FISCHERHOF), 70 µPM	70

ABBILDUNG III.10 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM ÜBERSTANDSWASSER EINER ZEHRENDEN SEDIMENTPROBE (FISCHERHOF), 90 UPM	72
ABBILDUNG III.11 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM ÜBERSTANDSWASSER EINER ZEHRENDEN SEDIMENTPROBE (FISCHERHOF), 110 UPM	73
ABBILDUNG III.12 UMVERTEILUNG DES QUARZSANDS NACH 48 H BEI EINER FREQUENZ VON 130 UPM.....	78
ABBILDUNG III.13 ZEITLICHER VERLAUF DER SAUERSTOFFKONZENTRATION UND DESSEN VERTEILUNG IM ÜBERSTANDSWASSER EINER ZEHRENDEN SEDIMENTPROBE (FISCHERHOF) NACH SOP MIT 90 UPM	79

Tabellenverzeichnis

TABELLE I.1 SYSTEMATIK DES ZEBRABÄRBLINGS (<i>DANIO RERIO</i>).....	11
TABELLE I.2 SAUERSTOFFVERBRAUCH PRO TAG VON ZEBRABÄRBLING EMBRYONEN IN DEN ERSTEN TAGEN NACH DER BEFRUCHTUNG	21
TABELLE I.3 SAUERSTOFFBEDARF ZEBRABÄRBLING EMBRYOS (<i>DANIO RERIO</i>).....	22
TABELLE I.4 GRENZWERTE UND LETALGRENZWERTE DER ZEBRABÄRBLING EMBRYOS (<i>DANIO RERIO</i>)	22
TABELLE I.5 SAUERSTOFFBEDARF ATLANTISCHER LACHS (<i>SALMO SALAR</i>)	23
TABELLE I.6 TOLERANZEN UND LETALE GRENZWERTE ATLANTISCHER LACHS (<i>SALMO SALAR</i>)	24
TABELLE I.7 SAUERSTOFFBEDARF FINTE (<i>ALOSA FALLAX</i>).....	24
TABELLE I.8 WACHSTUMSBEDINGUNGEN JUVENILER ATLANTISCHER STÖR (<i>ACIPENSER STURIO</i>)	25
TABELLE I.9 LETALGRENZE DES SAUERSTOFFBEDARFS FÜR STÖRE ALLGEMEIN.....	25
TABELLE I.10 SAUERSTOFFBEDARF EUROPÄISCHER AAL (<i>ANGUILLA ANGUILLA</i>)	25
TABELLE II.1 MESSBEREICH UND ABWEICHUNG DES FOD 925 IDS.....	35
TABELLE II.2 ZUSAMMENSETZUNG DES VERDÜNNUNGSWASSERS NACH DIN EN ISO 7346-3 (1998).....	36
TABELLE II.3 ZU VERGLEICHENDE KRITERIEN DER MESSSYSTEME.....	37
TABELLE II.4 AUSWAHL DER MESSSYSTEME AN DENEN DIE HANDHABUNG UND DIE LABORROUTINE UNTERSUCHT WURDEN.....	39
TABELLE II.5 TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER MAXIMALEN SAUERSTOFFSÄTTIGUNG IM WASSER, BEI 1013 hPa.	40
TABELLE II.6 ANSPRECHZEITEN (t_{90}) DER MESSSYSTEME AUS DEN TECHNISCHEN DATENBLÄTTERN DER HERSTELLER.....	42
TABELLE II.7 TECHNISCHE DATEN DER SAUERSTOFFMESSUNG PRESENS MICROX TX 3.....	44
TABELLE II.8 TECHNISCHE DATEN DER TEMPERATURMESSUNG PRESENS MICROX TX 3	44
TABELLE II.9 ERLÄUTERUNG DES MESSWERTVERLAUFS ZUM VERSUCH DER MESSSTABILITÄT DER UNISENSE OX 500.....	46
TABELLE II.10 ABWEICHUNG ZUR THEORETISCH MAXIMALEN SAUERSTOFFKONZENTRATION VON NICHT TEMPERATURKOMPENSIERTEN UND TEMPERATURKOMPENSIERTEN MESSSYSTEMEN.....	48
TABELLE II.11 ANSCHAFFUNGSPREIS DES UNISENSE MESSSYSTEMS.....	48
TABELLE II.12 ANSCHAFFUNGSPREIS DES PRESENS MESSSYSTEMS	49
TABELLE III.1 INHALTSSTOFFE FÜR DAS VERDÜNNUNGSWASSER.....	55
TABELLE III.2 ÜBERSICHT DER DURCHFÜHRTEN VERSUCHE	57
TABELLE III.3 ZEITRAUM ZUM ERFASSEN DER SAUERSTOFFKONZENTRATION IM FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST	65
TABELLE III.4 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: SEDIMENT (FISCHERHOF), OHNE BEWEGUNG	69
TABELLE III.5 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: SEDIMENT (FISCHERHOF), 70 UPM	71
TABELLE III.6 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: SEDIMENT (FISCHERHOF), 90 UPM	72
TABELLE III.7 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: SEDIMENT (FISCHERHOF), 110 UPM	74
TABELLE III.8 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: QUARZSAND, 50 UPM	75
TABELLE III.9 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: QUARZSAND, 70 UPM	75
TABELLE III.10 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: QUARZSAND, 90 UPM	76
TABELLE III.11 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: QUARZSAND, 110 UPM	77
TABELLE III.12 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: QUARZSAND, 130 UPM	77
TABELLE III.13 AUSWERTUNG FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST: FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTEST (SOP), 90 UPM.....	79
TABELLE III.14 ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER DURCHFÜHRTEN FISCH-SEDIMENTKONTAKTTTESTE.....	80

Einleitung

Mit Beginn der Industrialisierung in Europa und Deutschland Mitte des 19. Jahrhunderts stieg die Bevölkerungszahl sprunghaft an (GESCHICHTSVEREIN-KOENGEN.DE 2012). Im direkten Zusammenhang damit nahmen die anthropogenen Einflüsse auf die Umwelt rasant zu. Waren es zu Anfang noch die große Anzahl an Kohleöfen in den Haushalten und die Einleitung von Fäkalien in die Flüsse, sind es nun eine Vielzahl von umweltschädlichen Chemikalien, Schwermetallen (LICHTFUß & BRÜMMER 1977) und Medikamenten, die in die Umwelt gelangen. Die Industrialisierung und der Anstieg der Bevölkerungsdichte an Flüssen wie Rhein, Weser, Elbe, Donau und Main gefährden zunehmend die Gewässerqualität und alle damit verbundenen Ökosysteme.

Im Laufe der Jahre wurde das Umweltbewusstsein immer größer. Richtlinien und Gesetze zum Gewässerschutz wurden verabschiedet und Kommissionen sowie Arbeitskreise gebildet. So wurde auch die Internationale Kommission zum Schutz der Elbe (IKSE) 1990 gegründet und hat sich die Verbesserung des Zustands der Elbe und ihrer Hauptnebenflüsse zur Aufgabe gemacht (IKSE 1991). Die Elbe gehört mit ca. 1100 Kilometern zu den längsten Flüssen Europas. Sie entspringt dem Riesengebirge in der Tschechischen Republik und fließt über Dresden, Magdeburg und Hamburg in die Nordsee. Dabei gelangen viele Schadstoffe aus Industrie und Landwirtschaft ins Gewässer und binden sich auch an Feinsedimente (CHAPMAN 1990). Die Europäische Gemeinschaft (EG) erkannte 1996, dass Wasser keine übliche Handelsware sei, „sondern ein ererbtes Gut, das geschützt, verteidigt und entsprechend behandelt werden müsse. Es sei erforderlich, eine integrierte Wasserpolitik in der Gemeinschaft zu entwickeln.“ (Auszug aus den Erwägungsgründen (Präambel 1) der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG). Mit der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) haben sich die Mitgliedsstaaten der EG verpflichtet, bis 2015 eine gute chemische und gute ökologische Oberflächengewässerqualität zu erreichen. Der gute chemische Zustand bezieht sich dabei auf die Einhaltung der Grenzwerte der sogenannten prioritären Stoffe (EU Richtlinie 2008/105/EG). Der ökologische Zustand berücksichtigt die Flora und Fauna der Gewässer.

Einleitung

In der WRRL sind keine ökotoxikologischen Testverfahren vorgesehen. Um eine ganzheitliche Bewertung des ökologischen Zustands zu erreichen, könnten Zusätzlich sowohl Wasser als auch Sedimente im Rahmen der Ökotoxikologie auf ihr Umweltgefährdungspotential untersucht werden. Dabei kommen verschiedene ökotoxikologische Testverfahren und somit verschiedene Testorganismen zum Einsatz (Fent 1998). In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf die Bewertung von Hamburger Flusssedimenten.

„Sedimente sind ein integraler Bestandteil des aquatischen Ökosystems. Ihre Bedeutung umfasst unter anderem ihre Funktion als Lebensraum, als Ort der Nährstoffremineralisierung, als Laichgrundlage für Fische, und als Ort, in dem Organismen Schutz und Futter suchen“ (Zitat: HEISE et al. 2007)

Partikelgebundene Schadstoffe, Organische sowie anorganische, haben eine sehr viel längere Aufenthaltszeit in Flusssystemen als gelöste Schadstoffe (HEISE et al. 2007). Hinzu kommt, dass organische Schadstoffe mit einer hohen Affinität zum Feststoff in Sedimenten auch eine in der Regel hohe Affinität zu biologischen Oberflächen und das Potential auf Organismen einzuwirken haben (HEISE et al. 2007). Mit dem Fischei-Sedimentkontakttest wird die Toxizität von Sedimenten auf die Entwicklung von Embryonen des Zebraärbblings (*Danio rerio*) getestet. Dieser Sedimentkontakttest wird bereits erfolgreich an einigen Institutionen (z.B. RWTH Aachen, Uni Heidelberg) durchgeführt und soll am Hamburger Institut für Hygiene und Umwelt etabliert werden (RAASCH 2011).

Im Rahmen einer Masterarbeit (RAASCH 2011) sind zunächst grundlegende Fragestellungen zum Versuchsaufbau, zeitlichem Ablauf und den Kontrollansätzen festgelegt worden. Die Ergebnisse wurden abschließend in einer Standardarbeitsanweisung (Standard Operating Procedure (SOP)) zusammengefasst. Darüber hinaus wurden einige Hamburger Sedimente auf toxische Effekte gegenüber Embryonen des Zebraärbblings (*Danio rerio*) getestet. RAASCH (2011) stellte fest, dass diese Sedimente einen hohen Anteil organischer Substanz aufweisen, was zu einer starken Sauerstoffzehrung und zu geringen Sauerstoffkonzentrationen im Überstandswasser führte. Infolgedessen kam es zu einer Unterentwicklung der Fischembryonen, so dass sich toxische Effekte des Sedimentes nicht von den Effekten, die aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung entstanden abgrenzen ließen (KÜSTER &

Einleitung

ALTENBURGER 2008, RAASCH 2011). Um diese Effekte genauer untersuchen zu können, muss während des Testzeitraumes regelmäßig der Sauerstoffgehalt im Überstandswasser gemessen werden. RAASCH (2011) empfiehlt, die Messungen mit Hilfe von Mikrosonden durchzuführen.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit ist es, eine für den Fischei-Sedimentkontakttest geeignete Mikro-Sauerstoffsonde auszuwählen und mit dieser die Sauerstoffentwicklung im Überstandswasser zu erfassen. Anhand von verschiedenen Kriterien sollen dann, auf dem Markt verfügbare Systeme gesucht, miteinander verglichen und in der Praxis getestet werden. Darauf aufbauend werden im zweiten Teil dieser Arbeit Versuche zum besseren Verständnis der zeitlichen und räumlichen Verteilung der Sauerstoffzehrung im Überstandswasser durchgeführt. Anschließend werden Versuche zur Optimierung des Sauerstoffgehalts durch unterschiedliche Schüttelfrequenzen im Fischei-Sedimentkontakttest durchgeführt. Zusätzlich wurden Versuche mit unterschiedlichen Bewegungsfrequenzen durchgeführt um die Auswirkungen des Quarzsandes auf die Fischeier genauer zu untersuchen. Hauptziel dieser Arbeit ist die Sicherstellung eines Sauerstoffgehalts von mindestens 4 mg/l im Überstandswasser (DIN 2009). Abschließend werden die aus den Ergebnissen resultierenden Empfehlungen zur Optimierung der Versuchsbedingungen des Fischei-Sedimentkontakttest in die Standardarbeitsanweisung übernommen.

I. Übergreifende Grundlagen

I.1. Fischei-Sedimentkontakttest mit dem Zebrafisch

(Danio rerio)

Fische spielen eine wichtige Rolle in der aquatischen Nahrungskette und haben ebenso wichtige Regulationsfunktionen in aquatischen Ökosystemen (BEUTH.DE 2013). Als Testorganismus in der Ökotoxikologie ist der Zebrafisch Embryo (*Danio rerio*) nicht mehr wegzudenken und kommt zur Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser und Oberflächenwasser auf Fischeier zum Einsatz (DIN 2009). In veröffentlichter Literatur vor dem Jahr 2009 wird der Fischeitests aus der DIN 38415-T6 zitiert. Diese wurde 2009 von der DIN EN ISO 15088-6 (DIN 2009) abgelöst.

Der Fischei-Sedimentkontakttest ist eine Weiterentwicklung des Fischeitests. Wichtigster Unterschied ist, dass die Eier auf ein natives Sediment gegeben werden und nicht in ein Testwasser (VOBACH 2003). Denkbar und seit einiger Zeit Gegenstand der Forschung sind neben dem direkten Kontakt der Fischeier mit nativem Sediment auch Untersuchungen an Sedimentextrakten und -eluat (HOLLERT 2001, KEITER 2007).

Im Folgenden wird die Durchführung des Sediment-Kontakttests erläutert (vgl. HOLLERT et al. 2004, GROTE et al. 2004, KEITER 2007, RAASCH 2011).

Zunächst wird 3 g gefriergetrocknetes Sediment in 20 ml Kristallisierschalen eingewogen. Wie in der Ökotoxikologie üblich können zusätzlich verschiedene Verdünnungsstufen angesetzt werden. Verdünnungen des Sediments mit Verdünnungswasser, oder Quarzsand sind möglich. Die Zugabe des Verdünnungswassers (DIN 2009) bis zur vollständigen Sättigung des Sediments erfolgt nach der Einwaage. Hiernach wird nochmals 2 ml Verdünnungswasser hinzugegeben. Für den Kontrollansatz werden acht Kristallisierschalen mit Quarzsand (3 g) und Verdünnungswasser (4 ml), sowie acht mit reinem Verdünnungswasser (4 ml) gefüllt. Jeweils vier werden für die Vorbereitung der Positiv-Kontrollen verwendet. Als Schadstoff wird 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) mit einer von der DIN EN ISO 15088-6 vorgegebenen Konzentration (3,7 mg/l) verwendet. Die Konzentration der Positiv-Kontrollen ergibt sich aus einer Zugabe von 185 µl 3,4-DCA-Lösung (Konzentration: 100 mg/l).

Fischei-Sedimentkontakttest mit dem Zebrafisch (Danio rerio)

Nach diesen Vorbereitungen werden die Eier aus den Laichbecken entnommen. Die Befruchtungsrate sollte bei mindestens 50 % liegen (DIN 2009). In jede Kristallisierschale werden fünf Eier überführt. Bei der Sedimentprobe und dem Verdünnungswasser werden die Eier in 1 ml, bei der Positiv-Kontrolle in 815 µl Verdünnungswasser überführt. Die Eier müssen behutsam behandelt werden und sollten das 128-Zell-Stadium nicht überschreiten.

Anschließend werden die Kristallisierschalen mit Parafilm verschlossen und für 48 h bei 26 °C in der Kühlkubator, auf einen Horizontalschüttler mit einer Bewegungsfrequenz von 90 UpM gestellt.

Zur Auswertung der Embryonen werden die fünf Eier eines Ansatzes in ein Well einer 24 Well-Platte überführt (RAASCH 2011). Die Eier werden nach folgenden toxikologischen Endpunkten unter einem Invers-Mikroskop beurteilt.

I.1.1. Toxikologische Endpunkte der DIN EN ISO 15088-6

In der DIN EN ISO 15088-6 (2009) werden folgende toxikologische Endpunkte betrachtet.

- koagulierter Keim
- keine Schwanzablösung
- kein Herzschlag

In dieser Arbeit werden zusätzlich Herzödeme, die Blutzirkulation und Fröhschlupf mit einbezogen. Embryonen mit Herzödem (Abbildung I.1, Bild b)) weisen keinen, oder nur einen schwachen Herzschlag auf. Dieser reicht nicht aus um die Blutzirkulation im gesamten Embryo aufrecht zu erhalten. Es kommt daher dem DIN Endpunkt „kein Herzschlag“ gleich. Bis auf den Fröhschlupf sind dies alles letale Endpunkte, die mit dem Mikroskop nachgewiesen werden können. Trifft keiner der angegebenen letalen Endpunkte zu, wird der Embryo als normal entwickelt eingestuft. Es kann davon ausgegangen werden, dass er sich aus eigener Kraft aus dem Ei befreien kann und danach überlebensfähig ist. In der folgenden Abbildung I.1 ist eine Auswahl an Endpunkten dargestellt.

Fischei-Sedimentkontakttest mit dem Zebrafisch (Danio rerio)

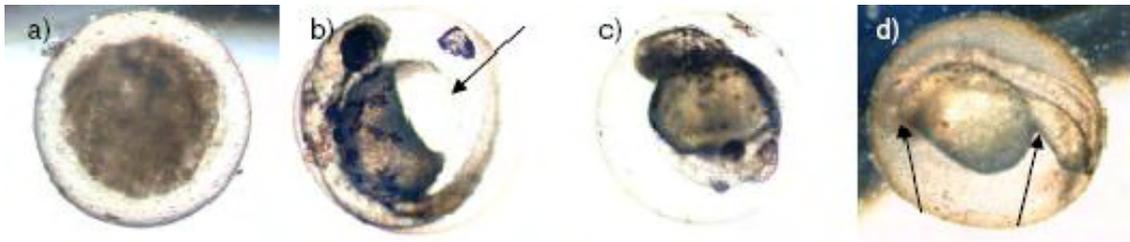


Abbildung I.1 Fehlentwicklungen von Embryonen
RAASCH 2011, Seite 8

Legende: a): koaguliertes Ei; b): Herzödem; c): deformierter Embryo; d): keine Schwanzablösung

In Bild a) ist ein koaguliertes Ei abgebildet. Koagulation, oder auch Denaturierung, ist die Gerinnung bzw. Zerstörung von Eiweißen. Diese sind aufgrund ihrer weißen Färbung mit bloßem Auge zu erkennen und erscheint unter dem Mikroskop als dunkler Fleck (RAASCH 2011). Ein Fischei gilt dann als koaguliert, wenn die biologische Funktion nicht mehr gegeben ist. Die Struktur als Embryo ist nicht mehr zu erkennen (RAASCH 2011).

Bild b) zeigt ein Herzödem (Pfeil). Embryonen mit einem Herzödem haben keinen, oder nur einen sehr schwachen Herzschlag. Oft reicht der schwache Herzschlag nicht aus, um die Blutzirkulation im gesamten Embryo sicherzustellen (RAASCH 2011). Dies kommt einem fehlenden Herzschlag gleich.

In Bild c) ist ein sehr deformierter Embryo zu sehen. Eine normale Form ist nicht mehr zu erkennen. Der Embryo besitzt keinen Herzschlag. Kopf und Augen sind nur zum Teil ausgebildet. Der Schwanz ist nicht vom Dottersack gelöst, oder korrekt ausgebildet.

Der in Bild d) dargestellte Embryo hat einen verdickten Schwanz, der zusätzlich nicht korrekt vom Dottersack gelöst ist. Weiterhin ist keine Pigmentierung der Netzhaut zu erkennen.

I.2. Versuchstier Zebraabärbling (*Danio rerio*)

Der Zebraabärbling gilt als sehr lebendig und ist als Schwarmfisch unter Aquarianern ein beliebter Anfänger-Fisch (AQUARIUM-GUIDE.DE 2013). Zebraabärblinge sind ein weit verbreitetes Versuchstier (GRAW 2010), deren Eier unter anderen für den Fischeitest (DIN 2009), sowie den Fischei-Sedimentkontakttest zum Einsatz kommen.

I.2.1. Allgemeine Informationen

Der Zebraabärbling (*Danio rerio*) (Abbildung I.2) wurde erstmals 1822 von Francis Buchanan-Hamilton (+ 15. Juni 1829) im Fluss Kosi der Ganges Region entdeckt, beschrieben und in London, sowie Edinburgh veröffentlicht (HAMILTON 1822). Seit George Streisinger (University of Oregon) in den 70er Jahren den Zebrafisch aufgrund seiner guten Reproduzierbarkeit, einfachen Hälterung und der sich außerhalb des Muttertiers entwickelnden transparenten Eier, als sehr geeignetes Labortier entdeckte, entwickelte sich der Zebraabärbling schnell zur „Laborratte“ unter den Fischen und wird weltweit eingesetzt. Die größten Einsatzbereiche von *Danio rerio* liegen in der Genetik und der Entwicklungsbiologie (GRAW 2010).



Abbildung I.2 Zebraabärbling (*Danio rerio*). Oben: Weibchen, Unten: Männchen
KOELLE-ZOO.DE (2013)

Versuchstier Zebrabärbling (*Danio rerio*)

In Tabelle I.1 ist die Systematik des Zebrabärbling aufgelistet (VOBACH 2003).

Tabelle I.1 Systematik des Zebrabärblings (*Danio rerio*)

Systematik des Zebrabärblings (<i>Danio rerio</i>)		
Ordnung	Karpfenartige	(<i>Cypriniformes</i>)
Überfamilie	Karpfenfischähnliche	(<i>Cyprinodei</i>)
Familie	Karpfenfische	(<i>Cyprinidae</i>)
Unterfamilie	Bärblinge	(<i>Danioninae</i>)
Gattung	Danio	
Art	Zebrabärbling	
Wissenschaftlicher Name	<i>Danio rerio</i>	

Die Herkunft des Zebrabärblings ist der indische Subkontinent. Seine Verteilung erstreckt sich über Teile von Indien, Bangladesch, Nepal, Myanmar und Pakistan (SPENCE et al. 2006 & 2007, LAWRENCE 2007) (Abbildung I.3).

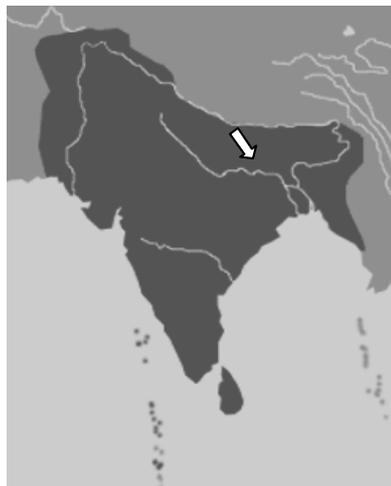


Abbildung I.3 Die Herkunft des Zebrabärblings

ZIERFISCHVERZEICHNIS.DE (2012)

Legende: **Pfeil:** markiert den ersten Fundort im Fluss Kosi, nahe des Ganges von Hamilton

Beheimatet ist der Zebrabärbling in den Zuflüssen des Ganges, wo er in langsam fließenden oder stehenden Gewässern, Flüssen mit dichten Uferbewuchs und flachen Teichen lebt (LAWRENCE 2007). Häufig wurde er auf Reisfeldern gefunden (LAWRENCE 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zebrafisch stehende, oder langsam fließende Gewässer im leicht alkalischen Bereich (pH-Wert ca. 8,0) und einer relativen

Versuchstier Zebrabärbling (*Danio rerio*)

Sichttiefe von ca. 35 cm bevorzugt (SPENCE et al. 2006, McCLURE et al. 2006, LAWRENCE 2007).

Zebrabärblinge werden ca. 5 cm groß und sind eher längliche Fische. Ihre Farbe reicht von Olivgrün auf dem Rücken, bis hin zu einem silbrigen Bauch, wobei beide Seiten von mehreren Blau-Silber Streifen geziert werden, die von den Kiemendeckeln bis zur Schwanzflosse verlaufen (VOBACH et al. 2003). In der Abbildung I.4 sind die Männchen (rechts) von den etwas bäuchlichen Weibchen (links) klar zu unterscheiden. Die Männchen sind schlanker und etwas kleiner. Ihre Farbe ist kräftiger und auf dem Rücken orangegold (STALLKNECHT 1994).

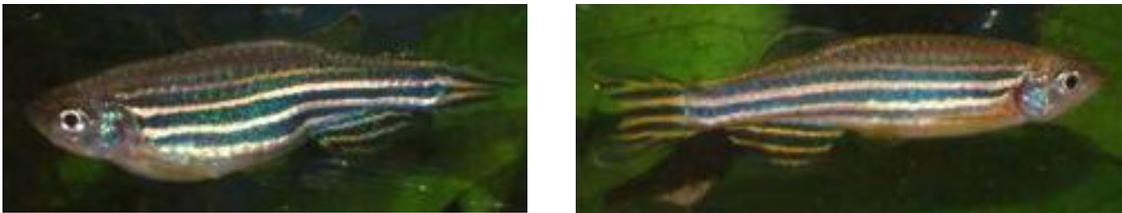


Abbildung I.4 Geschlechtliche Unterschiede *Danio rerio*. Links: Weibchen, Rechts: Männchen

FREWEBS.COM (2012)

I.2.2. Hälterung

Zebrafische weisen eine hohe Toleranz gegenüber der Wassertemperatur auf (Lawrence 2007). Laborversuche legten einen maximalen tolerierbaren Bereich von 6,7 - 41,7 °C fest (CORTEMEGLIA & BEITINGER 2005, SCHAEFER & RYAN 2006). Dies wurde von SPENCE et al. (2006) in Feldversuchen bestätigt. Zebrafische wurden in ihrer natürlichen Umgebung in Temperaturbereichen von 16,5 - 33 °C gefunden. Der pH-Wert sollte mit etwa 8,0 im leicht alkalischen Bereich liegen.

Um eine standardisierte Hälterung zu gewährleisten, werden die Fische in temperierten Aquarien ohne Bodensubstrate oder Pflanzenbewuchs gehalten. Die Raum- bzw. Wassertemperatur liegt bei 26 °C ± 1 °C (DIN 2001) und wird mit Datenloggern überwacht. Gefüttert wird im täglichen Wechsel mit Trockenfutter der Firma Tetra (Melle, Deutschland) oder mit Lebendfutter (Arthemien [*Artemia* LEACH 1819]). Die Jungtiere bekommen TetraMin Baby, ebenfalls von der Firma Tetra, und werden in kleineren Aufzuchtbecken gehalten. Es ist darauf zu achten, dass die Stressfaktoren im Labor für die Fische so niedrig wie möglich gehalten werden. Ein wichtiger Punkt ist die Besatzdichte der Aquarien. Nach SPENCE & SMITH (2006) gelten 0,25 Fische/Liter als optimal. RAMSAY et al. (2006) sprechen von bis zu 40 Fischen/Liter. Die Größe der Fische ist dabei maßgebend. Die DIN gibt einen Richtwert von 1 Fisch/Liter an (DIN 2001). Als Hälterungs- und Zuchtwasser wird Leitungswasser verwendet, das zum Zweck der Qualitätssicherung über eine Aktivkohlepatrone und einen Kupfer-Ionen-Austauscher gelaufen ist (INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT QUALITÄTSMANAGEMENTHANDBUCH 2009). Einmal wöchentlich wird ein Teilwasserwechsel vorgenommen und die Aquarien mit Filterwatte gereinigt. Die Filter werden etwa alle 3 Monate gereinigt (RAASCH 2011). Zweimal wöchentlich wird eine Kontrolle der Sauerstoffkonzentration und des pH-Werts durchgeführt. Darüber hinaus werden einmal in der Woche die Nitrit-, Nitrat- und Ammoniumgehalte mit Hilfe von Merckoquant Teststreifen der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) gemessen und monatlich mit der gleichen Methode die Wasserhärte bestimmt. Jedes Aquarium hat eine Identifikationsnummer, über die alles dokumentiert wird.

I.2.3. Zucht

Der Zebraabärbling wird beim Umweltbundesamt bezogen und kann im Labor weiter gezüchtet werden. Es werden nur Jungtiere zur Zucht verwendet, die älter als sechs Monate sind, sich in einem einwandfreien Gesundheits-Zustand befinden, d. h. nicht medikamentös (vor)behandelt sind und äußerlich keine erkennbaren Skelettdeformationen oder andere Beeinträchtigungen zeigen (VOBACH et al. 2003). Mit einem Alter von 24 Monaten werden sie aus der Zucht entfernt. In der Natur erfolgt die Eiablage der Zebraabärblinge innerhalb der ersten Stunde nach Sonnenaufgang (VOBACH et al. 2003). Um eine kontinuierliche Ei-Produktion zu gewährleisten werden die Zebraabärblinge ganzjährig in einem festen Hell-Dunkel-Rhythmus von 14 : 10 Stunden gehältert. Weitere Verhältnisse von 16 : 8, oder 12 : 12 Stunden sind möglich (DIN 2001). Adulte Zebraabärblinge sind starke Laichräuber, die die abgelegten Eier in der Regel sofort fressen (MULLINS et al. 1994, RAASCH 2011). Männchen und Weibchen werden daher im Verhältnis von 2 : 1 (DIN 38415-6) am Vorabend in Laichbecken gesetzt (VOBACH et al. 2003)(Abbildung I.5). Durch Maschen im Boden fallen die Eier nach der Eiablage hindurch und sind somit außer Reichweite. Als Anreiz und Auslöser für das Abläichen sind neben dem Licht Pflanzen notwendig (VOBACH et al. 2003). Dies wird durch Plastikpflanzen simuliert (RAASCH 2011)

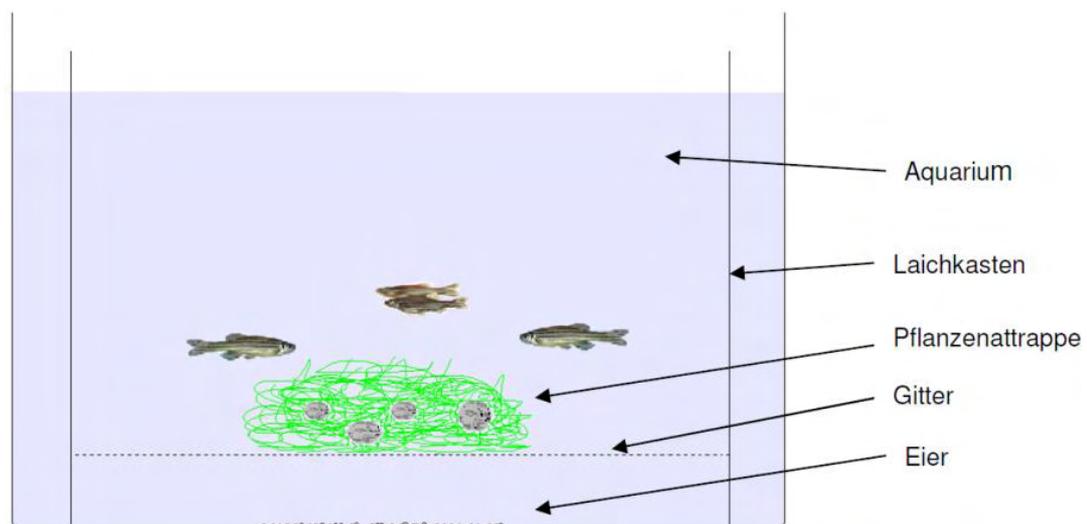


Abbildung I.5 Zebraabärbling im Laichbecken mit Pflanzenattrappe

RAASCH 2011

I.2.4. Embryonale Entwicklung

Die Befruchtung der ca. 1 mm großen Eier und die embryonale Entwicklung finden außerhalb des Muttertiers statt. Die embryonale Entwicklung ist in der Literatur ausreichend dokumentiert, so dass eventuelle Fehlentwicklungen und Mutationen leicht erkannt werden können (RAASCH 2011). Die Entwicklung dauert von der Befruchtung des Eis bis zum Schlüpfen der Larve ca. 72 Stunden. Sie ist in acht Perioden mit insgesamt 34 Entwicklungsstadien eingeteilt (KIMMEL et al. 1995). Im Folgenden werden die für den Fischei-Sedimentkontakttest relevanten Stadien der ersten 48 Stunden aufgezeigt. Wenn nicht anders angegeben, entspricht der folgende Text KIMMEL et al. (1995) S. 260-302. Alle Skizzen der Zellstadien sind ebenfalls KIMMEL et al. (1995) entnommen. Vergleichend dazu sind Aufnahmen von einem Lichtmikroskop aus RAASCH (2011) gegenübergestellt.

Die Zeit, die seit der Befruchtung vergangen ist, wird in hours past fertilisation (hpf) angegeben.

Zytogene Phase (0 bis $\frac{3}{4}$ hpf)

Die erste Phase in der Entwicklung ist die zytogene Phase (Abbildung I.6). Sie beginnt mit der Eibefruchtung (1-Zell-Stadium) und endet mit der ersten Zellteilung

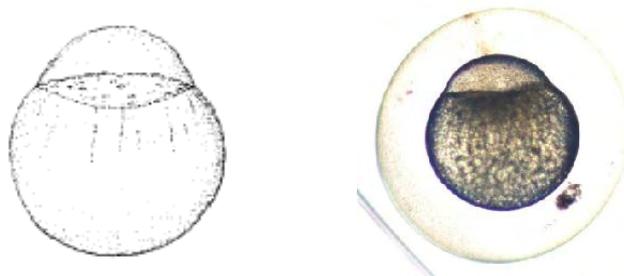


Abbildung I.6 Entwicklung des Zebrabärblings in der Zytogenen Phase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

Zellteilungsphase ($\frac{3}{4}$ bis 2 hpf)

In der Phase der Zellteilung (Abbildung I.7) erfolgt alle 15 min eine weitere Teilung. Zwei Stunden nach der Befruchtung ist das 64-Zell-Stadium erreicht. In der Abbildung II.8 sind das 2-, 4-, 8- und 64-Zell-Stadium dargestellt.

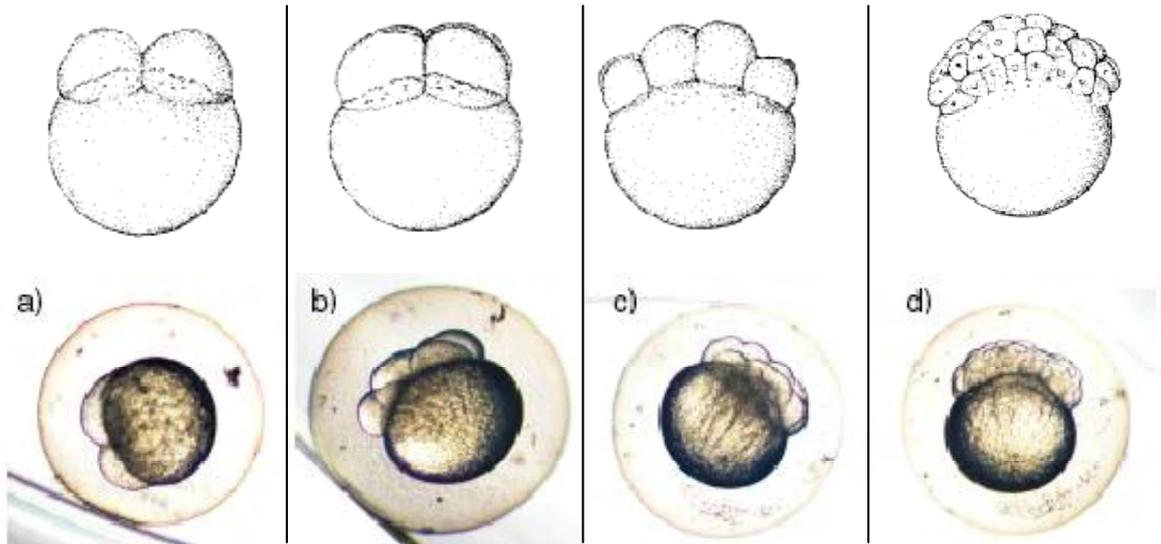


Abbildung I.7 Entwicklung des Zebraabärblings in der Zellteilungsphase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

Legende: **a):** 2-Zell-Stadium ($\frac{3}{4}$ hpf); **b):** 4-Zell-Stadium (1 hpf); **c):** 8-Zell-Stadium ($1 \frac{1}{4}$ hpf); **d):** 64-Zell-Stadium (2 hpf)

Blastula Phase (2 ¼ bis 5 hpf)

In der Blastula Phase lassen weitere Zellteilungen den Keimling aufwachen. Es kommt zur Ausbildung des Dottersacks. Der Zellhaufen streckt sich in die Länge und bildet nach ca. 4 hpf eine Sphäre. Das obere Keimblatt umschließt nach und nach den Dottersack. Diese Umhüllung des Dotters nennt man Epibolie. Nach 4,7 hpf ist das Stadium der 30 %-Epibolie erreicht. In der Abbildung I.8 ist zu sehen, wie der Keim im 512-Zellen-Stadium (s. Bild f)) sich aufgetürmt hat und schließlich in Bild e) und h) über eine elliptische Form in eine runde Form übergeht (Sphäre).

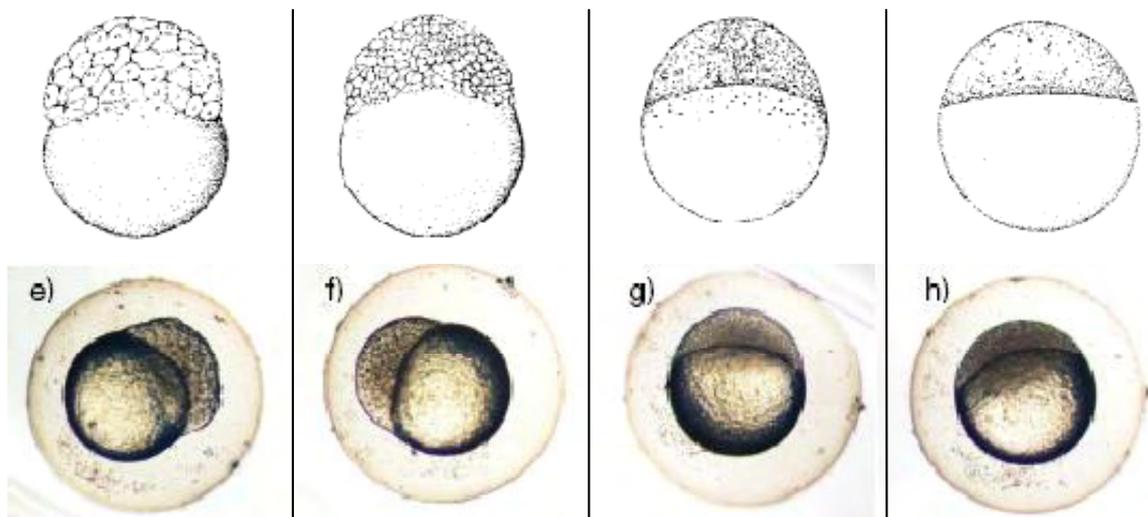


Abbildung I.8 Entwicklung des Zebrafischkeims in der Blastula Phase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

Legende: **e)**: 128-Zell-Stadium (2 ¼ hpf); **f)**: 512-Zell-Stadium (2 ¾ hpf); **g)**: länglich/elliptisch (3,7 hpf); **h)**: rund/Sphäre (4 hpf)

Gastrula Phase (5 ¼ bis 10 hpf)

Die nächste Phase ist die Gastrula Phase. Sie endet nach zehn Stunden in dem Stadium der 100 %-Epibolie. Während der Gastrula Phase schreitet die Epibolie weiter voran. Sechs Stunden nach der Befruchtung sind die Zellen von der verdickten Epiboliefront weiter um den Keimling gewandert und haben das Embryonalschild ausgebildet. Nach 9 hpf verdicken sich Kopf und Schwanzteil und die Embryonalachse bildet sich aus dem Embryonalschild.

Segmentierungsphase (10 bis 24 hpf)

Während der 14 stündigen Segmentierungs-Phase (Abbildung 1.9) bilden sich die Somiten (Urwirbel) aus, nach deren Anzahl die einzelnen Stadien der Phase benannt sind. Der Embryo verdoppelt seine Länge von ca. 0,9 mm auf 1,8 mm. Erste Anzeichen von inneren Organen, wie Auge, Gehirn Neuronen und Ohr-Vesikel, sind zu erkennen. Am Ende der Phase haben sich 26 Somiten ausgebildet und es kommt zu ersten Bewegungen des Embryos. Der Schwanz ist bereits gut ausgebildet und fängt an sich vom Dottersack zu lösen (s. Bild i)).

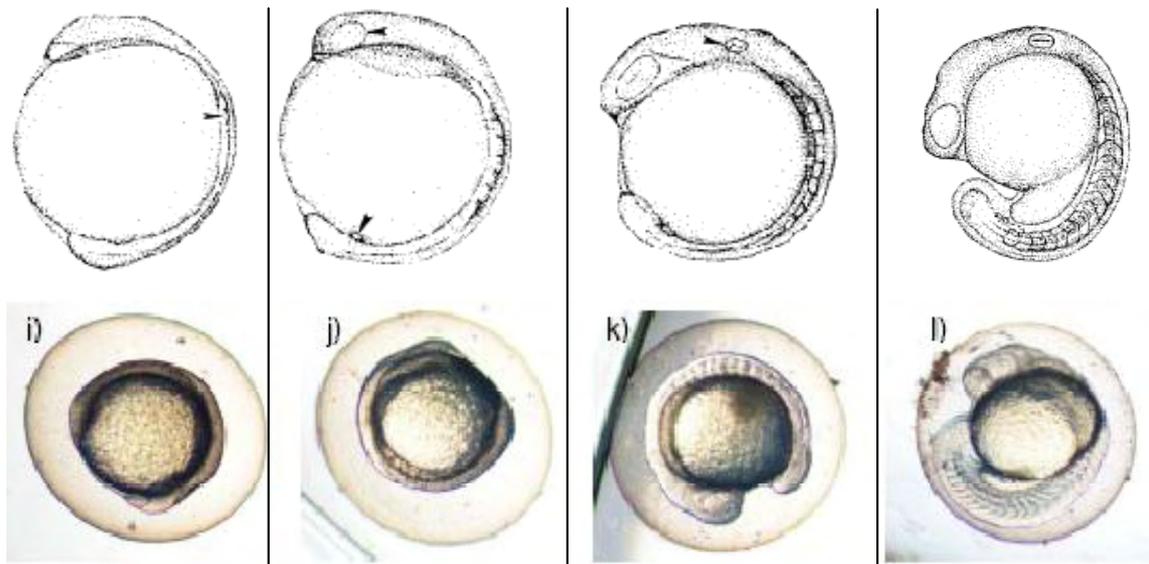


Abbildung 1.9 Entwicklung des Zebrafärblings in der Segmentierungsphase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

Legende: **i)**: 3-Somiten-Stadium (11 hpf); **j)**: 6-Somiten-Stadium (12 hpf); **k)**: 10-Somiten-Stadium (14 hpf); **l)**: 18-Somiten-Stadium (18 hpf)

Pharyngula Phase (24 bis 48 hpf)

Während der Pharyngula Phase wächst der Embryo weitere 65 % und erreicht eine Länge von ca. 3,1 mm. Der Schwanz löst sich vollständig ab. Erste Pigmentierung der Netzhaut und der Haut, bis hin zum Schwanz, sind zu sehen. 24 Stunden nach der Befruchtung entstehen rote Blutkörperchen. Das Herz fängt bereits im Dottersack an zu schlagen, bevor es in den Brustkorb umgelagert wird (RAASCH 2011). Weitere zwölf Stunden später zirkuliert das Blut bis in die Schwanzspitze. In Abbildung I.10 ist die erste Pigmentierung (Bild n)) und das Herz mit roten Blutkörperchen zu erkennen (Bild o)).

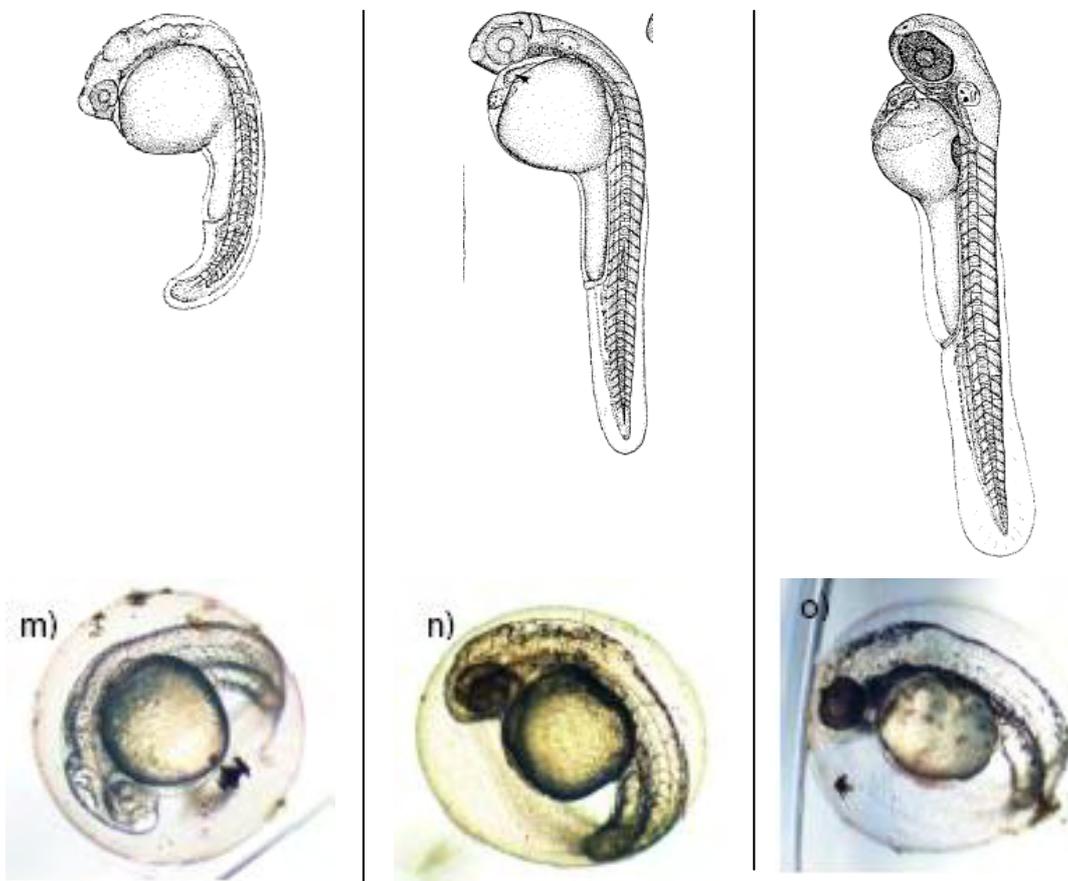


Abbildung I.10 Entwicklung des Zebrabärblings in der Pharyngula Phase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

Legende: m): 26-Somiten-Stadium (22 hpf); n): Prim-15-Stadium (30 hpf); o): Long-pec-Stadium (48hpf)

Schlupfphase (70 bis 72 hpf)

Abbildung I.11 Bild p) zeigt ein Embryo kurz vor dem Schlüpfen (70 hpf). Die Brustflossen und alle Lebenswichtigen Funktionen sind entwickelt. Der Embryo ist sehr aktiv und versucht sich mit kräftigen Schwanzschlägen aus dem Ei zu befreien. Nach dem Schlüpfen liegen die jungen Larven einige Zeit erschöpft am Boden und verzehren innerhalb der nächsten Tage den Dottersack vollständig.

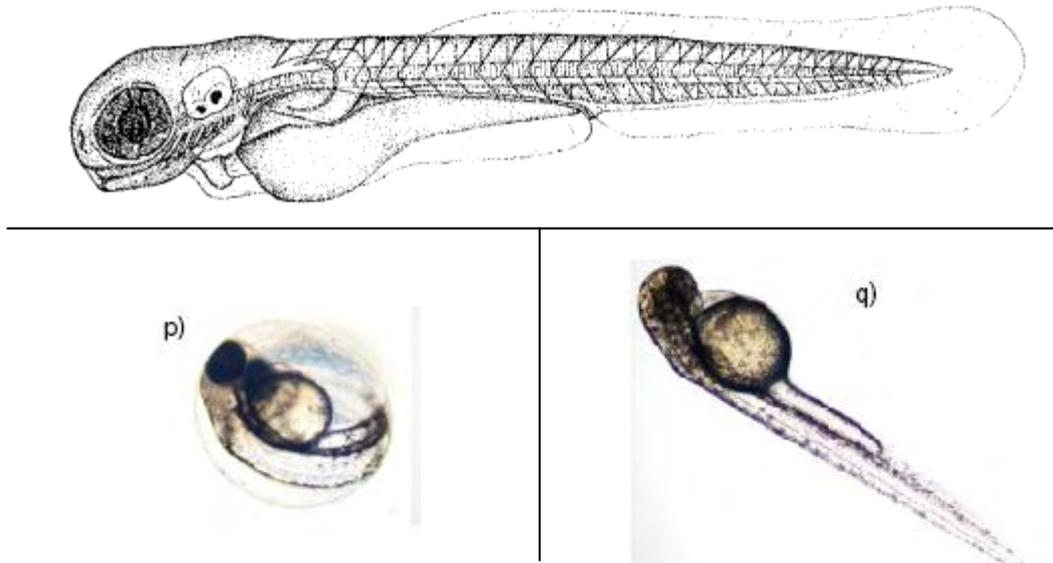


Abbildung I.11 Entwicklung des Zebraabärblings in der Schlupfphase

KIMMEL et al. 1995 und RAASCH 2011

*Legende: **oben:** geschlüpfter Embryo (72 hpf); **p):** 70 hpf; **q):** geschlüpfter Embryo (72 hpf)*

I.2.5. Sauerstoffbedarf von Zebraabärbling Embryonen (*Danio rerio*)

Für eine normale Embryonalentwicklung muss ein ausreichend hoher Gehalt gelösten Sauerstoff zur Verfügung stehen. Ist dieses nicht der Fall kommt es zu Unterentwicklungen oder letalen Schäden an den Embryonen (vgl. Abbildung I.1). Vorangegangene Studien haben den Sauerstoffverbrauch von Embryonen untersucht. In Tabelle I.2 sind die Ergebnisse des Sauerstoffverbrauchs der ersten Tage nach der Befruchtung (days past fertilisation, dpf) dreier Studien zusammengefasst. Dabei entsprechen exemplarisch 0,1 µMol, 0,3 µMol und 0,5 µMol umgerechnet 0,007 mg O₂, 0,015 mg O₂ und 0,037 mg O₂ (PRESENS 2013). Die Ergebnisse sind Tagesverbrauchswerte.

Tabelle I.2 Sauerstoffverbrauch pro Tag von Zebraabärbling Embryonen in den ersten Tagen nach der Befruchtung

Sauerstoffverbrauch von Zebraabärbling Embryonen		
1 dpf	0,165 µMol	
2 dpf	0,079 - 0,244 µMol	STRECKER et al. (2011)
3 dpf	0,021 - 0,265 µMol	
Summe über 1-3 dpf	0,674 µMol	
1 dpf	0,091 µMol	STRECKER et al. (2011) berechnet nach
2 dpf	0,120 µMol	
3 dpf	0,216 µMol	GRILLITSCH et al. (2005)
Summe über 2-3 dpf	0,261 - 0,462 µmol	BANG et al. (2004)

Ein Embryo benötigt in den ersten drei Tagen bis zum Schlupf ca. 0,037 mg O₂ (STRECKER et al. 2011, GRILLITSCH et al. 2005, BANG et al. 2004). Dies ist nicht gleich zusetzen mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,037 mg/l. Mit einem Überstandswasservolumen von 4 ml ergäbe sich umgerechnet eine benötigte Sauerstoffkonzentration von 9,25 mg/l. Embryonen des Zebraabärblings kommen mit durchaus weniger Sauerstoff aus, können aber nicht effektiv auf hypoxische Umgebungen reagieren (BARRIONUEVO et al. 2010). Das Wachstum und die Herzschlagrate werden beeinträchtigt (BARRIONUEVO et al. 1999, YAQOUB et al. 2010). YAQOUB et al. (2010) publizierten, dass sich die Herzschlagrate innerhalb weniger Stunden wieder normalisiert, nachdem Embryonen einem hypoxischen Milieu ausgesetzt wurden. Die Tabelle I.3 und Tabelle I.4 zeigt eine

Versuchstier Zebrabärbling (*Danio rerio*)

Übersicht zum Sauerstoffbedarf von Zebrabärblings Embryonen aus vorangegangenen Studien.

Tabelle I.3 Sauerstoffbedarf Zebrabärbling Embryos (*Danio rerio*)

Sauerstoffbedarf Zebrabärbling Embryos (<i>Danio rerio</i>)		
Keine signifikanten Effekte	7,15-3,33 mg O ₂ /l	
geringfügige Verzögerungen; normale Entwicklung	3,0-2,0 mg O ₂ /l	STRECKER et al. (2011)
geringfügige Verzögerungen; normale Entwicklung	2,0 mg O ₂ /l	BRAUNBECK et al. (2005)
normale Entwicklung (Details nicht bekannt)	0,5 mg O ₂ /l	HOLLERT et al. (2004)
normale Entwicklung	4,3 mg O ₂ /l	BARRIONUEVO et al. (2010)

Tabelle I.4 Grenzwerte und Letalgrenzwerte der Zebrabärbling Embryos (*Danio rerio*)

Grenzwerte und Letalgrenzwerte der Zebrabärbling Embryos (<i>Danio rerio</i>)		
LC 40	4,3 mg O ₂ /l	BARRIONUEVO et al. (2010)
LC 100	0,88 mg O ₂ /l	STRECKER et al. (2011)
extreme Hypoxie	1,0 mg O ₂ /l	MARTINOVIC et al. (2009)
mind. Sauerstoffkonzentration	4,0 mg O ₂ /l	DIN 38415-T6 (2001)

I.2.6. Sauerstoffbedarf des Zebrabärblings (*Danio rerio*)

Zu den optimalen und den kritischen Sauerstoffbedingungen für adulte Zebrabärblinge ist in der Literatur wenig zu finden. Artikel in Fachzeitschriften und Publikationen thematisieren meist den Sauerstoffbedarf von Embryonen. HELFMAN et al. (1997) gibt zu bedenken, dass kleine tropische Fische generell eine höhere Stoffwechselrate haben und diesbezüglich mehr Sauerstoff pro Gramm Fisch benötigen als größere Arten. Dies und andere Faktoren, wie die hohe Wassertemperatur, das Fütterungsintervall und die Besatzdichte, grenzen den optimalen Bereich der Sauerstoffkonzentration ein (LAWRENCE 2007). LAWRENCE (2007) sieht daher eine Notwendigkeit von etwa 7,8 mg O₂/l oder knapp darunter, um die Gesundheit der Fische nicht zu beeinträchtigen. Einige Warmwasserarten tolerieren auch geringere Sauerstoffkonzentrationen (POPMA & MASSER 1999). Es wäre möglich, dass auch der Zebrafisch in

diese Kategorie fällt (LAWRENCE 2007). BARRIONUEVO et al. (2010) beschrieb, dass juvenile Zebrabärblinge (30 Tage alt) verschiedene Mechanismen zur Anpassung an aerobe und anaerobe Umgebungen entwickeln können. Dies geschehe aber nur, wenn sie unter leicht hypoxischen Bedingungen (4,3 mg O₂/l) aufwachsen (BARRIONUEVO et al. 2010). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass moderate hypoxische Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum der Tiere bis zu einem Alter von 60 Tagen haben (BARRIONUEVO et al. 2010). Darüber hinaus wurde eine Verzögerung des Wachstums festgestellt (BARRIONUEVO et al. 2010).

I.2.7. Sauerstoffbedarf einiger Fischarten der Elbe

Die Elbe gehört zu den größten Wasserkörpern in Hamburg und bietet verschiedenen Fischarten einen Lebensraum, oder die Möglichkeit der Wanderung zu ihren Laichgebieten. Im Folgenden wird auf vier in der Elbe vorkommende Arten, im Bezug auf deren Sauerstoffbedarf, exemplarisch eingegangen. Wo liegt das Optimum, wo beginnt der untere kritische Bereich und wie groß sind Toleranzgrenzen einzelner Individuen (OTTO & ZAHN 2008)?

I.2.7.1. Atlantischer Lachs (*Salmo salar*)

Der Atlantische Lachs wird zu den kaltstenothermen Arten zugeordnet. Die niedrigeren Temperaturen führen ohne anthropogene Beeinflussung generell zu einer höheren Konzentration an gelöstem Sauerstoff, daher sind Kaltwasserarten auch an höhere Sauerstoffkonzentrationen angepasst (OTTO & ZAHN 2008). Wie alle Salmoniden haben auch Lachse einen hohen Anspruch an die Sauerstoffkonzentration im Gewässer (OTTO & ZAHN 2008) (Tabelle I.5 und Tabelle I.6).

Tabelle I.5 Sauerstoffbedarf Atlantischer Lachs (*Salmo salar*)

Sauerstoffbedarf Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)		
Optimum (Adulte)	9 mg O ₂ /l	ALABASTER & LLOYD (1980)
kritischer Bereich (Adulte)	5 mg O ₂ /l	
Optimum (Adulte)	7-9 mg O ₂ /l	WOLTER et al. (2003)
kritischer Bereich (Adulte)	3,1-3,7 mg O ₂ /l	
Kritischer Bereich (Juvenile)	1,9 mg O ₂ /l	PRIVOLVNEV (1954)

Tabelle I.6 Toleranzen und letale Grenzwerte Atlantischer Lachs (*Salmo salar*)

Toleranzen und letale Grenzwerte Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)		
LC 10-24	2,4 mg O ₂ /l	TURNPENNY et al. (2004)
LC 50-24	2,12 mg O ₂ /l	
LC 50	3,3 mg O ₂ /l	ALABASTER et al. (1979)

I.2.7.2. Finte (*Alosa fallax*)

Die Finte lebt im kühleren Meerwasser, aber bevorzugt zum Laichen wärmere Gewässer (OTTO & ZAHN 2008). Die Larven sind anspruchsvoller bei der Sauerstoffkonzentration als die juvenilen Finten (OTTO & ZAHN 2008). In Tabelle I.7 ist der Sauerstoffbedarf der Finte (*Alosa fallax*) dargestellt.

Tabelle I.7 Sauerstoffbedarf Finte (*Alosa fallax*)

Sauerstoffbedarf Finte (<i>Alosa fallax</i>)		
Präferenz Junglarven (7,1–17,2 mm Länge)	10,1-13,3 mg O ₂ /l	
Präferenz Spätlarven (15,4-29,1 mm Länge)	4,0-13,3 mg O ₂ /l	OTTO & ZAHN (2008)
Präferenz Juvenile	4,0-5,0 mg O ₂ /l	
Präferenz Adulte	ähnlich Juvenile	

I.2.7.3. Atlantischer Stör (*Acipenser sturio*)

Seit Anfang der 1990er fördert das Bundesamt für Naturschutz den Wiederaufbau von Beständen des Atlantischen Störs in deutschen Flüssen und Meeresgebieten der Nord- und Ostsee (IGB-BERLIN.DE 2013). Im Verbreitungsgebiet der Störe liegen die Wassertemperaturen meist bei 10-18 °C (FROESE & PAULY 2008). Für adulte Störe gilt allgemein, dass Sauerstoffkonzentrationen kleiner als 6 mg/l im Wachstum einschränkend wirken (BOHL 1999, de GROOT 2002). In Tabelle I.8 sind die Wachstumsbedingungen juveniler Atlantischer Störe (*Acipenser sturio*) aufgelistet. In Tabelle I.9 sind die Letalgrenze des Sauerstoffbedarfs für Störe allgemein zu entnehmen.

Tabelle I.8 Wachstumsbedingungen juveniler Atlantischer Stör (*Acipenser sturio*)

Wachstumsbedingungen juveniler Atlantischer Stör (<i>Acipenser sturio</i>)		
Optimum (Wassertemp.)	16-20 °C	
O ₂ -Sättigung 60 % (21 °C)	ca. -20 %	HOCHLEITNER (1996)
O ₂ -Sättigung 48 % (21 °C) (entspricht ca. 4,3 mg O ₂ /l)	-40 %	

Tabelle I.9 Letalgrenze des Sauerstoffbedarfs für Störe allgemein

Letalgrenze Störe		
Störe allgemein	1,8 mg O ₂ /l	HOCHLEITNER (1996)
Atlantischer Stör (<i>Acipenser sturio</i>)	2,0-2,4 mg O ₂ /l	WOLTER et al. (2003)

I.2.7.4. Europäischer Aal (*Anguilla anguilla*)

Der optimale und wachstumsfördernde Temperaturbereich für den Europäischen Aal liegt bei 18-25 °C (WOLTER et al. 2003, SADLER 1979). Laut WALTER et al. (2003) gehören der Aal, sowie das Flussneunauge zu den Arten mit einer hoher Toleranzgrenze gegenüber hypoxischen Verhältnissen (OTTO & ZAHN 2008). Der Sauerstoffbedarf wird in Tabelle I.10 dargestellt.

Tabelle I.10 Sauerstoffbedarf Europäischer Aal (*Anguilla anguilla*)

Sauerstoffbedarf Europäischer Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)		
Optimum (Adulte)	2-4 mg O ₂ /l	WOLTER et al. (2003)
kritischer Bereich (Adulte)	0,4-0,8 mg O ₂ /l	
Optimum (Adulte)	1,2-3 mg O ₂ /l	MÖLLER & SCHOLZ (1991)
kritischer Bereich (Adulte)	2,9 mg O ₂ /l	SCHÄPERCLAUS (1990)
mind. Sauerstoffkonzentration	4 mg /l	COLAS (1988)

II. Sauerstoffmesssystem

II.1. Einleitung

Sedimente, die einen hohen Anteil an organischem Material aufweisen, sind stark sauerstoffzehrend. Der mikrobielle Abbau dieser Stoffe führt zu einer Sauerstoffzehrung innerhalb der geringen Wasserphase (< 10 ml / 3 g Sediment) des Fischei-Sedimentkontakttests. Durch eine Sauerstoffunterversorgung der Fischembryonen kann aufgrund von einer verzögerten Embryonalentwicklung keine verbindlichen Aussagen über die Toxizität eines Sedimentes getroffen werden. Ziel ist es, Messsysteme auf dem Markt zu finden und ein geeignetes System auszuwählen, mit dem das Messen der Sauerstoffkonzentration in kleinen Volumina möglich ist. Für den zukünftigen Routinebetrieb sind Kriterien Handhabung & Laborroutine, Ansprechzeit der Sonde, Messgenauigkeit, Messstabilität, sowie die Kosten von hoher Bedeutung. Hierzu werden mehrere Versuche zur Eignung der Sonden durchgeführt. Es wird, ein geeignetes Mikrosondensystem ausgewählt und dieses schließlich im Routinebetrieb etabliert.

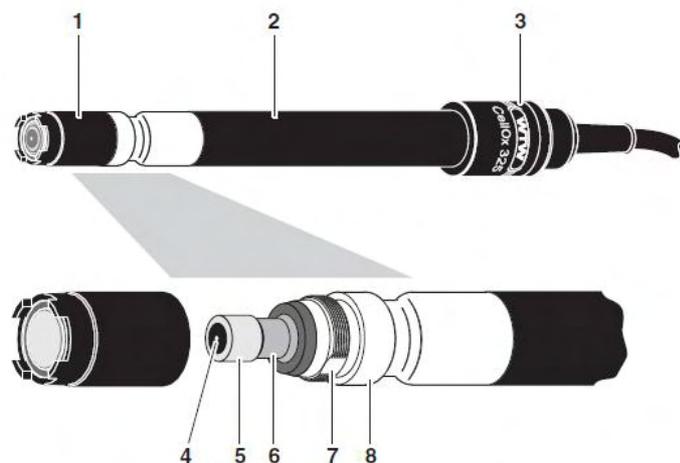
II.2. Theoretische Grundlagen für Sauerstoffmesssysteme

Nachfolgend werden zwei verschiedene Sauerstoffmesssysteme mit ihrem Aufbau, sowie Vor- und Nachteile beschrieben.

II.2.1. Clark-Sonde

II.2.1.1. Aufbau

Die vom amerikanischen Biochemiker Leland C. Clark 1954 entwickelte "Clark-Elektrode" besteht aus wenigen Hauptbestandteilen (Abbildung II.1). Zwei Elektroden stehen durch eine Elektrolytlösung (z.B. KCl) leitend in Verbindung. Verwendete Materialien sind Platin, Gold, Silber und Blei. Für die Kathode kommen Platin oder Gold zum Einsatz. Für die Anode finden Silber oder Blei Verwendung. Kombinationen wie Platin-Silber, Gold-Silber, oder Gold-Blei sind möglich (CLARK & WOLF et al. 1953). Bei der Kombination von Platin-Silber liegt an der Kathode eine Polarisationsspannung von -0,8 V gegen die Silber Anode an. Der von der Firma WTW (Weilheim, Deutschland) verkaufte CelloX 325 Sensor arbeitet mit einer Gold-Kathode und Blei-Anode. Diese Kombination benötigt keine Polarisation. Zusätzlich besitzt der CelloX 325 ein Temperaturmessfühler und eine Hilfselektrode (WTW CELLOX 325 OPERATING MANUAL).



1	Membrankopf WP 90 (mit Elektrolytlösung gefüllt)
2	Schaft
3	Abschlusskopf
4	Gold-Arbeitselektrode (Kathode)
5	Isolator
6	Blei-Gegenelektrode (Anode)
7	Entlüftungsfläche
8	Temperaturmessfühler und Hilfselektrode

Abbildung II.1: Aufbau der WTW CelloX 325 Sauerstoffsonde
WTW CELLOX 325 OPERATING MANUAL

Die Firma UniSense (Aarhus N, Dänemark) verwendet für Ihre Mikrosensoren (Abbildung II.2) eine Gold-Silber Kombination der Elektroden (UNISENSE O₂ MIKROSENSOR 2013). Kathode und Anode sind gegeneinander polarisiert. Es wurde aufgrund der kompakten Bauweise auf einen Temperaturmessfühler verzichtet. Dieser ist separat erhältlich.

Die Elektroden sind durch eine O₂-permeable Teflon-Membran vom zu messenden Medium getrennt. Sie schützt vor Ausfließen des Elektrolyten und vor der Verunreinigung der Elektroden.

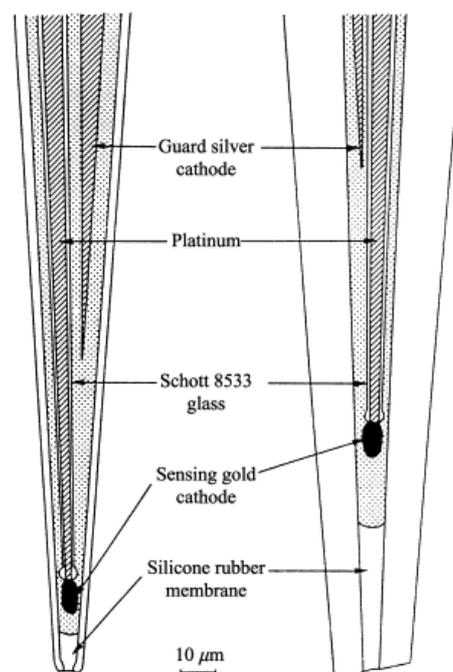
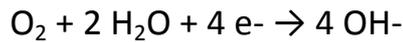


Abbildung II.2: Aufbau eines Mikrosensors
REVSBECH (1989)

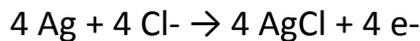
II.2.1.2. Messprinzip

Am häufigsten wird bei elektrochemischer Bestimmung der Sauerstoffkonzentration das amperometrische Messverfahren angewandt (Severinghaus & Astrup 1986). Gemessen wird der Strom, der bei der Reduktion des Sauerstoffs an der Kathode entsteht. Sauerstoff dringt aufgrund seines Partialdruckes durch die O₂-permeable Teflon-Membran ins Messsystem ein und reagiert dort mit Wasser zu Hydroxidionen. Die Kathode stellt die benötigten Elektronen zur Verfügung (Formel 1). An der Anode wird zum Beispiel Silber zu Silberionen oxidiert. Mit dem im Elektrolyten enthaltenen Chlorid bildet sich das schwerlösliche Silberchlorid (AgCl) und lagert sich an die Anode

an (Formel 2). Um den Stromfluss des Messsystems nicht zu unterbrechen, muss das AgCl regelmäßig von der Anode entfernt werden. Der Diffusionsstrom ist direkt proportional zum im Wasser herrschenden Partialdruck vom Sauerstoff und gibt somit die Konzentration des Sauerstoffs an.



Formel 1: Reduktion an der Kathode; Blohm, W. (2013): Hochschule Angewandter Wissenschaft, Deutschland



Formel 2: Oxidation an der Anode; SPORS, J. (2001)

II.2.1.3. Vor-/Nachteile

Ein wesentlicher Vorteil der Clark-Sonde ist das empfindliche Messprinzip. Kleinste Ströme und somit Sauerstoffkonzentrationen bis in den ppb-Bereich werden erfasst. Das von der Firma UniSens verbaute Pico-Ammeter bietet einen weiteren Vorteil. Die kleinen Ströme werden sofort als elektrisches Messsignal ausgegeben und stehen so dem Nutzer für weitere Auswertungen zu Verfügung (UNISENSE O₂ MIKROSENSOR 2013). Hohe Empfindlichkeiten werden durch immer kleinere Bauteile und bessere Materialien ermöglicht. Diese haben den Nachteil, dass störende Querempfindlichkeiten, verursacht von anderen durch die Membran dringenden Gasen (N₂, NH₃, CO₂ und H₂S), einen größeren Fehler ausmachen und die Elektroden schneller altern. Aus dem Grund muss die Sonde vor jedem Gebrauch kalibriert werden. In der Laborroutine macht das einen nicht zu vernachlässigenden Zeitfaktor aus. Während der Messung wird Sauerstoff an der Kathode reduziert und schließlich an der Anode „verbraucht“. Die Messung wird beeinflusst und muss kontinuierlich mit dem zu messenden Medium umspült werden. Anwendungstechnische Nachteile, wie die hier erwähnten, können durch ein 3-Elektrodensystem weitgehend behoben werden. Eine zusätzliche Hilfselektrode verhindert die Anlagerung von AgCl an der Anode. Die Sonde altert langsamer, ein Driften der Messwerte wird auf ein Minimum reduziert und eine mögliche Selbstüberwachung des Sensors gibt Auskunft über Fehlfunktionen bei Elektrolytverlust. Zudem wird dadurch eine schnelle Ein-„Punkt“-Kalibrierung ermöglicht.

II.2.2. LDO-Sonden

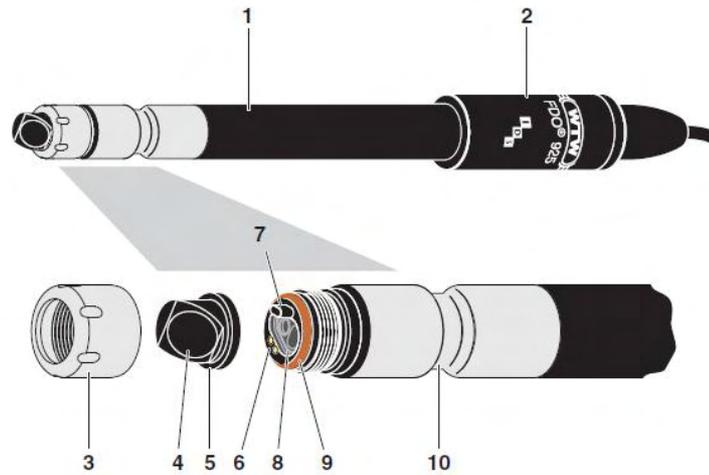
II.2.2.1. Aufbau

Alternativ zu der elektrochemischen Bestimmung der Sauerstoffkonzentration, nach Clark, steht ein optisches Verfahren zur Verfügung. Hans Kautsky beschrieb 1939 als einer der Ersten das Phänomen der Lumineszenzauslöschung durch Sauerstoff (KAUTSKY 1939). Im Laufe der Jahre wurden die ersten Sonden gebaut. Heute bestehen diese lediglich aus drei Hauptkomponenten.

Ein Luminophor (Funktionsweise siehe Abbildung II.5) aufgebracht auf einem Träger, einer optischen Einheit mit verschiedenen LEDs und einer Fotodiode. Zusätzlich gehört eine elektronische Auswerteeinheit dazu. Der Luminophor bildet die Kontaktfläche zwischen dem Sensorkörper und dem zu messenden Medium.

Lumineszenz Dissolved Oxygen (LDO) Sensoren werden von verschiedenen Firmen angeboten. Die größten Unterschiede ergeben sich bei der Konstruktion der Optik und des Luminophors (Abbildung II.3). Die Firma WTW (Weilheim, Deutschland) nennt ihren Sensor FDO (Fluoreszenz Dissolved Oxygen). Die Intensität der Lumineszenzstrahlung ist bei geeigneter Wahl von Luminophor und Wellenlänge des anregenden Lichtes von der Sauerstoffkonzentration abhängig.

Theoretische Grundlagen für Sauerstoffmesssysteme

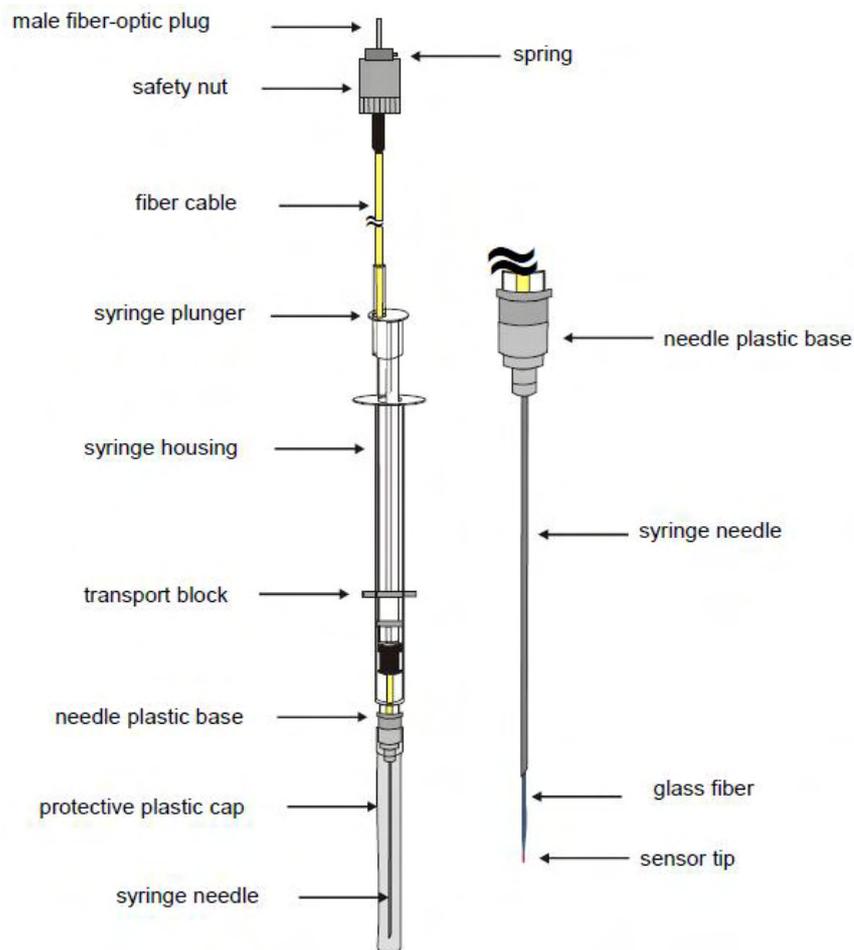


1	Schaft
2	Abschlusskopf
3	Fixierring
4	Sensormembran
5	Sensorkappe SC-FDO® 925 mit Speicherchip
6	Vergoldete Kontakte für Speicherchip der Sensorkappe
7	Arretierung
8	Messfenster
9	O-Ring
10	Thermistorgehäuse mit Temperaturmessfühler

Abbildung II.3: Aufbau der WTW FDO 925 Sauerstoffsonde WTW (2010)

Firmen wie Precision Sensing (Regensburg, Deutschland) haben sich auf den Bau von Mikrosensoren spezialisiert. Die LEDs und die Auswerteeinheit sind räumlich vom Luminophor getrennt und stehen durch eine ca. 2,5 Meter lange Lichtleitfaser in Verbindung. Entwickelt um die Blutsauerstoffkonzentration zu messen, ist der Sensor in einer Nadel (Needle-Sensor) untergebracht und hat einen Durchmesser von 140 µm (PRESENS MICROX TX3 INSTRUCTION MANUAL 2006) (Abbildung II.4). Die Firma WTW hat den Temperaturmessfühler mit im Sensor integriert. Für den Mikrosensor Microx TX3 ist dieser separat erhältlich.

Theoretische Grundlagen für Sauerstoffmesssysteme



**Abbildung II.4: Aufbau des PreSens Microx TX3 Needle-Sensors, Sensorgröße: 140 µm
PRESENS (2006)**

II.2.2.2. Messprinzip

Das Prinzip basiert auf der Photolumineszenz. Zur Messung sendet die Mess-LED ein Lichtimpuls aus, der auf den Luminophor trifft. Diese eintreffende Energie lässt Elektronen des Luminophors auf ein höheres Energieniveau gelangen. Beim Verlassen dieses Niveaus (innerhalb von wenigen µs) wird die frei werdende Energie als Licht, von einer etwas größeren Wellenlänge, wieder abgegeben (Abbildung II.5.1). Das Signal trifft auf eine Fotodiode und erzeugt dort das Ausgangssignal.

Vorhandene Sauerstoffmoleküle sind in der Lage die Energie der Elektronen des höheren Energieniveaus aufzunehmen. Die Elektronen fallen ohne Lichtemission zurück auf das Grundniveau (Abbildung II.5.2). Mit steigender Sauerstoffkonzentration führen Kollisionen im Luminophor dazu, dass die Elektronen das höhere Energieniveau schneller wieder verlassen. Diese beiden Punkte machen das Quenching (Löschung) aus (KAUTSKY 1939).

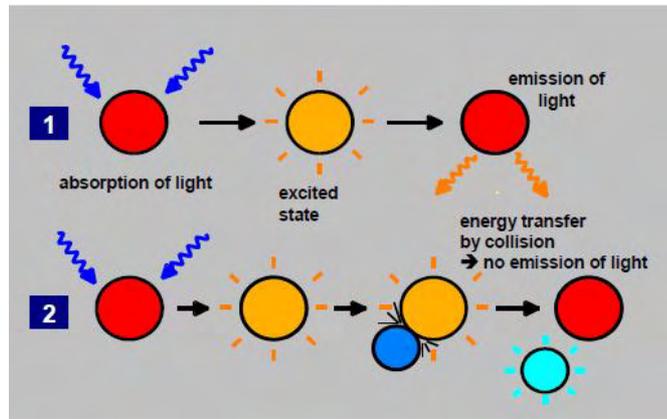


Abbildung II.5: Prinzip der dynamischen Lumineszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff.
PRESENS (2006)

Legende: **1:** Lumineszenz Prozess in Abwesenheit von Sauerstoff, **2:** Deaktivierung des Lumineszenz Indikatormolekül durch Anwesenheit von Sauerstoff

II.2.2.3. Vor- und Nachteile

Das Prinzip der Lumineszenzauslöschung bietet gegenüber dem klassischen elektrochemischen Verfahren der Clark-Sonden mehrere Vorteile. Die kalibrierungsfreie Messung und auch der entfallende Membran- und Elektrolytwechsel erleichtern das Arbeiten in einem Routinebetrieb. Desweiteren verbraucht das LDO-Verfahren kein Sauerstoff. Eine kontinuierliche Anströmung des Sensors mit dem zu messenden Medium ist nicht nötig. Das für den Luminophor verwendete Material ist gegen viele Chemikalien beständig und altert daher nur sehr langsam. Gase wie Schwefelwasserstoff (H_2S) beschädigen den Luminophor nicht. Ein Quenching durch Kohlenstoffdioxid (CO_2) wird nicht hervorgerufen. (HÄCK OHNE JAHR)

II.3. Material und Methoden

II.3.1. Die Messsysteme

Zwei Firmen stellten ihre Systeme für einen Vergleich zur Verfügung. Von der Firma UniSense (Aarhus N, Dänemark) wurde eine Clark Mikrosonde geliefert. Die Firma PreSens (Regensburg, Deutschland) lieferte eine LDO Mikrosonde. Zusätzlich kamen eine Clark Sonde und eine FDO Sonde von der Firma WTW (Weilheim, Deutschland) für einen Vergleichstest zum Einsatz.

II.3.1.1. UniSense

Das zum Messen der Sauerstoffkonzentration entwickelte Mikrosystem der Firma UniSense basiert auf dem Prinzip der amperometrischen Messung mit der Clark-Sonde. Geliefert wurden das UniSense Oxy-Meter, ein sauersensitiven Mikrosensor (Abbildung II.6), ein Netzadapter, sowie ein USB Kabel zur Datenübertragung zwischen Messgerät und Computer. Mit dem mitgelieferten Programm "Sensor Trace Basic" kann eine Kalibrierung erfolgen, Messdaten gespeichert und graphisch dargestellt werden. Die Clark-Sonde besteht aus Glas, welches an der Spitze zu einem Durchmesser von 400 - 600 μm zusammen läuft. Die Sauerstoffpermeable Membran hat einen Durchmesser von 5 μm . Gefüllt ist die Sonde mit einem Elektrolyten und den drei verschiedenen Elektroden, die zur Sauerstoffmessung notwendig sind. Eine Temperaturkompensation findet nicht statt.



Abbildung II.6 UniSense OX-500 Sonde
UNISENSE.COM (2012)

II.3.1.2. PreSens

Die PreSens Sauerstoffmessung, mittels Mikrosensor, basiert auf der Messmethode der Photolumineszenz. Zur Verfügung standen das Microx TX 3, ein sauerstoffsensitiver Mikrosensor, ein Temperaturfühler, ein Netzadapter, sowie ein USB Kabel zur Datenübertragung zwischen Computer und Messgerät. Der Mikrosensor besteht aus einer 2,5 m langer Quarz-Glasfaser, die mit der Auswerteeinheit verbunden ist. Der sich an der Spitze befindende Luminophor hat einen Durchmesser von 140 μm . Dieser

ist zum Schutz vor äußeren Einwirkungen in eine Nadel eingebaut. Zur Messung wird er hervorgeschoben. Das Microx TX 3 liefert über eine USB-Schnittstelle die Daten zum Computer wo diese im firmeneigenen Programm grafisch dargestellt und weiterverarbeitet werden können. Weitere technische Daten zur Sauerstoff- und Temperaturmessung können aus Tabelle II.7 und Tabelle II.8 auf Seite 44 entnommen werden.

II.3.1.3. WTW Clark

Das zum Messen der Sauerstoffkonzentration entwickelte Messsystem der Firma WTW basiert ebenfalls auf der amperometrischen Messung mit einer Clark-Sonde. In dem robusten Gehäuse des Oxi 330 findet die Messtechnik, ein Akku und der CelloX 325 Clark-Sensor zum Transport Platz. Der Sensor ist über ein ca. 1,5 m langes Kabel mit dem Messgerät verbunden. Dieses Gerät ist für den Labor- sowie Feldeinsatz geeignet. Messdaten der Sauerstoff- und Temperaturmessung werden direkt am Messgerät angezeigt. Auch die Kalibrierung wird mit Hilfe der Software am Gerät durchgeführt.

II.3.1.4. WTW FDO

Die WTW Multi 3430 Messeinheit besitzt drei Messkanäle. Diese sind frei kombinierbar für gleiche oder verschiedene Parameter. Für die Sauerstoff- und Temperaturmessung kam der FDO 925 IDS zum Einsatz. Dieser Sensor beruht auf dem optischen Messverfahren zur Sauerstoffmessung. Auch dieses Messgerät besteht aus einem robusten Gehäuse für die Messtechnik und den Akku. Messwerte werden auf einem Display angezeigt und auch die Kalibrierung wird am Gerät selbst vorgenommen. In Tabelle II.1 sind die Sensorspezifischen technischen Daten, Messbereich und Abweichung aufgeführt.

Tabelle II.1 Messbereich und Abweichung des FOD 925 IDS

Gelöster Sauerstoff (optisch) FDO 925 IDS	
Konzentration	0,00 - 20,00 mg/l \pm 0,5 % v. Mw.
Sättigung	0,0 - 200,0 % \pm 0,5 % v. Mw.
Partialdruck	0 - 400,0 hPa \pm 0,5 % v. Mw.
Temperatur	0,0 - 50,0 °C \pm 0,2 °C

II.3.2. Versuchsvoraussetzungen

Um die Messsysteme miteinander vergleichen zu können, müssen die Versuchsbedingungen standardisiert werden. Hierzu zählt in erster Linie das Verdünnungswasser, dessen Temperatur und zusätzliche äußere Einflüsse, die auf das Messsystem einwirken.

II.3.2.1. Verdünnungswasser

Für den Fischei-Sedimentkontakttest wurde ein Standard Wasser nach DIN EN ISO 7346-3 (DIN 1998) verwendet (Tabelle II.2).

Tabelle II.2 Zusammensetzung des Verdünnungswassers nach DIN EN ISO 7346-3 (1998)

Verdünnungswasser nach DIN EN ISO 7346-3		
294,0 mg/l	Calciumchlorid	CaCl ₂ x 2H ₂ O
123,3 mg/l	Magnesiumsulfat	MgSO ₄ x 7H ₂ O
63,0 mg/l	Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃
5,5 mg/l	Kaliumchlorid	KCl

Das Verdünnungswasser wird mit deionisiertem Wasser hergestellt und ist vor der Verwendung bis zur Sauerstoffsättigungskonzentration von ca. 8 mg/l bei 26 °C ± 1 °C zu belüften.

II.3.2.2. Temperatur

Die Temperatur beeinflusst maßgeblich die gelöste Sauerstoffkonzentration im Wasser. Bei einer Raumtemperatur von 20 °C stellt sich mit 9,08 mg/l Sauerstoff eine weitaus höhere Konzentration ein, als bei der Messung während des Fischei-Sedimentkontakttest bei 26 °C mit 8,11 mg/l. Für die folgenden Versuche finden die Messungen in einem klimatisierten Laborraum statt. Die Temperatur betrug hier 20 °C ± 1 °C. Eine Tabelle der Sauerstoffsättigung von Wasser bei Normdruck ist in Anhang I angefügt.

II.3.2.3. Äußere Einflüsse

Zusätzlich galt es auf äußere Einflüsse zu achten. Direkte Sonneneinstrahlung, die die Proben temperatur beeinflussen könnte, war aufgrund der Laborausrichtung in Nord-West Richtung nicht gegeben. Desweiteren wurden der Messzylinder und die

Kristallisierschalen mit Parafilm abgeklebt, um eine Verdunstung von Verdünnungswasser oder die Bildung von Algen zu vermeiden.

II.3.3. Versuchsaufbau

Der jeweilige Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass die in Tabelle II.3 aufgeführten Kriterien der Messsysteme untersucht und miteinander verglichen werden konnten. Hierbei wurden auch die Informationen der Hersteller, soweit verfügbar hinzugezogen.

Tabelle II.3 Zu vergleichende Kriterien der Messsysteme.

Kriterien der Messsysteme				
Firma Messsystem Sensor	PreSens Microx TX 3	UniSense O ₂ OX-500	WTW Oxi 330 CellOx 325	WTW Multi 3430 FDO 925 IDS
Handhabung & Laborroutine	X	X	X	X
Ansprechzeit	X	(X)	-	-
Messgenauigkeit	(X)	(X)	-	-
Messstabilität	X	X	-	-
Kosten	X	X	-	-

Legende: X = praktisch; (X) = theoretisch

Zum Einsatz kamen ein 1000 ml Becherglas und eine 20 ml Kristallisierschale (Abbildung II.7 und Abbildung II.8). Im Becherglas wurde die Sauerstoffkonzentration in einer Tiefe von 10 cm gemessen. In der Kristallisierschale wird je nach Versuch in der Diffusionszone, Übergangszone, oder Zehrungszone (Abbildung III.1 Seite 58) gemessen.

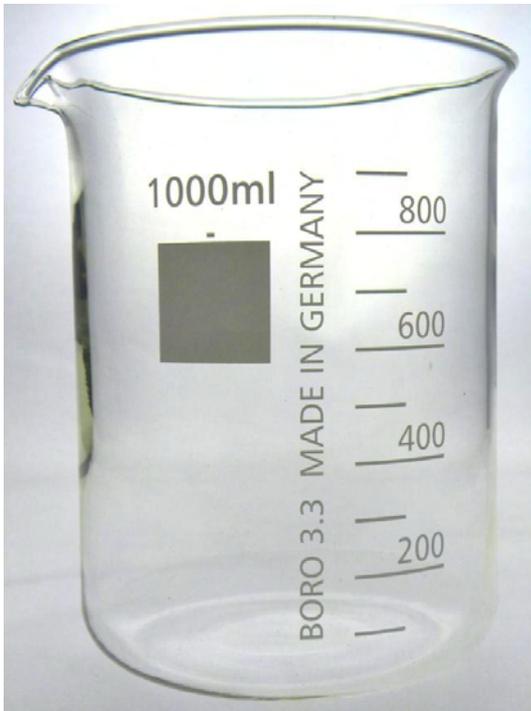


Abbildung II.7 1000 ml Becherglas
WALDEHOE.AT (2013)



Abbildung II.8 Versuchsaufbau 20 ml
Kristallisierschale

Die Sauerstoffsonden wurden mit Hilfe eines Stativs und einem Reagenzglashalter gehalten (Abbildung II.8)

Die Temperatursonde des PreSens Microx TX 3 steckt in einer, unten auf den richtigen Durchmesser gekürzten, fünf ml Pipettenspitze. Der Temperatursensor konnte so zielgenau herausgeschoben werden. Durch die Verstellmöglichkeiten am Stativ und an den Sonden selbst, war es möglich punktgenaue Messungen durchzuführen.

II.3.3.1. Handhabung und Laborroutine

Um später mit dem Messsystem gut arbeiten zu können sollten Kriterien wie **1. Handhabung**, **2. Bedienung**, **3. Pflege- und Reinigungsarbeiten**, sowie **4. Dokumentation und Service** gut sein. Hierbei ist es wichtig das sich die Sonde gut handhaben lässt, die Bedienung am Messgerät selbst und am Computer Programm anwenderfreundlich gestaltet ist, die Kalibrierung und ein Sondenwechsel leicht durchzuführen sind, sowie auch die Dokumentation im Handbuch übersichtlich gestaltet und der Service der Firma gut ist.

Hierfür wurden alle vier vorhandenen Messsysteme (Tabelle II.4) getestet und die Handhabung der Sonden für spätere Versuche geübt. Die Messsysteme sind in Kapitel II.3.1 auf Seite 34 beschrieben.

Tabelle II.4 Auswahl der Messsysteme an denen die Handhabung und die Laborroutine untersucht wurden.

Auswahl der Messsysteme		
Firma	Messsystem	Messverfahren
WTW	Oxi 330 CellOx 325	Clark
WTW	Multi 3430 FDO 925 IDS	FDO
PreSens	Microx TX 3	LDO
UniSense	OX 500	Clark

Für die Handhabung wurde im Becherglas sowie in der Kristallisierschale gemessen (Abbildung II.7 und Abbildung II.8). Die Bedienung konnte während der Messung zur Handhabung getestet werden. Auch die Pflege- und Reinigungsarbeiten wurden für die genannte Messung erprobt. Vor der Messung wurden die Messsysteme kalibriert und anschließend eine Reinigung durchgeführt. Angesprochene Arbeiten wurden mit den Hilfestellungen und Beschreibungen aus den Handbüchern der Hersteller durchgeführt. Eine gute Dokumentation gehört unter anderem zu einem guten Service. Desweiteren bestand zu der Firma PreSens und UniSense Mail- und Telefonkontakt. Zu allen vier genannten Kriterien wurden Mitarbeiter befragt, um deren Erfahrungen mit dem Umgang der beiden WTW Messsysteme einzuschätzen.

II.3.3.2. Ansprechzeit

Die Ansprechzeit (englisch: response time) ist die Zeit, die nach Beginn einer sprunghaften Änderung der zu messenden Größe, bis zum Erreichen des Endwertes vergeht (SCHUBERT 2012). Hersteller geben im Allgemeinen die t_{90} -Werte an. Sie beschreiben die Ansprechzeit bis 90 % des Endwertes erreicht wurde. Diese sind in den technischen Datenblättern (PRESENS 2006, UNISENSE.COM 2013) einsehbar. Um die Herstellerangabe der Sonde TX 3 der Firma PreSens zu überprüfen, wurde diese von einer 100%igen Kalibrierlösung in eine 0 % Lösung getaucht. Dies simulierte eine sprunghafte Änderung der Sauerstoffkonzentration. Die Messung dauerte 30 Sekunden und wurde als Grafik (Abbildung II.9) dargestellt.

II.3.3.3. Messgenauigkeit

Als Messgenauigkeit wird die Standardabweichung eines aus Messungen gewonnenen Wertes vom wahren Wert der Messgröße genannt (DIN 1995). Sie wird ebenfalls vom Hersteller, unter den Sensor spezifischen technischen Daten, veröffentlicht und wird dort Messunsicherheit genannt. Für diesen Versuch wurden lediglich die technischen Daten der TX 3 und OX 500 verglichen und keine speziellen Versuche durchgeführt.

II.3.3.4. Messstabilität

Die Messstabilität ist gewährleistet, wenn der zu messende Wert über längere Zeit innerhalb der angegebenen Messgenauigkeit liegt. Die Durchführung von zwei Versuchen fand in einer 20 ml Kristallisierschale statt. Um die Messwerte miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst mit den Messsystemen von UniSense und PreSens parallel gemessen. Im zweiten Versuch sollte untersucht werden welchen Einfluss die Temperaturkompensation des PreSens Messsystems auf den Messwertverlauf hat. In einem Wasserbad wurde die Temperatur, während zwei Stunden, von 19,8 °C auf 20,1 °C erhöht. Schon eine geringe Temperaturerhöhung lässt den Sauerstoff aus der Probe ausgasen. Die maximal gelöste Konzentration an Sauerstoff nimmt ab (Tabelle II.5 und Anhang). Die automatische Messung fand sekundlich statt und wurde über eine Zeit von ca. 111 Minuten durchgeführt.

Tabelle II.5 Temperaturabhängigkeit der maximalen Sauerstoffsättigung im Wasser, bei 1013 hPa.

Temperatur	Sauerstoffkonzentration
19,8 °C	9,11 mg/l
19,9 °C	9,09 mg/l
20,0 °C	9,08 mg/l
20,1 °C	9,06 mg/l

II.3.3.5. Kostenbilanz

Es werden alle Kosten aus dem Angebot der Firmen UniSense sowie PreSens aufgeführt. Desweiteren sind für den jährlichen Betrieb der Messsysteme Kosten zur Erneuerung der Messsonden und für den Verbrauch an Kalibrierlösung aufzukommen

II.4. Ergebnisse und Auswertungen

II.4.1. Handhabung und Laborroutine

Die Handhabung (1) der beiden WTW Sonden war einwandfrei. Die Bauform der FDO- und Clark-Sonde ist groß genug um gut in der Hand zu liegen. Auch der Stativhalter umfasste die Sonden sicher. Das Messen in der zu einem Fünftel gefüllten 20 ml Kristallisierschale war nicht möglich. Die Needle-Sensor (Nadel-Sensor) Bauform der Microx TX 3 ließ sich schlecht anfassen und benötigte zur sicheren Bedienung ein Stativ. Die Sensorspitze ließ sich gut aus der Nadel hervorschieben und konnte so präzise in unterschiedlichen Höhen des Probenwassers positioniert werden. Der mitgelieferte Thermo-Sensor wurde entweder in das Becherglas gehängt, oder bei Messungen in der Kristallisierschale aus der Pipettenspitze hervorgeschoben. Die Firma UniSense hat eine, zum Vergleich der TX 3, größere Bauform gewählt und liegt besser in der Hand. Mit der Benutzung eines Stativs konnte auch die Sensorspitze gut im Probenwasser bewegt werden. Die Präzision der TX 3 wurde nicht erreicht. Mit beiden Mikro-Sonden war es möglich Messungen in der Kristallisierschale durchzuführen.

Die Bedienung (2) der Beiden Messgeräte (Oxi 330 und Multi 3430) der Firma WTW war durch die am Gerät vorhandenen Tasten sehr einfach. Befehle wurden direkt umgesetzt und am Display angezeigt. PreSens und UniSense lieferten firmeneigene Programme mit denen die Messwerte angezeigt und eine Kalibrierung vorgenommen werden kann. Die Geräte besitzen kein Display. Das Programm von der Firma PreSens ist anwenderfreundlicher als das der Firma UniSense. Es konnten mehr Einstellungen getroffen werden und die Anzeige der Messwerte war übersichtlicher.

Pflege- und Reinigungsarbeiten (3) sind stark von der Bauform des jeweiligen Messsystems abhängig. Defekte Sensorspitzen der WTW Sonden ließen sich einfach auswechseln oder reinigen. Sie sind robuster als die Mikro-Sonden. Die Kalibrierung der beiden Clark-Sonden (Oxi 330, WTW und OX 500, UniSense) muss vor jedem Versuch, spätestens an jedem neuen Versuchstag durchgeführt werden. Hingegen die FDO und LDO Sonden nicht kalibriert werden müssen. Dies ist für die Laborroutine eine

große Zeitersparnis. Reinigungsarbeiten an der TX 3 waren äußerst vorsichtig durchzuführen, da der aus Glasfaser bestehende Sensor schnell bricht.

Die Dokumentation und der Service (4) waren bis auf das Handbuch der Firma UniSense für die OX 500 Messsonde sehr übersichtlich, enthielten verständliche Arbeitsanweisungen und Hilfestellungen. Auch die Internet Auftritte der anderen Anbieter (WTW, PreSens) waren sehr informativ gestaltet. Technische Daten waren meist schnell gefunden. Zu der Firma PreSens bestand ein kundenfreundlicher Mail- und Telefonkontakt. Die Kundenbetreuung der Firma UniSense war ebenfalls gut. Technische Daten der Messsonde konnten nicht gefunden werden.

II.4.2. Ansprechzeit

Beide Gerätehersteller geben an, dass die verwendeten Sonden in weniger als 15 Sekunden 90 % des Endwertes erreicht haben (Tabelle II.6).

Tabelle II.6 Ansprechzeiten (t_{90}) der Messsysteme aus den technischen Datenblättern der Hersteller.

Ansprechzeit (t_{90}) der Messsysteme	
PreSens Microx TX 3, 140 μm	< 15 s
UniSense OX 500, 500 μm	< 15 s

Optional bietet UniSense für einen Aufpreis von 15 % eine Clark Sonde mit einer Ansprechzeit von kleiner als drei Sekunden an. Die Firma PreSens stellt eine Sonde mit sich noch weiter verjüngenden (tapered sensor tip) Sensoren (Durchmesser von ca. 50 μm) her. Sie sollen bereits nach weniger als einer Sekunde den t_{90} -Wert erreicht haben (PRESENS 2006). Die Messreihe in Abbildung II.9 wurde mit dem optischen Messsystem von der Firma PreSens durchgeführt. Zum Einsatz kam die Messsonde TX 3.

Ergebnisse und Auswertungen

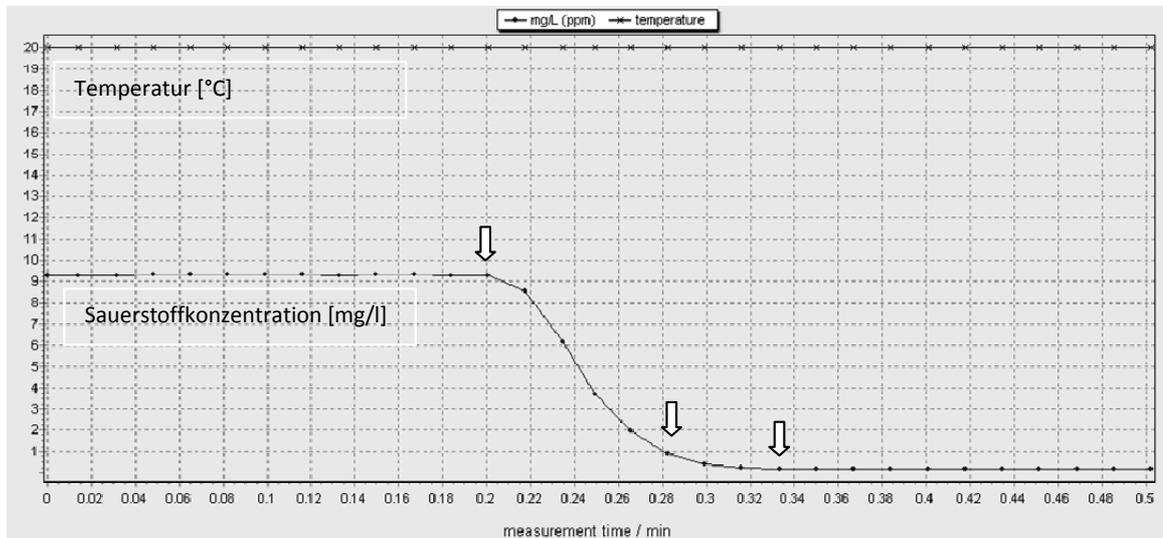


Abbildung II.9 Ansprechzeit (t_{90}) des optischen Messsystems PreSens Microx TX 3

In Abbildung II.9 bei Sekunde 12 (das entspricht dezimal 0,2 Minuten auf der X-Achse) fand die sprunghafte Änderung der Sauerstoffkonzentration statt. Der t_{90} -Wert wurde fünf Sekunden später bei Sekunde 17 (= 0,283 Minuten) erreicht. Sie lag damit unterhalb der vom Hersteller angegebenen 15 Sekunden. Die 100%-Änderung des Sauerstoffmesswertes wurde nach ca. acht Sekunden, bei Sekunde 20 (= 0,333 Minuten) erreicht.

II.4.3. Messgenauigkeit

In Tabelle II.7 und Tabelle II.8 sind die sensorspezifischen technischen Daten der Sauerstoff- und Temperaturmessung, wie Messbereich, Auflösung und Genauigkeit, aus dem Datenblatt der PreSens Microx TX 3 aufgeführt.

Ergebnisse und Auswertungen

Tabelle II.7 Technische Daten der Sauerstoffmessung PreSens Microx TX 3

Sauerstoffmessung		
Messbereich	0 - 250 %	Luftsättigung
	0-22,5	mg/l (ppm)
Auflösung	1 ± 0.05 %	Luftsättigung
	0,09 ± 0,005	mg/l (ppm)
	30 ± 0.13 %	Luftsättigung
	2,72 ± 0,01	mg/l (ppm)
	100 ± 0.44 %	Luftsättigung
	9,06 ± 0,04	mg/l (ppm)
	250 ± 1.8 %	Luftsättigung
	22,65 ± 0,17	mg/l (ppm)
Genauigkeit	± 1 % bei 100 %	Luftsättigung
	± 0.15 % bei 1 %	Luftsättigung

Tabelle II.8 Technische Daten der Temperaturmessung PreSens Microx TX 3

Temperaturmessung	
Messbereich	0 - 50 °C
Auflösung	± 0.5 °C
Genauigkeit	± 1 °C

Von der Firma UniSense sind keine sensorspezifischen technischen Daten der Sauerstoff- und Temperaturmessung für das Clark-Messsystem mit der Ox 500 Sonde veröffentlicht.

II.4.4. Messstabilität

Die Messwerte des optischen Messsystems der Firma PreSens waren im ersten Drittel des Versuchszeitraums, von 40 Minuten, stabil und zeigten ein zu 100 % gesättigtes Verdünnungswasser an (Abbildung II.10, durchgezogene Linie). Die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen wichen um ca. ± 0,01 mg/l ab. Sie liegen damit innerhalb der vom Hersteller angegebenen Toleranz von ± 0,04 mg/l. Da es zu Störungen der Sonden untereinander kam, wurde die Messung alleinig mit der UniSense Ox 500 fort

Ergebnisse und Auswertungen

gesetzt. Die Abbildung II.10 zeigt einen nicht stabilen Verlauf der Messwerte an. Es sind Sprungstellen, Plateaus und ein kontinuierlicher Anstieg der Sauerstoffkonzentration zu erkennen (Tabelle II.9).

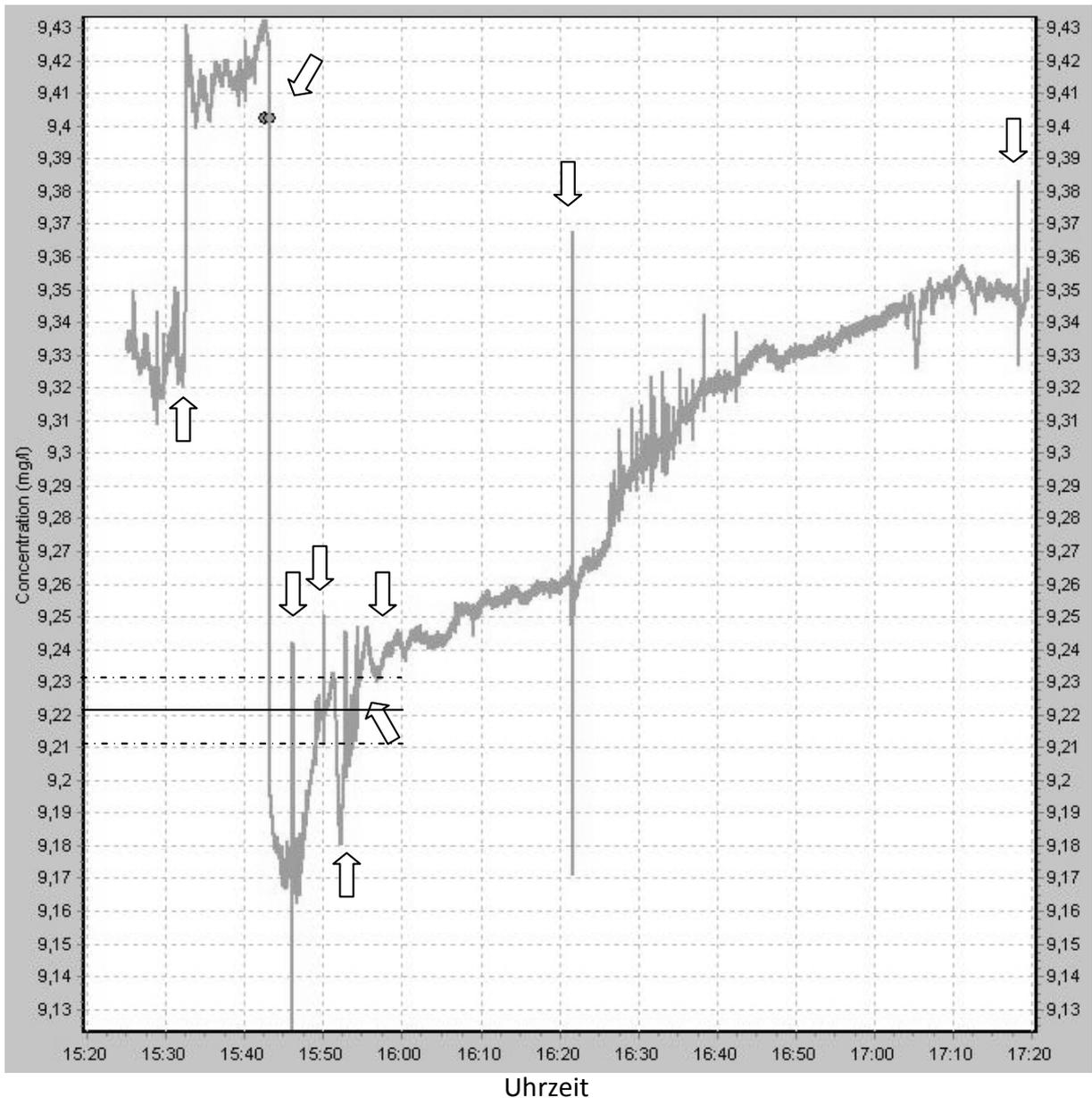


Abbildung II.10 Über zwei Stunden aufgezeichnete Messwerte der UniSense OX 500

Erläuterungen zur Abbildung II.10:

Die durchgezogene Linie zeigt den Sollwert der Sauerstoffkonzentration des zu 100 % gesättigten Verdünnungswassers bei 19,2 °C an. Die beiden gestrichelten Linien bilden den Bereich ab, in dem die PreSens Microx TX 3 Messwerte aufgezeichnet hat.

Die Messung begann um 15:25 Uhr und endete um 17:20 Uhr.

Ergebnisse und Auswertungen

Tabelle II.9 Erläuterung des Messwertverlaufs zum Versuch der Messstabilität der UniSense Ox 500

Uhrzeit	Ereignis
15:32	Sprung der Sauerstoffkonzentration von 9,34 mg/l auf 9,43 mg/l. Ausgelöst durch die Berührung, zur Ausrichtung der Temperaturmesssonde vom PreSens Messsystems.
15:43	Angleichen des Messwertes, durch Kalibrierung des 100 % Kalibrierungswert mit der 100 % Sättigung, auf 9,22 mg/l.
15:46	Verlassen des Laborraumes. Messwertausschlag durch Öffnen und Schließen der Labortür.
15:50	Eintreten in den Laborraum.
15:53	Wiederholtes Öffnen und Schließen der Labortür.
15:54	Setzen und Aufstehen vom Laborstuhl verursachen Schwankungen des Messwertes.
15:55-16:21	Aufenthalt außerhalb des Labors.
16:21	Ruckartiges Öffnen der Labortür, zur Kontrolle der Effekte von eventuellen Druckschwankungen auf die Messung.
17:18	Öffnen der Labortür.

Der stetige Anstieg der Sauerstoffkonzentration deutet auf einen Temperaturabfall von wenigen zehntel Grad Celsius hin. Grund hierfür ist die fehlende Temperaturkompensation. Die Sauerstoffkonzentration wird, fälschlicherweise, größer dargestellt. Dieses ist auch im zweiten Test (Abbildung II.11) am Kurvenverlauf der UniSense Sonde zu sehen. Die Messung wurde automatisch mit sekundlichem Zeittakt aufgezeichnet. In Abbildung II.11 werden 6652 Messwertpaare dargestellt.

Auf der y-Achse ist die Sauerstoffkonzentration in mg/l aufgetragen. Auf der x-Achse die Zeit. Die beiden Trendlinien sind linearen Ursprungs und zeigen den durchschnittlichen Kurvenverlauf über alle Messwerte an.

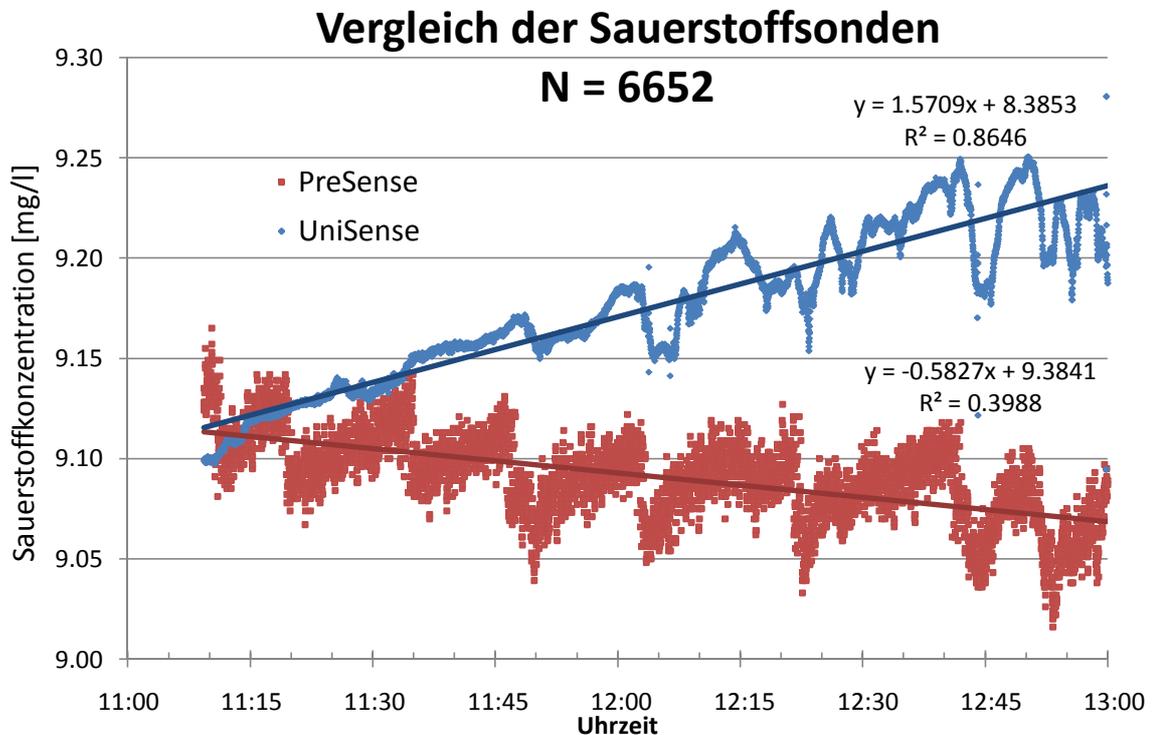


Abbildung II.11 zeitliche Drift der Sonden, bei langsamer Änderung der Temperatur

Der stetige Anstieg der Sauerstoffkonzentration deutet auf einen Temperaturabfall von wenigen zehntel Grad Celsius hin. Grund hierfür ist die fehlende Temperaturkompensation. Die Sauerstoffkonzentration wird, fälschlicher weise, größer dargestellt. Dieses ist auch im zweiten Test (Abbildung II.11) am Kurvenverlauf der UniSense Sonde zu sehen. Die Messung wurde automatisch mit sekundlichem Zeittakt aufgezeichnet. In Abbildung II.11 werden 6652 Messwertpaare dargestellt.

Auf der Y-Achse ist die Sauerstoffkonzentration in mg/l aufgetragen. Auf der X-Achse die Zeit. Die beiden Trendlinien sind linearen Ursprungs und zeigen den durchschnittlichen Kurvenverlauf über alle Messwerte an.

Die obere blaue Kurve ist die Sonde der Firma UniSense mit dem amperometrischen Sauerstoffmesssystem. Die Messgenauigkeit ist sehr gut. Es gibt wenige Ausreißer und die Messung weist nur eine schwache Streuung auf. Der Korrelationskoeffizient von 0,8646 deutet auf eine stabile Messung hin. Die untere rote Kurve ist die Sonde der Firma PreSens mit dem optischen Sauerstoffmesssystem. An den Sprüngen ist eine Messwertkorrektur durch eine Temperaturkompensation zu erkennen. Die Sauerstoffkonzentration wird bei Temperaturänderung nach unten korrigiert. Der

Ergebnisse und Auswertungen

Korrelationskoeffizient von 0.3988 weist auf eine relativ instabile Messung hin. Betrachtet man die Abweichung der Sauerstoffkonzentration zur theoretisch maximal möglichen Sauerstoffkonzentration am Ende des Versuches, liegt die Sonde der Fa. PreSens mit 0.01 mg/l perfekt im erwarteten Bereich. Hingegen die Sonde der Fa. UniSense zeigt mit 0,18 mg/l eine deutlich höhere Abweichung. Siehe Tabelle II.10.

Tabelle II.10 Abweichung zur theoretisch maximalen Sauerstoffkonzentration von nicht temperaturkompensierten und temperaturkompensierten Messsystemen

Einfluss der Temperatur auf die Sauerstoffkonzentration von nicht temperaturkompensierten und temperaturkompensierten Messsystemen				
Firma	Start Sauerstoffkonz. bei 19,8 °C [mg/l]	Ende Sauerstoffkonz. bei 20,1 °C [mg/l]	Δ Sauerstoffkonz. [mg/l]	Δ Sauerstoffkonz. zur theoretisch maximalen (9,06 mg/l) [mg/l]
PreSens	9,11	9,07	- 0,04	+ 0,01
UniSense	9,11	9,24	+ 0,13	+ 0,18

II.4.5. Kostenbilanz

Für beide Systeme fallen unterschiedliche Anschaffungs- und Betriebskosten an. Um diese vergleichen zu können, wurde ein Angebot für einen zusätzlichen Thermo-Sensor zur Temperaturkompensation bei UniSense eingeholt. Denn dieser würde in Zukunft ebenfalls zum Einsatz kommen. Hierfür ist aber ein komplett anderes System notwendig. Zur Vollständigkeit wurde es in Tabelle II.11 aufgelistet.

Tabelle II.11 Anschaffungspreis des UniSense Messsystems

Anschaffungspreis des UniSense Messsystems	
Bauteil	Preis [€]
Mikrosensor Monometer 1 Channel + Temp.	4200
Oxygen Clark Mikrosensor RD 500	520
TP 2000 Thermo Sensor	231
Verpackung und Versand	111
Summe:	5062€

Ergebnisse und Auswertungen

Desweiteren kommen jährliche Kosten, wie die Erneuerung der Sauerstoffsonde mit 520 € und der Verbrauch an Kalibrierlösung für das UniSens-System hinzu.

Tabelle II.12 Anschaffungspreis des PreSens Messsystems

Anschaffungspreis des PreSens Messsystems	
Bauteil	Preis [€]
Single Channel Transmitter	
PT 1000 Temperatursensor	6533
Micro fiber optic oxygen sensor	
Summe:	6533€

Jährliche Kosten fallen mit 190 € beim Ersetzen der Mikrosonde von PreSens an.

Ein neues Angebot der Fa. PreSens enthielt zusätzlich einen PT1000-Temperatursensor und das dazu gehörige 1-Channel Monometer (s.Tabelle II.12). Die Kosten für ein Messsystem der Firma UniSense liegen mit 5062 € um 1471 € niedriger als das Messsystem der Fa. PreSens.

II.5. Diskussion

Ziel dieses Abschnittes der Arbeit war es zwei Mikrosonden Messsysteme auf dem Markt zu finden und diese auf die Labortauglichkeit im Routinebetrieb zu testen. Hierfür kamen auch schon vorhandene Sonden für direkte Vergleiche zum Einsatz. Es wurden Handhabung und Laborroutine, sowie die technischen Eigenschaften verglichen und bewertet. Abschließend gab es eine Kostengegenüberstellung.

Erste Versuche wurden zur Handhabung und der Laborroutine durchgeführt und die Ergebnisse in Gesprächen mit Mitarbeitern diskutiert. Es bestätigte sich, dass die Handhabung mit den untereinander für den Feldeinsatz konzipierten Messgeräten der Firma WTW, aufgrund der großen Bauweise sich am besten eignen. Jedoch für den Sedimentkontakttest nicht zum Einsatz kommen können, da das Volumen des Überstandwassers zu gering für eine Messung ist (RAASCH 2011). Entgegengesetzt zu den anderen Messsystemen sind die Mikrosonden der Firmen PreSens und UniSense sehr empfindlich und benötigen für einen sicheren Halt und den Umgang mit der empfindlichen Sensorspitze ein Stativ. Die für medizinische Zwecke entwickelte PreSens LDO-Sonde lässt sich aus der Nadelbauform hervorschieben und so im Gegensatz zur UniSense Clark-Sonde präzisere Messungen am Fischei, oder über dem Sediment durchführen. Beide Sonden könnten mit einem feiner in der Höhe justierbaren Stativ gleich gut zu positionieren sein.

Die robustere Bauform der Clark-Sonde lässt sich im Gegensatz zur feinen Sensorspitze von PreSens (Glasfaser) besser pflegen und reinigen. Ein im Laborbetrieb großer zeitlicher Verlust ist die Kalibrierung der Clark-Elektrode.

Die kleine Bauform der Mikrosonden lässt sehr schnelle Ansprechzeiten beider Sonden zu. Die Entscheidung, den Versuch der Ansprechzeit mit der Microx TX 3 durchzuführen, beruhte zum einen auf der schnellen Einsatzmöglichkeit der Sonde zum anderen aufgrund einer übersichtlicheren Darstellungsform des Messwertverlaufs am Computer. Die t_{90} -Werte waren unter der vom Hersteller angegebenen Zeit. Weitere technische Daten von PreSens wie Messbereich, Auflösung und Genauigkeit konnten während allen Versuchen beobachtet und getestet werden. Alle Messungen fanden innerhalb des Messbereichs statt. Die Auflösung bei 9,06 mg/l beträgt $\pm 0,04$ mg/l (vgl. Tabelle II.7). Diese konnte bestätigt und im Versuch zur

Diskussion

Messtabilität sogar noch unterschritten werden. Sie betrug dort $\pm 0,01$ mg/l. Informationen zu technischen Daten der UniSense Messsonde konnten nicht gefunden werden. Eine Suche im Handbuch, auf der Internetseite und eine Anfrage per Mail waren erfolglos. Vergleichend kann gesagt werden, dass die Dokumentationen über die Sonde der Firma UniSense mangelhaft waren und sich somit keine Aussage über die Qualität der technischen Messeigenschaften machen lässt.

Die Firma UniSense lieferte keinen Temperatursensor für die notwendige Temperaturkompensation. Dieser kann gegen Aufpreis zusätzlich bestellt werden. In Versuchen zur Messtabilität konnte gezeigt werden, dass kleinste Temperaturänderungen Auswirkungen auf die Messwerte haben und der Messwertverlauf über die Versuchszeit einer Drift unterliegt (Abbildung II.11). Druckschwankungen und Erschütterungen haben ebenfalls Auswirkungen auf das Messsystem (Abbildung II.10). Während der zwei stündigen Versuchsdauer gab es einige dokumentierte Ausschläge des Messsignals. Mutwillige Störungen, wie das schnelle Öffnen der Labortür würden im Routinebetrieb so nicht vorkommen. In der späteren vergleichsweise kurzen Messzeit von ca. drei Minuten spielt dieses kaum eine Rolle. Ausschläge wären auch dort als solche zu erkennen.

Ein Kostenvergleich setzt voraus, dass beide Systeme über gleiche Komponenten und Leistungsdaten verfügen. Ein erneutes Angebot der Firma UniSense, das einen Temperatursensor und eine dafür geeignete Auswerteeinheit beinhaltet, wurde eingeholt. Es lag ca. 1500 € unter dem der Firma PreSens. Vergleichend der jährlichen Betriebskosten mit der Annahme, dass die Mikrosonde von PreSens nur einmal im Jahr ausgewechselt werden muss, oder kaputt bricht, beträgt die jährliche Differenz 330 €. Somit wären die Kosten nach fünf Jahren gleich hoch und ab dem sechsten Jahr das PreSens Messsystem im Unterhalt billiger. Aus Erfahrung lässt sich sagen, dass die Glasfasermessspitze schnell bricht und bis zu dreimal im Jahr ersetzt werden muss. Jährliche Kosten von 570 € würden sich von denen der Firma UniSense nur gering unterscheiden.

Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz eines Preisvorteils von Seiten UniSense mit ca. 1500€, der Vorteil der besseren Handhabung und der besseren Messgenauigkeit der PreSens Microx TX 3 überwiegt. Die schnelle Einsatzbereitschaft der Messsonde und die Präzision beim Herausschieben der Messsondenspitze an das Fischei ist geeignet zur Kontrolle der Sauerstoffkonzentration im Fischei-Sedimentkontakttest im Routinebetrieb. Der Umgang mit dem PC Programm ist anwenderfreundlich und das Design ist übersichtlich gestaltet.

Aufgrund der Untersuchungen zur Eignung der Sonden für den Fischei-Sedimentkontakttest wurde die PreSens Sonde für alle weiteren Untersuchungen ausgewählt.

III. Sauerstoffmessungen im Überstandswasser

III.1. Einleitung

Fische spielen eine wichtige Rolle in der aquatischen Nahrungskette und haben ebenso wichtige Regulationsfunktionen in aquatischen Ökosystemen (BEUTH.DE 2013). Als Testorganismus in der Ökotoxikologie ist der Zebrafisch (*Danio rerio*) nicht mehr wegzudenken und kommt zur Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Fischeier zum Einsatz (DIN 2009). Der Fischei-Sedimentkontakttest ist eine Weiterentwicklung des Fischeitests. Wichtigster Unterschied ist, dass die Eier auf ein natives Sediment gegeben werden und nicht in ein Testwasser.

In Sedimenten mit einem hohen organischen Anteil (z.B. aus den Flüssen Alster und Elbe in Hamburg, Deutschland) laufen sauerstoffverbrauchenden bakterielle Abbauprozesse ab (RAASCH 2011). Diese Sedimente gelten als Sauerstoffzehrend und sind verantwortlich für eine mangelnde Sauerstoffversorgung der Fischembryonen im Fischei-Sedimentkontakttest. Es kommt zu Verzögerungen der Embryonalentwicklung. Dies lässt keine eindeutige Aussagen mehr zu, ob auftretende letale Effekte durch toxische Wirkungen oder durch Schadstoffe hervorgerufen worden.

Das Ziel dieses Abschnittes ist die Erfassung und die Sicherstellung einer Mindestsauerstoffkonzentration im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttests von mindestens 4 mg/l (DIN 2009). Hierzu wurde bereits im vorherigen Teil dieser Arbeit ein Messsystem für zukünftige Messungen ausgewählt und angeschafft. Darauf aufbauend werden nun Versuche zur zeitlichen und räumlichen Verteilung der Sauerstoffkonzentration im Verdünnungswasser, den Positiv-Kontrollen und den Quarzsandkontrollen durchgeführt. Zusätzlich werden mit Sedimentproben aus der Bille (Fischerhof) Fischei-Sedimentkontakttests, bei verschiedenen Bewegungsfrequenzen eines Horizontalschüttlers, durchgeführt. Raasch (2011) stellte fest, dass durch die Erhöhung der Bewegungsfrequenz die Mindestsauerstoffkonzentration sichergestellt werden kann, gibt aber auch zu bedenken, dass durch die stärkere mechanische Belastung auf die Fischeier letale Effekte auftreten könnten. Dies soll in einer weiteren Versuchsreihe mit Quarzsand untersucht werden.

III.2. Material und Methoden

Bei der DIN EN ISO 15088-6 (DIN 2009) handelt es sich um ein Einheitsverfahren für die Bestimmung der akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischembryonen über Verdünnungsstufen. Der Fischeitest wird ausschließlich in der Wasserphase durchgeführt. In Anlehnung an die DIN gibt die SOP-Fischeitest Sediment (INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT QUALITÄTSMANAGEMENTHANDBUCH 2013) konkrete Anweisungen für die Durchführung des Fischei-Sedimentkontakttests.

III.2.1. Chemikalien und Geräte

- 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA)
- HCl 0,1 n, Merck Art 1.09060.1000
- NaOH 0,1 n, Merck Art 1.09137.1000
- Technischer Puffer: pH 4,0; 7,0; 6,865
- Quarzsand F36 (Quarzwerke GmbH Frechen, Deutschland)
- pH-Meter WTW 320 mit Elektrode SenTix 41
- Sauerstoff-Messgerät WTW Oxi 330 mit Sauerstoffsensor Cellox 325
- Sauerstoff-Messgerät PreSens Microx TX 3 Needle Sensor
- Inversmikroskop
- Kaltlichtquelle
- Binokular
- Horizontalschüttler
- Kühlinkobator
- WISA Aquarien-Luftpumpe
- 20 ml Kristallisierschalen
- Parafilm (für Kristallisierschalen) bzw. Abdeckklebefolie (für Zellkulturplatten)
- Pipette mit 500-2500 µl und Pipettenspitzen
- Einweg-Plastikpipette
- Messkolben und Messzylinder 1 ml, 10 ml, 100 ml
- Aktivkohlepatrone und Kupfer-Ionen-Austauscher
- Verschiedene Glasware und Spatel
- Teststäbchen für Ammonium, Nitrit, Nitrat und Wasserhärte, *Merckoquant*[®]
- Labortagebuch

Tabelle III.1 Inhaltsstoffe für das Verdünnungswasser

Inhaltsstoffe Verdünnungswasser	
Inhaltsstoff	Hersteller
294,0 mg/l CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck Art. 2382
123,3 mg/l MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck Art. 5886
63,0 mg/l NaHCO ₃	Merck Art. 4936
5,5 mg/l KCl	Merck Art. 6329

III.2.1.1. Benötigte Wasser, Lösungen und Kontrollproben

Verdünnungswasser:

Das Verdünnungswasser bildet die Basis für alle Stammlösungen und Kontrollen, die im Fischei-Sedimentkontakttest verwendet werden. Es werden die in Tabelle III.1 genannten Inhaltsstoffe in deionisiertem Wasser eingewogen und mithilfe eines Magnetrührers gut vermischt. Bevor es zur Verwendung kommt muss es bis zur 100%igen Sauerstoffsättigung (8 mg O₂/l) belüftet und auf 26 °C ± 1 °C temperiert werden.

3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) Stammlösung:

Dichloranilin besteht aus einem Benzolring, an denen eine Aminogruppe (-NH₂) und zwei Chlor (-Cl) als Substituenten angefügt sind (GESTIS STOFFDATENBANK. 2013). Es gilt als giftig, umweltgefährdend und gesundheitsgefährdend. Die Stammlösung kommt für die Positiv-Kontrollen im Fischei-Sedimentkontakttest zum Einsatz. 3,4-DCA liegt als Salz vor und wird im Kühlschrank gelagert. Zum Herstellen der Stammlösung werden 0,05 g 3,4-DCA in 500 ml Verdünnungswasser gelöst und 24 Stunden gerührt. Vor der Verwendung wird die Stammlösung mit Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Stammlösungen sind lichtgeschützt im Kühlschrank bis zu sechs Monate verwendbar.

Positiv- und Negativ-Kontrollen

Zur Kontrolle, ob der Fischei-Sedimentkontakttest gewertet werden darf, werden jeweils acht Kristallisierschalen mit Quarzsand (3 g) und Verdünnungswasser (4 ml), sowie acht mit reinem Verdünnungswasser (4 ml) gefüllt. Jeweils vier werden für die Vorbereitung der Positiv-Kontrollen verwendet. Als Schadstoff wird 3,4-Dichloranilin

(3,4-DCA) mit einer von der DIN EN ISO 15088-6 vorgegebenen Konzentration (3,7 mg/l) verwendet. Die Konzentration der Positiv-Kontrollen ergibt sich aus einer Zugabe von 185 µl 3,4-DCA-Lösung (Konzentration: 100 mg/l).

Überführen der Fischeier

Die Fischeier müssen für die Verwendung im Test in einem einwandfreien Zustand sein. Vorab wird geprüft, ob mindestens 50 % der Eier befruchtet sind und sich in einem Zellstadium zwischen vier und 128 Zellen befinden. Das frühe Zellstadium ist wichtig, da dort die Empfindlichkeit der sich entwickelnden Embryonen gegenüber toxisch wirkenden Substanzen am höchsten ist. Die Eier werden mit einem Sieblöffel in eine 100 ml Kristallisierschale mit Verdünnungswasser überführt. Von dort werden jeweils fünf Eier mit einem Volumen von 1000 µl Verdünnungswasser, in die Negativ-Kontrollen und Negativ-Sediment-Kontrollen pipettiert. Die Eier für die Positiv-Kontrollen werden in einem Volumen von 815 µl überführt.

III.2.2.Übersicht der durchgeführten Versuche

Tabelle III.2 Übersicht der durchgeführten Versuche

Nr.	Versuchsbezeichnung
(1)	Verdünnungswasser, 20 °C
(2)	Verdünnungswasser, 26 °C
(3)	Verdünnungswasser, Temperaturänderung
(7)	Negative-Sedimentkontrolle
(11)	Positiv-Kontrolle
(12)	Sediment Fischerhof, ohne Bewegung
(13)	Sediment Fischerhof, 70 UpM
(14)	Sediment Fischerhof, 90 UpM
(15)	Sediment Fischerhof, 110 UpM
(a)	Auswirkungen auf das Fischei, 50 UpM
(b)	Auswirkungen auf das Fischei, 70 UpM
(c)	Auswirkungen auf das Fischei, 90 UpM
(d)	Auswirkungen auf das Fischei, 110 UpM
(e)	Auswirkungen auf das Fischei, 130 UpM
(16)	Fischei-Sedimentkontakttest (SOP), 90 UpM

Die Tabelle III.2 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche. Die fehlenden Versuchsnummern waren einst geplante, aber schließlich nicht durchgeführte Versuche. Dies ist damit begründet, dass die Ergebnisse der vorherigen Versuche die Fragestellung ausreichend beantwortete.

III.2.3. Einteilung der Kristallisierschale in Messzonen

Zum besseren Verständnis der Sauerstoffverteilung wurde die 20 ml Kristallisierschale in drei Zonen eingeteilt. In den folgenden Versuchen wurde jeweils in zwei verschiedenen Höhen gemessen (Abbildung III.1).

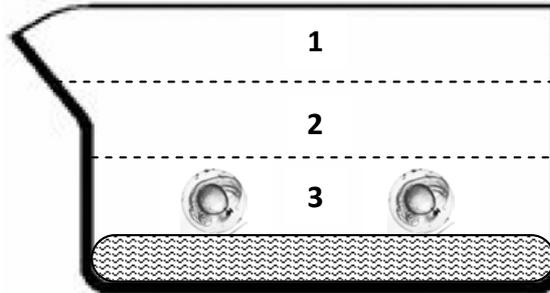


Abbildung III.1 Diffusions- und Zehrungszone im Fischei-Sedimentkontakttest

Verändert nach: MBM-LEHRMITTEL.DE (2013)

In Abbildung III.1 ist ein Schema einer 20 ml Kristallisierschale dargestellt wie sie im Fischei-Sedimentkontakttest zum Einsatz kommt. In der Diffusionszone (1) wird neuer Sauerstoff über die Wasseroberfläche aufgenommen. Über dem Sediment beginnt die Zehrungszone (3). In ihr wird der Sauerstoff aufgrund von Abbauprozessen im Sediment verbraucht. Aus Messungen geht hervor, dass direkt über dem Sediment ein anoxisches Milieu vorliegt. Die Sauerstoffkonzentration steigt kontinuierlich und gleicht sich in der Übergangszone (2) dem oberen Teil des Überstandswassers an.

III.2.4. Räumliche Verteilung der Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser

Mit den Versuchen zur Verteilung der Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser soll untersucht werden, ob vom Verdünnungswasser, den Positiv-Kontrollen, oder den Quarzsandkontrollen eine Sauerstoffzehrung zu erwarten ist und wie sich diese im Höhenprofil (Abbildung III.1) der Kristallisierschale, auswirkt.

III.2.4.1. Versuche mit Verdünnungswasser

Basis Versuch

Als Basis Versuch, ohne Zusätze von 3,4-DCA, Sedimenten und Fischeiern, wird zuerst die Diffusion des Sauerstoffs im Verdünnungswasser (räumliche Verteilung im Testgefäß) sowie auf zehrende Eigenschaften untersucht. Gemessen wird im

klimatisierten Labor bei einer Raumtemperatur von $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Anschließend werden die Untersuchungen in einem zweiten Versuch bei 26 °C wiederholt, was der Versuchstemperatur für den Sedimentkontakttest entspricht. Dazu wird das Verdünnungswasser im auf $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ klimatisierten Fischlabor gelagert, oder im Brutschrank temperiert.

(1) Verdünnungswasser, 20 °C

(2) Verdünnungswasser, 26 °C

Effekte der Temperaturänderung auf den Sauerstoffgehalt

Alle weiteren Versuche werden bei einer Temperatur von 26 °C durchgeführt. Die Sauerstoffkonzentration ist stark temperaturabhängig. Die im Brutschrank lagernden Proben kühlen sich nach dem Herausnehmen von 26 °C auf Raumtemperatur ($20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) ab. Der Sauerstoffgehalt steigt (vgl. Anhang I). Dieser Versuch soll Hinweise auf einen zeitlichen Rahmen, in dem eine zukünftige Probe gemessen werden muss, geben. Die Sauerstoffkonzentration der Probe wird bis zum Temperatúrausgleich nach 90 min alle zwei Minuten erfasst.

(3) Verdünnungswasser, Temperaturänderung

Effekte von verschiedenen Schüttelfrequenzen auf den Sauerstoffgehalt

Sauerstoff wird per Diffusion über die Wasseroberfläche eingetragen. Dieser Effekt wird durch kontinuierliche Bewegungen auf einem Horizontalschüttler verstärkt. RAASCH (2011) stellte fest, dass sich bereits bei einer Frequenz von 90 Umdrehungen pro Minute (UpM) die Sauerstoffsituation im Überstandswasser deutlich verbessert. In einer weiteren Versuchsreihe soll der Sauerstoffeintrag bei verschiedenen Schüttelfrequenzen auf die Probe erfasst werden, ohne dass zusätzlich zehrendes Sediment vorhanden ist.

In den Versuchen (1) und (2) wurde eine gleichmäßige und konstante Sauerstoffverteilung innerhalb des Überstandswassers über den Testzeitraum nachgewiesen.

III.2.4.2. Versuche mit Quarzsand

Negative-Sedimentkontrolle

Eine weitere Komponente die untersucht werden muss ist der für die Negativen-Sedimentkontrollen verwendete Quarzsand der Firma Quarzwerke GmbH (Frechen, Deutschland). Zusätzlich zu dem Verdünnungswasser, kommt $3 \pm 0,3$ g Quarzsand hinzu. Der Quarzsand hat wie das Verdünnungswasser wahrscheinlich keine sauerstoffzehrenden Eigenschaften. Mit dem Versuch (7) wurde nachgewiesen, dass keine Sauerstoffzehrung stattfindet.

(7) Negative-Sedimentkontrolle

III.2.4.3. Positiv-Kontrolle

Der für die Positiv-Kontrolle verwendete Schadstoff 3,4-DCA ist aufgrund seines Benzolrings sehr stabil. Im folgenden Versuch soll erfasst werden, ob 3,4-DCA eine sauerstoffzehrende Wirkung hat. Hierzu wird wie für die Positiv-Kontrolle Verdünnungswasser mit einer Konzentration von 3,7 mg/l 3,4-DCA verwendet.

(11) Positiv-Kontrolle

III.2.4.4. Sedimentkontakttest Fischerhof (Bille)

Den größten Effekt auf die Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser hat das zu beprobende Sediment. ROCHA et al. (2011) berichten von einem sehr stark sauerstoffzehrenden Sediment im Fluss Tietê (São Paulo, Brasilien). Weiterhin ist bekannt, dass Hamburger Sedimente aus Elbe, Alster und Bille einen hohen organischen Anteil aufweisen (RAASCH 2011). Mit den folgenden Versuchen wird die Zehrung von Sedimenten aus der Bille, und eine mögliche Kompensation durch Diffusion über die Wasseroberfläche untersucht. Hierbei wird zuerst die Sauerstoffverteilung, innerhalb des Überstandwassers ohne Bewegung und in weiteren Versuchen bei verschiedenen Schüttelfrequenzen ermittelt. Wie in allen vorherigen Versuchen wird in regelmäßigen Zeitabständen die Sauerstoffkonzentration gemessen. Um Effekte von eventuellen niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf Zebrabärbling Embryonen zu untersuchen, wird parallel zu allen Versuchsansätzen (mit und ohne Bewegung) ein Fischei-Sedimentkontakttest durchgeführt. Dazu gehören ebenfalls Positiv- und Negativ-Kontrollen.

(12) Sediment Fischerhof, ohne Bewegung

(13) Sediment Fischerhof, 70 UpM

(14) Sediment Fischerhof, 90 UpM

(15) Sediment Fischerhof, 110 UpM

III.2.5. Effekte an den Fischeiern bei verschiedenen Schüttelfrequenzen

Die durch den Horizontalschüttler ausgeführten Bewegungen erhöhen nicht nur den Sauerstoffeintrag in das Überstandswasser, sondern auch die mechanische Belastung auf die Fischeier. Die Schwenkbewegungen lassen die Fischeier über das Sediment hin und her bewegen. Es werden Versuche zu fünf verschiedenen Schüttelfrequenzen durchgeführt und die zusätzliche mechanische Belastung auf die Fischeier untersucht. Positiv- und Negativ-Kontrollen laufen mit.

- a) Auswirkungen auf das Fischei, 50 UpM
- b) Auswirkungen auf das Fischei, 70 UpM
- c) Auswirkungen auf das Fischei, 90 UpM
- d) Auswirkungen auf das Fischei, 110 UpM
- e) Auswirkungen auf das Fischei, 130 UpM

III.2.6. Fischei-Sedimentkontakttest nach Standard Operating Procedure (SOP)

Die in den vorherigen Versuchen gewonnenen Informationen zur Schüttelfrequenz, Messintervallen und die Sauerstoffverteilung innerhalb des Überstandswassers werden in die Standard Arbeitsanweisung (SOP) übernommen. Sie gibt innerbetriebliche Umsetzungshilfen für den Fischei-Sedimentkontakttest nach DIN 38415-T6. Der Versuch (16) soll exakt nach SOP verlaufen und gibt weitere Auskünfte darüber, ob nach der Etablierung des Sedimentkontakttest der einwandfreie Routinebetrieb möglich ist. Die Probenverarbeitung soll möglich schnell durchgeführt werden, damit das anfängliche anoxische Milieu durch schwenken der Probe mit Neuen Sauerstoff versorgt wird.

(16) Fischei-Sedimentkontakttest (SOP), 90 UpM

III.3. Ergebnisse und Auswertungen

III.3.1. Räumliche Verteilung der Sauerstoffkonzentration

III.3.1.1. Versuche mit Verdünnungswasser

Basis Versuche

(1) Verdünnungswasser, 20 °C

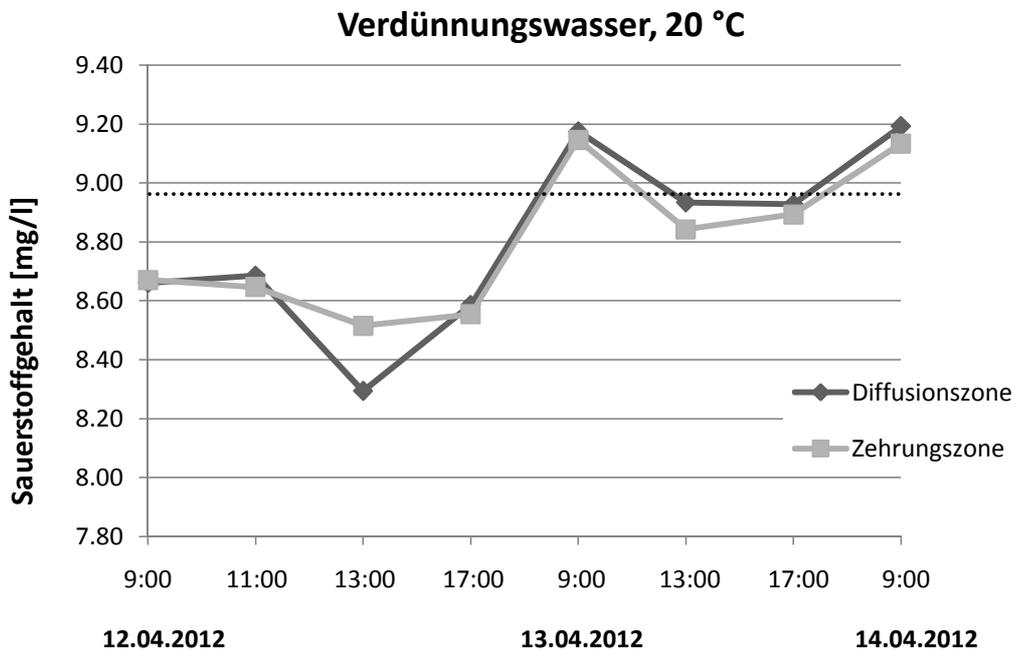


Abbildung III.2 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Verdünnungswasser bei 20 °C

Die gepunktete Linie entspricht der 100 % Sauerstoffsättigung (8,97 mg/l) bei einer gemessenen Durchschnittstemperatur von 20,6 °C.

Wie in Abbildung III.2 zusehen, liegt am ersten Versuchstag (12.04.2012) die gemessene Temperatur bei ca. 21 °C. Die Proben wiesen somit eine Sauerstoffsättigung von ca. 96 % auf. Über Nacht kühlten sie sich ab und es wurde am zweiten Versuchstag eine Temperatur von 20 °C gemessen. Die Sauerstoffkonzentration stieg. Die Proben waren zu 100 % mit Sauerstoff gesättigt. Während der gesamten 48 Stunden war keine Sauerstoffzehrung zu erkennen. In der Diffusionszone, sowie der Zehrungszone war der Sauerstoff gleich verteilt.

(2) Verdünnungswasser, 26 °C

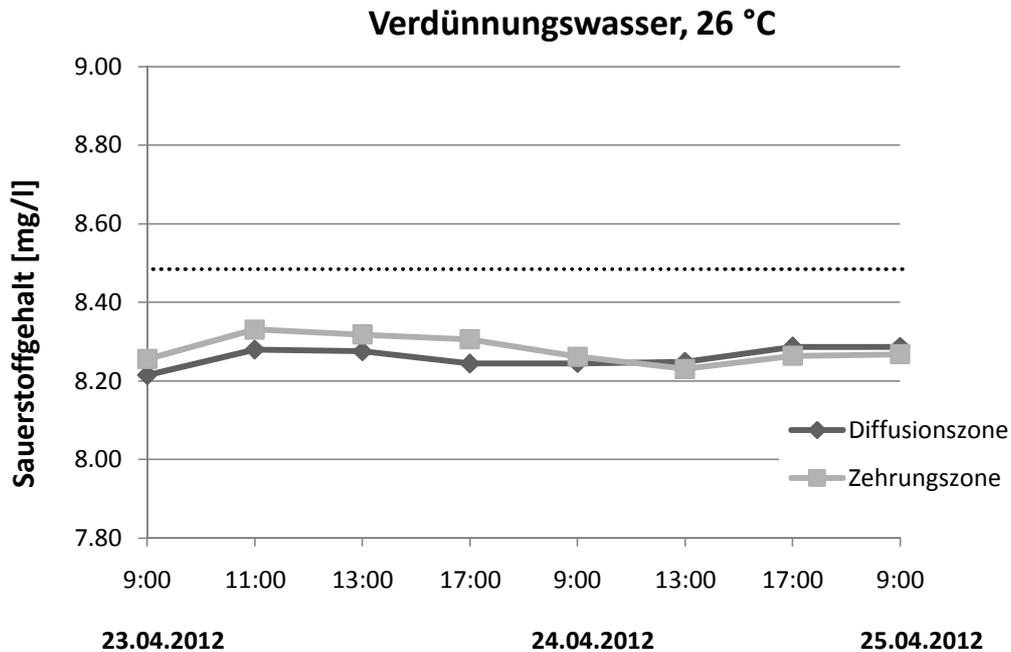


Abbildung III.3 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Verdünnungswasser bei 26 °C

Die gepunktete Linie entspricht der 100 % Sauerstoffsättigung (8,48 mg/l) bei einer gemessenen Durchschnittstemperatur von 23,5 °C.

In **Abbildung III.3** weist die durchschnittliche Sauerstoffkonzentration von etwa 8,28 mg/l des Verdünnungswassers (theoretische Proben­temperatur von 24,8 °C bei einer 100%igen Sättigung) während der gesamten 48 Stunden keine Auffälligkeiten zwischen der Wasseroberfläche (Diffusionsgrenze) und der in Bodennähe (Zehrungszone) gemessenen Konzentrationen auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Abweichung der Durchschnittstemperatur zur theoretischen Proben­temperatur durch eine rasche Abkühlung des Verdünnungswassers nach dem entnehmen aus dem Brutschrank entstanden ist (s. Tabelle III.3 Seite 65). In Versuch (3) wird dies genauer untersucht. Eine Sauerstoffzehrung ist nicht zu erkennen.

Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit der Temperatur

(3) Verdünnungswasser, Temperaturänderung

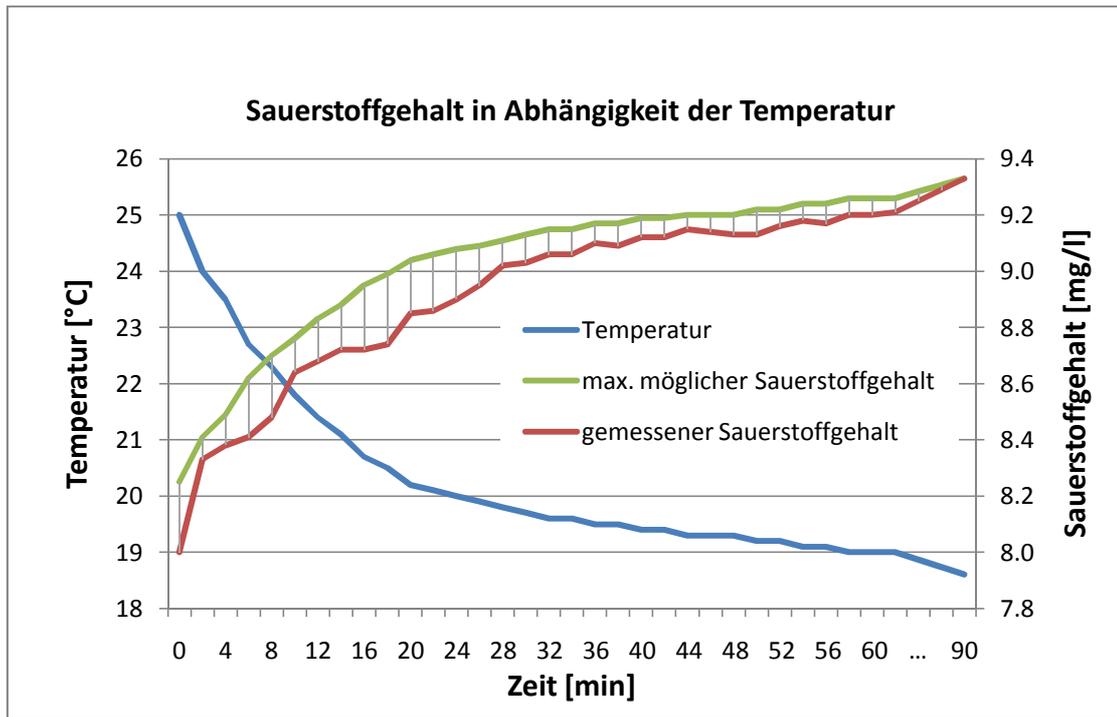


Abbildung III.4 Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffgehalts in Abhängigkeit der Temperatur

Der erste Messwert wurde ca. 20 Sekunden nach dem Herausnehmen aus dem Brutschrank mit einer Temperatur von 25 °C gemessen. Die anfänglich große Temperaturdifferenz zwischen Verdünnungswasser und Labortemperatur ließ die Temperatur innerhalb der ersten fünf Minuten stark fallen (s. Abbildung III.4). Die maximal lösbare Sauerstoffkonzentration steigt und weiterer Sauerstoff wird über die Wasseroberfläche gelöst. Der tatsächlich gelöste Sauerstoff nähert sich über den gesamten Versuchszeitraum dem maximal lösbaren Gehalt an. Nach ca. 24 Minuten fiel die Temperatur auf einen Wert von 20 °C und passte sich von da an nur noch langsam der im Labor herrschenden Temperatur an. Im Zeitraum zwischen 60 bis 90 Minuten nach Versuchsbeginn (hier nicht mehr dargestellt) sank die Temperatur um weitere 0,4 °C auf einen Endwert von 18,6 °C und wies eine 100%ige Sättigung mit einem Gehalt von 9,33 mg O₂/l auf.

In Abbildung III.5 ist die gemessene Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Der schnelle Temperaturabfall lässt die Sättigung nur langsam steigen. Immer wieder fällt der Wert zurück auf ca. 97,5 %. Während der letzten 30

Ergebnisse und Auswertungen

Minuten steigt die Sättigung gleichmäßig von 99,0 % auf 99,5 % und erreicht 90 Minuten nach Versuchsbeginn eine 100%ige Sättigung bei 9,33 mg O₂/l.

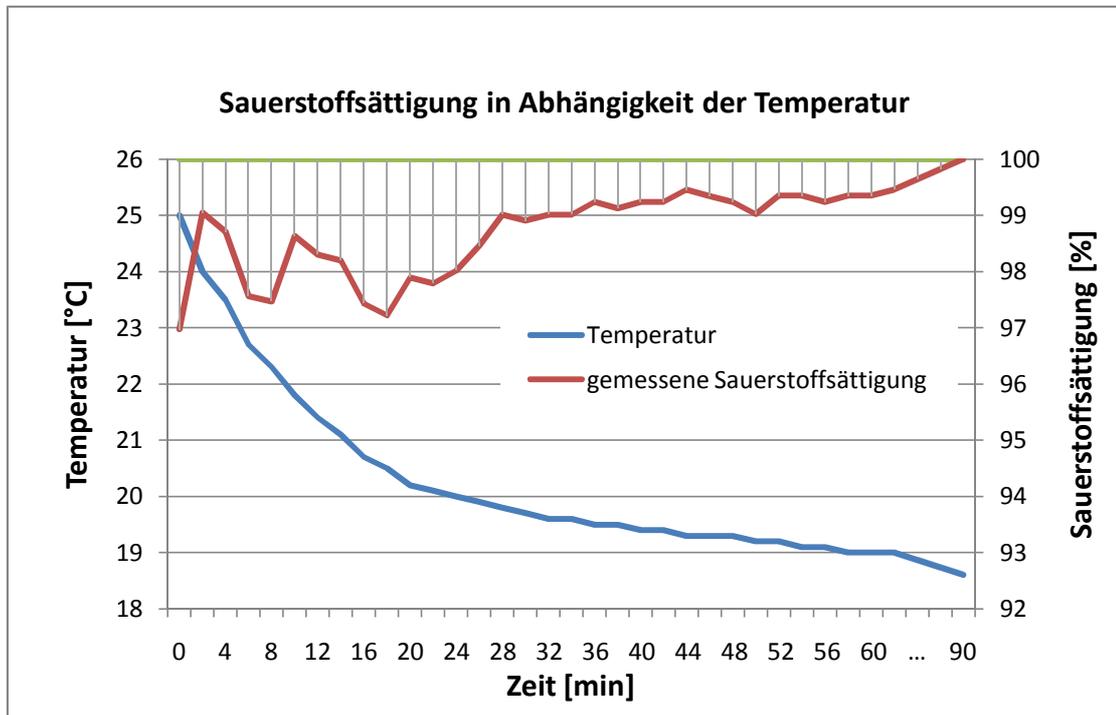
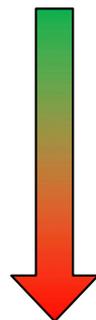


Abbildung III.5 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit der Temperatur

Tabelle III.3 Zeitraum zum Erfassen der Sauerstoffkonzentration im Fischei-Sedimentkontakttest

t [min]	T [°C]	O ₂ [mg/l]	O ₂ -Sättigung [%]	O ₂ Max [mg/l]
0	25,00	8,00	96,97	8,25
2	24,00	8,33	99,05	8,41
4	23,50	8,38	98,70	8,49
6	22,70	8,41	97,56	8,62
8	22,30	8,48	97,47	8,70
10	21,80	8,64	98,63	8,76
12	21,40	8,68	98,30	8,83



In Tabelle III.3 ist zu sehen, dass sich die Sauerstoffkonzentration umgekehrt proportional gegenüber der Temperatur verhält. Der Temperaturabfall ist in den ersten zwei Minuten nach dem Herausnehmen aus dem Brutschrank mit einem Grad Celsius am größten. Bei späterer Verarbeitung der Proben sind Temperatur- und Sauerstoffabweichungen so groß, dass sie nicht mehr dem ursprünglichen Wert zuzuordnen sind. Der Pfeil soll einen Richtwert geben in welchem Zeitraum gemessen

werden sollte. Nach bereits fünf Minuten sind Abweichungen von zwei Grad Celsius und 0,4 mg O₂/l gemessen worden

III.3.1.2. Versuche mit Quarzsand

(7) Negative-Sedimentkontrolle

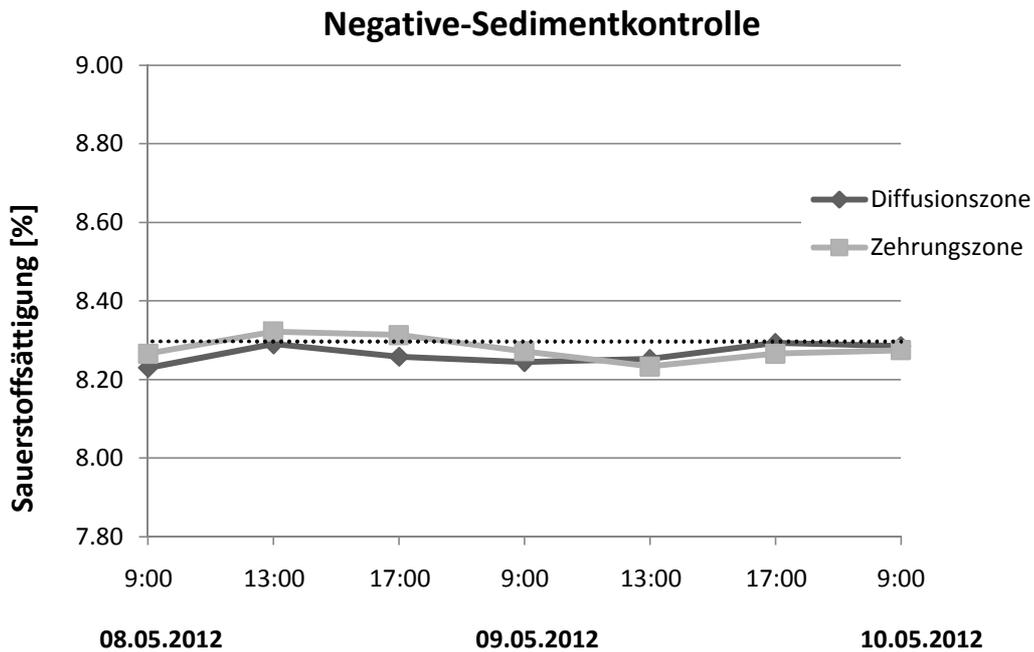


Abbildung III.6 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung in der Negativ-Sedimentkontrolle

Die gepunktete Linie entspricht der 100 % Sauerstoffsättigung (8,30 mg/l) bei einer gemessenen Durchschnittstemperatur von 24,7 °C.

Die Sauerstoffsättigung in der Negativ-Sedimentkontrolle (Abbildung III.6) liegt über den gesamten Versuchszeitraum (48 Std.) bei 99,4 % und weist während dessen keine nennenswerten Unterschiede in der Verteilung der gemessenen Konzentrationen auf. Eine Sauerstoffzehrung durch den Quarzsand ist nicht zu erkennen. Ein zusätzlicher Sauerstoffeintrag durch einen Horizontalschüttler ist nicht nötig.

III.3.1.3. Positiv-Kontrolle

(11) Positiv-Kontrolle

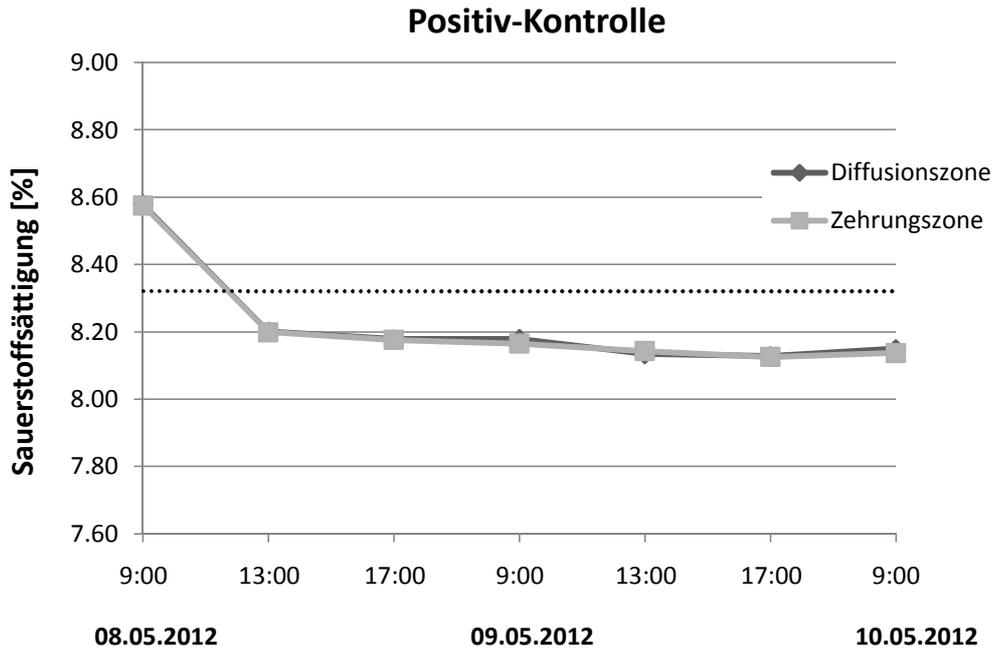


Abbildung III.7 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung in der Positiv-Kontrolle

Die gepunktete Linie entspricht der 100 % Sauerstoffsättigung (8,33 mg/l) bei einer gemessenen Durchschnittstemperatur von 24,5 °C.

Der erste Messwert in Abbildung III.7 liegt mit einer Sauerstoffkonzentration von 8,58 mg/l um 0,4 mg/l höher als die nachfolgenden Werte. Bei einer zu diesem Zeitpunkt gemessenen Temperatur von 22,7 °C würde eine 100%ige Sättigung mit einer Konzentration von 8,60 mg O₂/l vorliegen. Dieser Ausreißer ist auf die in Versuch (3) festgestellte Temperaturänderung und Sauerstoffänderung zurückzuführen. Folgende Messungen liegen ohne diesen Wert im Durchschnitt bei 24,70 °C und weisen damit eine Sauerstoffsättigung von 98,5 % auf. Es kann keine Zehrung durch den Quarzsand festgestellt werden. Der Sauerstoff ist in der gesamten Positiv-Kontrolle gleichmäßig verteilt.

III.3.1.4. Sedimentkontakttest Fischerhof (Bille)

(12) Sediment (Fischerhof), ohne Bewegung

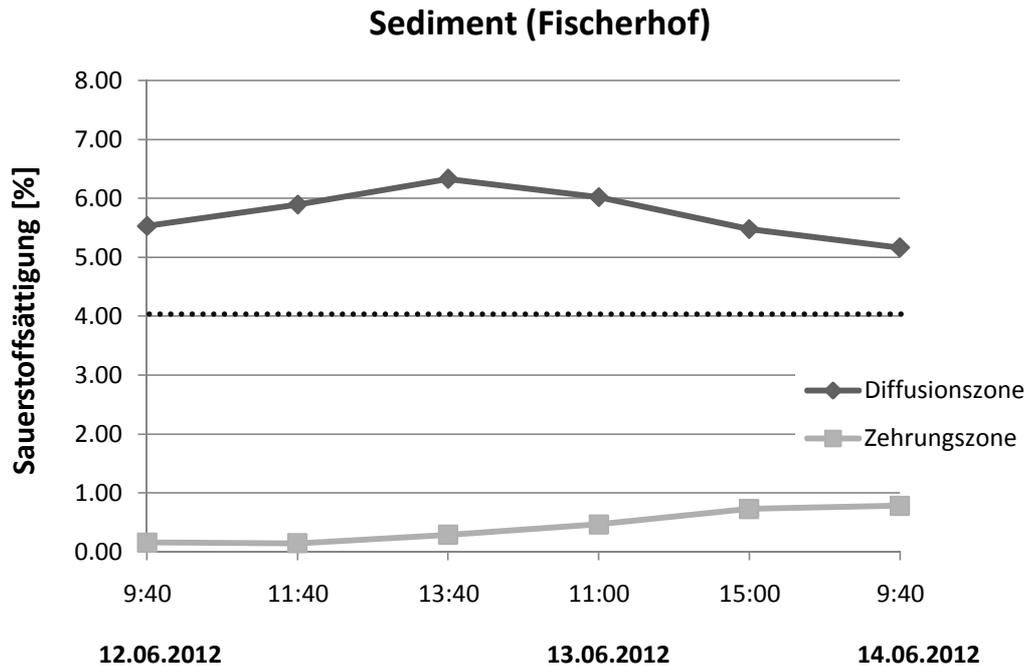


Abbildung III.8 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Überstandswasser einer zehrenden Sedimentprobe (Fischerhof)

Die gepunktete Linie gibt die Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l an. Diese sollte während der gesamten Versuchsdauer von 48 Stunden erreicht werden.

Die hellgraue Messreihe in Abbildung III.8 gibt den Verlauf der Sauerstoffkonzentration der Zehrungszone direkt über dem Sediment wieder. Die Messwerte liegen zwischen 0,16 bis 0,78 mg O₂/l und sind über dem Versuchszeitraum leicht steigend. Die Sauerstoffkonzentration in der Zehrungszone ist weit unter den in der DIN 38415-T6 geforderten 4,0 mg/l. Die Fischembryonen sind einem anoxischem Milieu, bzw. extremer Hypoxie ausgesetzt (MARTINOVIC et al. 2009). Eine normale Entwicklung kann nicht mehr garantiert werden. STRECKER et al. (2011) setzten den LC 100 der Zebraabärblings Embryonen auf 0,88 mg O₂/l fest. Die dunkelgraue Messreihe stellt den Verlauf in der Diffusionszone, direkt unter der Wasseroberfläche, dar. Diese steigen in den ersten vier Stunden leicht auf ca. 6,33 mg O₂/l an und fielen danach sogar leicht unter den Anfangswert auf 5,16 mg O₂/l ab.

Ergebnisse und Auswertungen

In den nachfolgenden Ergebnistabellen der Fischei-Sedimentkontaktteste bedeutet:

- Mortalität:** Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen
- F:** Fröhschlupf
 - N:** normal entwickelter Embryo
 - U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach der Befruchtung)
 - K:** koaguliertes Ei (letal)
 - S:** keine Schwanzablösung (letal)
 - H:** kein Herzschlag (letal)

In Tabelle III.4 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests aufgeführt. Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind als Anhang angefügt.

Tabelle III.4 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Sediment (Fischerhof), ohne Bewegung

Sediment (Fischerhof), ohne Bewegung							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 25 Mortalität = 4 %	1	-	4	3*24 1*12	1	-	-
	2	-	5	2*24 1*12 2*8	-	-	-
	3	-	5	1*12 4*8	-	-	-
	4	-	5	3*24 1*18 1*12	-	-	-
	5	-	5	2*24 3*18	-	-	-
Summe	-	24			1	-	-

Legende: s. Seite 69

Wie in Tabelle III.4 zu erkennen ist, überlebten 24 von 25 Embryonen. Sie wiesen eine extreme Unterentwicklung auf. Sechs von ihnen haben gerade erst das Embryonalschild ausgebildet. Ihr Alter wird auf acht hpf geschätzt. Sie befinden sich demnach noch in der Gastrula Phase. 17 Embryonen befanden sich in der Segmentierungsphase. 10 von ihnen hatten ein Entwicklungsstand von 24 hpf. Generell war die Herzschlagrate bei allen Individuen stark verlangsamt. Die Mortalität beträgt aufgrund eines koagulierten Fischeis 4 %.

(13) Sediment (Fischerhof), 70 UpM

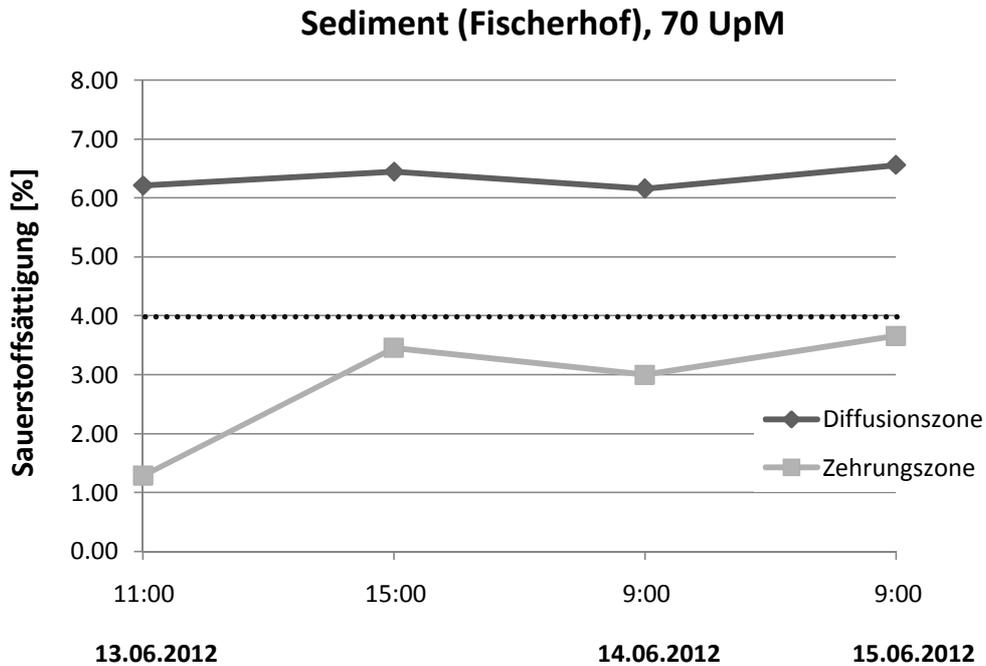


Abbildung III.9 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Überstandswasser einer zehrenden Sedimentprobe (Fischerhof), 70 UpM

Die gepunktete Linie stellt die geforderte Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l dar.

Die Sauerstoffkonzentration steigt in den ersten vier Stunden (Abbildung III.9) von anfangs 1,29 mg/l auf schließlich 3,5 mg/l. Auf diesem Niveau bleibt die Sauerstoffkonzentration. Der in der DIN geforderte Mindestwert von 4,0 mg/l Sauerstoff wird in der Zehrungszone annähernd erreicht, demnach ist ein normaler Verlauf der embryonalen Entwicklung gegeben (STRECKER et al. 2011, BRAUNBECK et al. 2005). Die Sauerstoffkonzentration der Diffusionszone liegt während des Versuchszeitraums konstant bei ca. 6,2 mg/l.

In Tabelle III.5 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests aufgeführt. Die dazugehörigen Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Tabelle III.5 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Sediment (Fischerhof), 70 UpM

Sediment (Fischerhof), 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	5	-	-	-	-	-
	2	2	3	-	-	-	-
	3	4	1	-	-	-	-
	4	3	2	-	-	-	-
	5	4	1	-	-	-	-
	6	4	1	-	-	-	-
	7	2	3	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	3	2	-	-	-	-
	10	3	2	-	-	-	-
Summe		30	20		-	-	-

Legende: s. Seite 69

Alle 50 Embryonen haben überlebt und waren normal entwickelt. Als auffällig gilt, dass insgesamt 30 Embryonen bereits nach 48 Stunden geschlüpft sind.

(14) Sediment (Fischerhof), 90 UpM

Bei einer Schüttelfrequenz von 90 UpM steigt die Sauerstoffkonzentration in der Zehrungszone innerhalb der ersten drei Stunden von 1,59 mg/l auf 4,75 mg/l an (Abbildung III.10). Die Embryonen sind nur für eine kurze Zeit einer extremen Hypoxie ausgesetzt. Über die restliche Versuchsdauer steigt die Sauerstoffkonzentration langsam auf 5,20 mg/l. Es wurde die Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l überschritten und hierdurch eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Embryonen sichergestellt. Dagegen fällt die Konzentration in der Diffusionszone kontinuierlich von anfänglich 7,45 mg/l auf 6,50 mg/l ab.

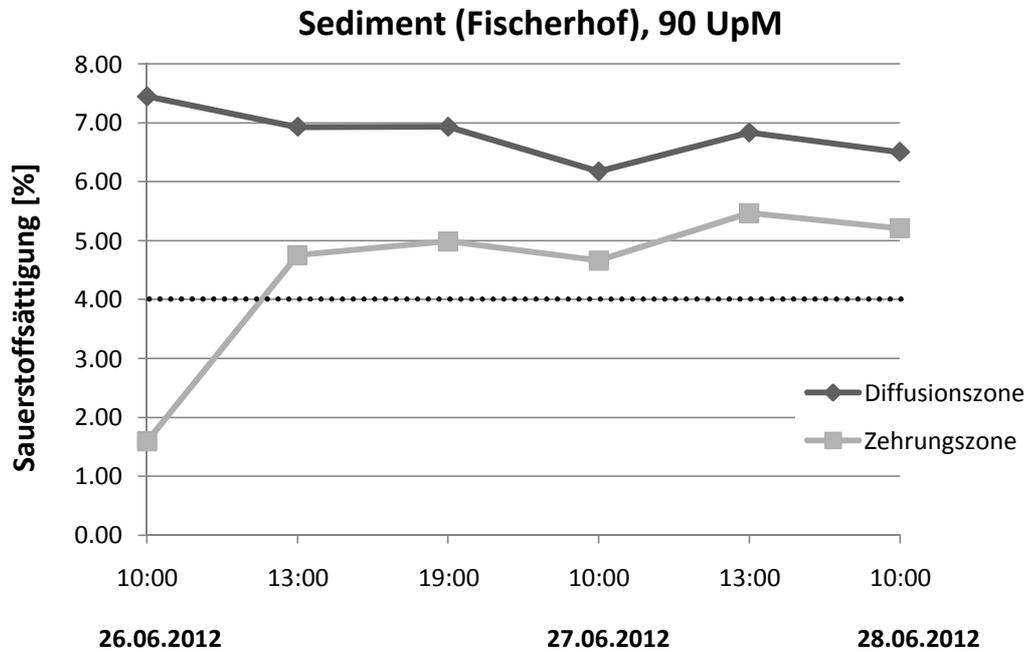


Abbildung III.10 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Überstandswasser einer zehrenden Sedimentprobe (Fischerhof), 90 UpM

Die gepunktete Linie stellt die geforderte Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l dar.

In Tabelle III.6 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests zusammengefasst. Die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Tabelle III.6 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Sediment (Fischerhof), 90 UpM

Sediment (Fischerhof), 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 8 %	1	-	4	-	1	-	-
	2	1	4	-	-	-	-
	3	3	2	-	-	-	-
	4	1	4	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	3	1	-	1	-	-
	8	1	4	-	-	-	-
	9	5	-	-	-	-	-
	10	3	-	-	2	-	-
Summe		17	29		4	-	-

Legende: s. Seite 69

Ergebnisse und Auswertungen

Insgesamt haben sich 29 Embryonen normal entwickelt. 17 sind bereits früher als der normalen 72 Stunden geschlüpft. Vier Eier waren koaguliert, was einer Mortalität von 8 % entspricht.

(15) Sediment (Fischerhof), 110 UpM

In der Abbildung III.11 ist deutlich zu erkennen, wie die Sauerstoffkonzentration in der Zehrungszone sprunghaft ansteigt. Die Fischeier sind auch hier nur für eine kurze Zeit einer extremen Hypoxie ausgesetzt. Die Sauerstoffkonzentration der Zehrungszone steigt innerhalb der ersten dreieinhalb Stunden von 1,75 mg/l auf eine Konzentration von 5,90 mg/l an und bleibt während des restlichen Versuchszeitraums auf diesem hohen Niveau. Die Ergebnisse der vorigen Versuche geben Hinweise darauf, dass die Differenz der Sauerstoffkonzentration zwischen der Diffusionszone und der Zehrungszone mit zunehmender Schüttelfrequenz sinkt. Sie beträgt in diesem Versuch etwa 1 mg/l.

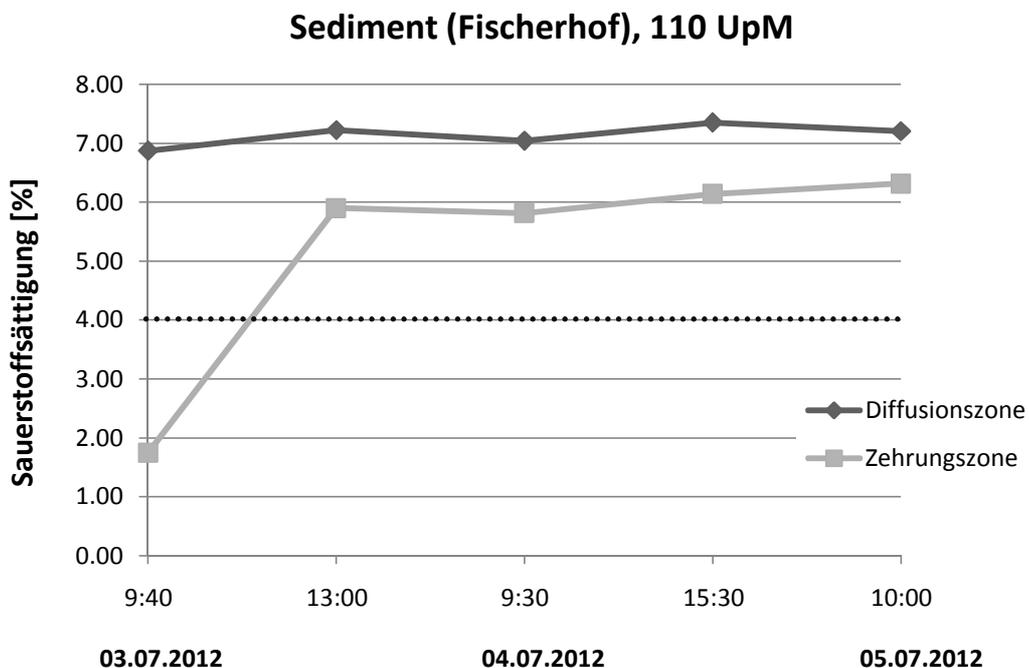


Abbildung III.11 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Überstandswasser einer zehrenden Sedimentprobe (Fischerhof), 110 UpM

Die gepunktete Linie stellt die geforderte Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l dar.

Ergebnisse und Auswertungen

In Tabelle III.7 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests zusammen gefasst. Die dazugehörigen Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Tabelle III.7 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Sediment (Fischerhof), 110 UpM

Sediment (Fischerhof), 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 18 %	1	3	2	-	-	-	-
	2	1	3	-	1	-	-
	3	-	3	-	2	-	-
	4	1	2	-	2	-	-
	5	2	3	-	-	-	-
	6	-	3	-	1	1	-
	7	1	3	-	1	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	1	3	-	-	1	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		9	32		7	2	-

Legende: s. Seite 69

Auffällig ist, dass die Mortalität mit 18 % gegenüber dem vorherigen Versuche um mehr als das doppelte gestiegen ist. Sieben Eier sind koaguliert, bei zwei fand keine vollständige Schwanzablösung statt. In diesem Versuch kam es bei neun Embryonen zum Fröhschlupf. 32 entwickelten sich normal.

III.3.2. Effekte an den Fischeiern bei verschiedenen Bewegungsfrequenzen auf Quarzsand

(a) Auswirkungen auf das Fischei, 50 UpM

In Tabelle III.8 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests zusammen gefasst. Die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Ergebnisse und Auswertungen

Tabelle III.8 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Quarzsand, 50 UpM

Quarzsand, 50 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 2 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	49		1	-	-

Legende: s. Seite 69

Es sind keine signifikanten Auswirkungen auf die Fischeier fest zustellen. Bei einem koagulierten Ei entspricht das einer Mortalität von 2 %. 49 von 50 Embryonen haben sich normal entwickelt.

(b) Auswirkungen auf das Fischei, 70 UpM

Bei einer Mortalität von 2 % ist ein Fischei koaguliert. 49 Embryonen (s. Tabelle III.9) haben sich normal entwickelt. Im Anhang die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen angefügt.

Tabelle III.9 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Quarzsand, 70 UpM

Quarzsand, 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 2 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	4	-	1	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	49		1	-	-

Legende: s. Seite 69

(c) Auswirkungen auf das Fischei, 90 UpM

In Tabelle III.10 sind die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests zusammengefasst. Die dazugehörigen Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Alle 50 Embryonen haben sich normal entwickelt. Es wurden keine Embryonen mit Fröhschlupf, oder letalen Schäden festgestellt.

Tabelle III.10 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Quarzsand, 90 UpM

Quarzsand, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	50		-	-	-

Legende: s. Seite 69

(d) Auswirkungen auf das Fischei, 110 UpM

Die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests sind in Tabelle III.11 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Auffällig bei einer Schüttelfrequenz von 110 UpM ist die im Vergleich zu anderen Versuchen relativ hohe Mortalität. Sie ist mit 8 % in dieser Versuchsreihe am höchsten. Insgesamt sind vier Embryonen koaguliert. Die restlichen 46 Embryonen haben sich normal entwickelt. Vergleichend zu Versuch (15), Sediment (Fischerhof) mit 110 UpM, ist auch dort die Mortalität mit 18 % am höchsten.

Ergebnisse und Auswertungen

Tabelle III.11 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Quarzsand, 110 UpM

Quarzsand, 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 8 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	4	-	1	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	4	-	1	-	-
Summe		-	46		4	-	-

Legende: s. Seite 69

(e) Auswirkungen auf das Fischei, 130 UpM

Die Ergebnisse des Fischei-Sedimentkontakttests sind in der Tabelle III.12 dargestellt. Die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen sind im Anhang angefügt.

Alle 50 Embryonen haben sich normal entwickelt. Es wurden weder Fröhschlupf noch letale Schäden an den Eiern festgestellt. Auffällig ist, dass bei einer Schüttelfrequenz von 130 UpM eine Umverteilung des Quarzsands stattfindet (Abbildung III.12).

Tabelle III.12 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Quarzsand, 130 UpM

Quarzsand, 130 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	50		-	-	-

Legende: s. Seite 69

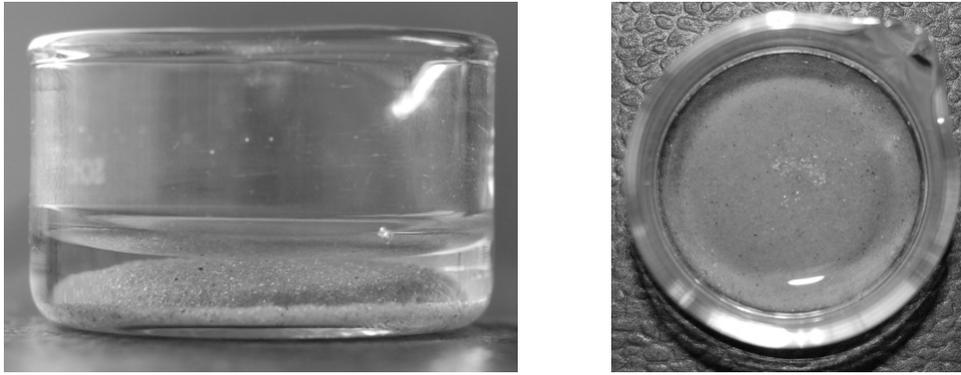


Abbildung III.12 Umverteilung des Quarzsands nach 48 h bei einer Frequenz von 130 UpM

In Bezug auf Abbildung III.12 hat eine Umverteilung des Quarzsandes zur Mitte hin stattgefunden. Am Rand der Kristallisierschale war nur noch wenig, bzw. kein Quarzsand mehr vorhanden. Die Fischeier wurden von der Mitte heraus an den Rand gelagert. Sie standen zu keiner Zeit in Kontakt mit dem Quarzsand. Folglich wurden keine letalen Schäden an ihnen festgestellt. Dieses Ergebnis dient als Plausibilitätsbeweis für die Richtigkeit der Messwerte gegenüber den Versuchen mit geringeren Schüttelfrequenzen.

III.3.3.Fischei-Sedimentkontakttest nach (SOP)

(16) Fischei-Sedimentkontakttest (SOP), 90 UpM

Mit einer schnelleren Probenverarbeitung konnte nachgewiesen werden, dass der Zeitraum in dem die Fischeier einem anoxischen Milieu ausgesetzt sind verkürzt werden konnte. Die zum Versuchsbeginn gemessene Sauerstoffkonzentration in der Zehrungszone beträgt 1,85 mg/l (Abbildung III.13) und liegt damit um 0,26 mg/l höher als die anfänglich gemessene Konzentration des Versuchs (14) Sediment (Fischerhof) mit 90 UpM. Die Sauerstoffkonzentration der Zehrungszone steigt während der ersten zwei Stunden auf eine Konzentration von ca. 5 mg/l an und schwankt bis zum Ende des Versuchszeitraums zwischen 4,31 und 5,57 mg/l. In der Diffusionszone fällt die Sauerstoffkonzentration von 6,71 auf 6,31 mg/l nur gering.

Ergebnisse und Auswertungen

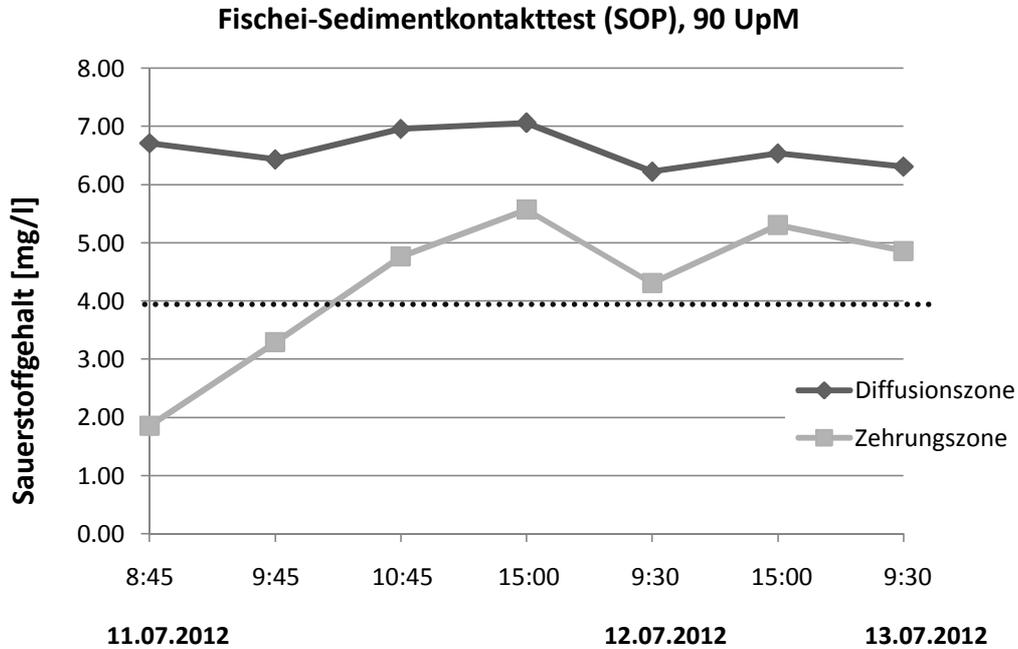


Abbildung III.13 Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration und dessen Verteilung im Überstandswasser einer zehrenden Sedimentprobe (Fischerhof) nach SOP mit 90 UpM

Die gepunktete Linie stellt die geforderte Mindest-Sauerstoffkonzentration von 4,0 mg/l dar.

In diesem Versuch haben sich 20 Embryonen normal entwickelt (Tabelle III.13). Bei 28 Embryonen wurde der Fröhschlupf festgestellt. Bei zwei Embryonen fand keine Schwanzablösung statt. Dies entspricht einer Mortalität von 4 %. Im Anhang sind die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen des Fischei-Sedimentkontakttests angefügt.

Tabelle III.13 Auswertung Fischei-Sedimentkontakttest: Fischei-Sedimentkontakttest (SOP), 90 UpM

Sediment (Fischerhof) SOP, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 4 %	1	2	3	-	-	-	-
	2	4	1	-	-	-	-
	3	5	-	-	-	-	-
	4	3	2	-	-	-	-
	5	-	4	-	-	1	-
	6	3	2	-	-	-	-
	7	3	1	-	-	1	-
	8	4	1	-	-	-	-
	9	2	3	-	-	-	-
	10	2	3	-	-	-	-
Summe		28	20		-	2	-

Legende: s. Seite 69

III.3.4. Gesamtübersicht der Fischei-Sedimentkontakttest Ergebnisse

Tabelle III.14 Übersicht der Ergebnisse der durchgeführten Fischei-Sedimentkontaktteste

Ergebnisübersicht								
Nr.	Bezeichnung des Versuchs	Mortalität	F	N	K	S	H	n
(12)	Sediment Fischerhof	4 %	-	24	1	-	-	25
(13)	Sediment Fischerhof, 70 UpM	0 %	30	20	-	-	-	50
(14)	Sediment Fischerhof, 90 UpM	8 %	17	29	4	-	-	50
(15)	Sediment Fischerhof, 110 UpM	18 %	9	32	7	2	-	50
(a)	Auswirkungen auf das Fischei, 50	2 %	-	49	1	-	-	50
(b)	Auswirkungen auf das Fischei, 70	2 %	-	49	1	-	-	50
(c)	Auswirkungen auf das Fischei, 90	0 %	-	50	-	-	-	50
(d)	Auswirkungen auf das Fischei, 110	8 %	-	46	4	-	-	50
(e)	Auswirkungen auf das Fischei, 130	0 %	-	50	-	-	-	50
(16)	Fischei-Sedimentkontakttest	4 %	28	20	-	2	-	50

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal), **n:** Anzahl der Fischeier

III.4. Diskussion

Das Ziel dieses Abschnittes war die Erfassung und die Sicherstellung einer Mindestsauerstoffkonzentration im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttests von mindestens 4 mg/l (DIN 2009). RAASCH (2011) stellte fest, dass Hamburger Sedimente aus der Elbe und Alster sauerstoffzehrend sind und regte an weitere Untersuchungen bezüglich der Sauerstoffverteilung im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttest mit Hamburger Sedimenten durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Sediment aus der Bille (Fischerhof) als Einzelprobe genommen und für Versuche verwendet. Desweiteren sollte untersucht werden, ob vom Verdünnungswasser, den Positiv-Kontrollen, oder dem Kontrollquarzsand eine Sauerstoffzehrung ausgeht.

In ersten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass das Verdünnungswasser, die Positiv-Kontrollen und der Quarzsand kein Sauerstoff verbrauchen. Abweichungen der Sauerstoffkonzentration die gegenüber einer 100 %igen Sauerstoffsättigung auftreten sind damit begründet, dass diese auf der Grundlage einer Durchschnittstemperatur berechnet wurde. Die wahre Temperatur zum Zeitpunkt einer Messung kann dem entsprechend abweichend sein. Im Versuch (1) *Verdünnungswasser, 20 °C* lag die gemessene Temperatur z.B. am ersten Versuchstag höher und am zweiten niedriger als die durchschnittlich gemessene Proben temperatur. Weitere Abweichungen entstehen nach dem entnehmen der Proben aus dem Brutschrank. Mit Versuch (3) *Verdünnungswasser, Temperaturänderung* konnte nachgewiesen werden, dass sich die Proben temperatur innerhalb der ersten zwei Minuten um 1 °C senkt. Es ist zu vermuten, dass die Sauerstoffkonzentration anfänglich noch auf dem Niveau der im Brutschrank herrschenden höheren Temperatur bleibt (vgl. Versuch (2) *Verdünnungswasser, 26 °C*), aber auf Grund der niedrigeren tatsächlich gemessenen Temperatur die maximal lösliche Sauerstoffkonzentration höher liegt (vgl. Anhang I).

Untersuchungen mit Sediment aus der Bille zeigten, dass auch dieses Hamburger Sediment einen hohen Verbrauch an Sauerstoff aufweist. Die Sauerstoffkonzentration fiel bereits zum Versuchsbeginn weit unter die geforderte Mindestsauerstoffkonzentration von 4 mg/l (DIN 2009). Die Fischembryonen sind

Diskussion

einem anoxischem Milieu, bzw. extremer Hypoxie ausgesetzt (MARTINOVIC et al. 2009). Begründet ist dies damit, dass bei organischen Sedimenten einerseits verstärkt bakterielle Abbauprozesse Sauerstoff benötigen und andererseits auch oxydative Reaktionen Sauerstoff verbrauchen. Die Probe wurde aus einem nur langsam fließenden Flussbereich entnommen in dem sich vor einem Stauwerk organisches Material sammelte. Es kann diesbezüglich davon ausgegangen werden, dass die Sedimentprobe aus der Bille sehr organisch geprägt war. Auch ein durch die Fischembryonen hervorgerufener Sauerstoffverbrauch während der Entwicklung kommt additiv dazu. STRECKER et al. (2011), GRILLITSCH et al. (2005) und BANG et al. (2004) geben den in den ersten drei Tagen bis zum Schlupf vom Embryo benötigten Sauerstoff mit ca. 0,037 mg an.

Sauerstoffkonzentrationen im Bereich von 2-3 mg/l lassen keinen normalen Verlauf der Embryonalentwicklung mehr zu (STRECKER et al. 2011, BRAUNBECK et al. 2005). PADILLA & ROTH (2001) merken an, dass die Embryonen aber durchaus in der Lage sind bis zu 24 Stunden unter vollständig anoxischen Bedingungen ohne bleibende Schäden überleben. Jedoch findet in derartigen Fällen keine Weiterentwicklung des Embryos statt. Der Embryo verbleibt im bereits erreichten Entwicklungsstadium und setzt seine Entwicklung erst unter normoxischen Bedingungen fort (PADILLA & ROTH 2001). Die Auswertung des Fischei-Sedimentkontakttests bestätigte dieses und ergab, dass 96 % der Fischembryonen extrem Unterentwickelt waren. Die verzögerte Embryonalentwicklung lässt nur bedingt Aussagen zu, ob auftretende letale Effekte toxischen Wirkungen durch Schadstoffe zuzuweisen sind, oder einer mangelnden Sauerstoffversorgung der Embryonen.

Weitere abiotische Parameter, wie die elektrische Leitfähigkeit und der pH-Wert haben ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung der Fischembryonen. Beide wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erfasst. So ist aber der pH-Wert eine wichtige Größe, da die Membraneigenschaften der Zellen, sowie Enzymaktivitäten abhängig sind (RAASCH 2011). Die DIN (2009) für den Fischeitest gibt keinen pH-Wert für die Hälterung vor. Proben müssen jedoch vor Testbeginn auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ eingestellt werden. Eine normale Entwicklung der Embryonen ist im Bereich von 4,5 - 9,0 zu erwarten (SCHULTE 1997). RAASCH (2011) stellte durch die Verwendung eines Horizontalschüttlers und durch die Erhöhung der Bewegungsfrequenz keine

Diskussion

Auswirkungen auf den pH-Wert fest. Die elektrische Leitfähigkeit des Überstandswassers stellt ein weiteres Problem dar, denn eine veränderte Osmolarität hat letale Effekte auf die Entwicklung der Embryonen. Es kann unter anderen zu Abschnürungen des Dottersacks kommen (LANGE et al. 1995). KEHRER (2008) gibt einen Höchstwert für die Leitfähigkeit im Überstandswassers mit 5000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ an.

In weiteren Versuchen wurde durch den Einsatz eines Horizontalschüttlers, ab einer Bewegungsfrequenz von 90 UpM (Versuch (14) *Sediment (Fischerhof), 90 UpM*), so viel zusätzlicher Sauerstoff über die Wasseroberfläche eingetragen, dass eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Embryonen sichergestellt werden konnte. Die Ergebnisse der Fischei-Sedimentkontaktteste, die mit nativem Sediment durchgeführt wurden, wiesen bei den Bewegungsfrequenzen 70 UpM, 90 UpM und 110 UpM einen Fröhschlupf der Embryonen auf. Eine Möglichkeit hierfür wäre, dass auf Grund einer leicht erhöhten Temperatur im Brutschrank sich die Embryonen schneller entwickeln als bei 26 °C. Barrionuevo et al. (1999) und Jacob et al. (2002) stellten fest, dass es einerseits keine signifikanten Unterschiede des Körpergewichts und der Körperlänge in den ersten vier Entwicklungstagen bezüglich unterschiedlicher Temperaturen gibt, andererseits sich aber die Herzschlagrate und der Sauerstoffverbrauch mit steigender Temperatur erhöht. Dies bietet aber keine Grundlage zur Annahme, dass die Embryonen befähigt sind früher die Eihülle zu durchbrechen. Desweiteren kam es in der Zucht zu Phasen in denen die Zebrabärblinge morgens schon sehr früh laichten und somit Eier höherer Entwicklungsstadien für den Sedimentkontakttest zum Einsatz kamen. Generell dürfen Fischeier nur bis zum 128-Zell Stadium eingesetzt werden (DIN 2009). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass ein zeitlicher Entwicklungsvorsprung von max. 1¼ h (Zeit zwischen dem 4-Zell Stadium und dem 128-Zell Stadium) ausreicht um die Embryonen 24 Stunden früher als normal schlüpfen zu lassen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diesbezüglich keine weiteren Versuche durchgeführt werden.

Aus den Ergebnissen der Fischei-Sedimentkontaktteste geht weiter hervor, dass die Anzahl der zu früh geschlüpften Embryonen mit steigender Bewegungsfrequenz zurück ging, die Mortalität hingegen stieg. Im Versuch (15) *Sediment (Fischerhof), 110 UpM* ging die Anzahl der früher geschlüpften Embryonen ($n = 9$) auf circa ein Drittel der Anzahl des Versuchs (13) *Sediment (Fischerhof), 70 UpM* ($n = 30$) zurück. Die Mortalität stieg von 0 % auf 18 %. Die während des Schüttelns auf die Fischeier

Diskussion

einwirkende Reibung könnte deren Hülle schwächen, oder diese durch spitze Ecken am Quarzsand beschädigen. Die geschwächte Fischeihülle könnte so mit weniger Kraftaufwand in einem früheren Entwicklungsstadium durchbrochen werden. Auch wäre es denkbar, dass schnellere Bewegungsfrequenzen die Eihüllen soweit beschädigen, dass es zu letalen Effekten, wie der Koagulation des Eis kommt. Aussagen über die Möglichkeit, dass sedimentgebundene Nährstoffe die Entwicklung der Embryonen begünstigt, oder dass durch das aneinanderreiben des Sediments toxisch wirkende Substanzen remobilisiert und in die Wasserphase gelöst werden, können nicht getroffen werden. Laboruntersuchungen zu der Sedimentzusammensetzung wurden im Rahmen dieser Bachelorarbeit nicht durchgeführt.

„Sedimente sind ein integraler Bestandteil des aquatischen Ökosystems. Ihre Bedeutung umfasst unter anderem ... als Ort der Nährstoffremobilisierung, als Laichgrundlage für Fische ...“ (Zitat: HEISE et al. 2007) *„Als suspendiertes Material kommen sie mit verschiedensten Schadstoffquellen im Einzugsgebiet in Kontakt, akkumulieren Schadstoffe und exponieren dadurch Organismen ...“* (Zitat: HEISE et al. 2007).

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Bewegungsfrequenzen durchgeführt, um die Auswirkungen des Quarzsandes auf die Fischeier genauer zu untersuchen. Bei 110 UpM wurde die größte Mortalität von 8 % festgestellt. Dies gilt nicht als Auffällig (DIN 2009). Auch durch die in vorherigen Versuchen durchgeführten Negativ-Sedimentkontrollen konnte kein Zusammenhang der letalen Effekte durch eine Erhöhung der Bewegungsfrequenz nachweisen werden.

Da nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob letale Effekte von mechanischen Einwirkungen des Quarzsandes, oder von im Sediment vorhandenen toxischen Substanzen ausgehen, sollten in Zukunft weitere Versuche zur Sicherstellung der Mindestsauerstoffkonzentration im Fischei-Sedimentkontakttest durchgeführt werden. Eine Möglichkeit, einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten, wäre das von GROTE et al. (2004) verwendete Belüftungssystem. Es wird kontinuierlich Sauerstoff in die Proben eingetragen. ROCHA et al. (2011) führen eine Vorinkubation des Sediments durch. Hierbei wird das Sediment 72 Stunden vor Versuchsbeginn mit Verdünnungswasser überlagert. Die sauerstoffzehrenden Prozesse im Sediment

Diskussion

kommen vor Test beginn zum Erliegen (ROCHA et al. 2011). Wie lange eine Vorinkubation durchzuführen ist hängt von den jeweiligen Sedimentzusammensetzungen ab. Versuche mit Hamburger Sedimente wären in Zukunft durchzuführen um festzustellen, ob die Methodik der Vorinkubation zum Erfolg führt. Hierzu sollten kontinuierliche Sauerstoffmessung über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden um den Zeitpunkt zu bestimmen, ab dem ein Sediment seine Sauerstoffzehrende Eigenschaft verliert, oder nur noch wenig Sauerstoff verbraucht. Bei beiden Methoden wirken keine mechanischen Kräfte auf die Fischeier. Nicht sicher ist, ob ein größerer Versuchsmaßstab zu einer gewünschten Sicherstellung der Mindestsauerstoffkonzentration beiträgt. Hingegen ein größeres Volumen des Überstandswassers mehr Sauerstoff lösen könnte bzw. dem Sediment zu Verfügung stellen könnte. Dies schließt aber nicht aus, dass sich direkt über dem Sediment ein Milieu mit hypoxischen Bedingungen bildet. Desweiteren könnten Sedimente mit der Zugabe von Quarzsand oder Verdünnungswasser verdünnt werden (HOLLERT 2004, KEITER 2007). Es wäre möglich die Sauerstoffzehrung durch das richtige Sediment/Quarzsand- Verhältnis so zu verringern, dass die Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser ausreicht um eine normale Entwicklung der Fischembryonen zu gewährleisten. Nachteil einer Verdünnung ist, dass mit dem Einsatz kleinerer Sedimentkonzentrationen auch die von ihnen ausgehenden toxischen Wirkungen ebenfalls verringert werden und keine letalen Effekte an den Fischembryonen mehr festgestellt werden.

Der erste Entwurf der Standardarbeitsanweisung (SOP) konnte während dieser Arbeit überarbeitet und ergänzt werden. Dieser befindet sich im Anhang. Die Reinigung der 20 ml Kristallisierschalen wurde als neues Kapitel in die SOP aufgenommen. Um die Kontamination durch Probenrückstände älterer Proben zu vermeiden muss eine bestimmte Reihenfolge der Reinigung einzuhalten werden. Desweiteren gibt es noch immer offene Fragen zum messen der abiotischen Parameter im Überstandswasser. Eine Mikrosauerstoffsonde zum messen des Sauerstoffgehalts konnte besorgt werden. Weitere Versuche für das erfassen des pH-Werts und der elektrischen Leitfähigkeit sollten in Zukunft angegangen werden. Ein großer Punkt bleibt jedoch weiterhin die Sauerstoffversorgung der Fischembryonen während des Sedimentkontakttests. Stellt sich heraus, dass die Erhöhung der Bewegungsfrequenz auf 90 UpM letale Schäden an

Diskussion

den Fischeiern hervorruft, müsste ein Belüftungssystem (GROTE 2004) installiert, oder eine Vorinkubation des Sediments (ROCHA et al. 2011) durchgeführt werden. Weiterhin sollte, wie in der Toxikologie üblich, die Durchführung des Sedimentkontakttests mit Verdünnungsstufen eingeführt werden. Gänzlich ungeklärt blieb, ob die Lagerdauer der gefriergetrockneten Sedimente Auswirkung auf die Toxizität der Sedimente hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Wahl für die PreSens Microx TX 3 Sauerstoffmesssonde ein wichtiger Schritt zur Erfassung und Sicherstellung des Sauerstoffgehalts im Fischei-Sedimentkontakttest vollzogen wurde. Trotz einiger offenen Fragen, vor allem im Bereich der letalen Schäden an Fischeiern durch die Erhöhung der Bewegungsfrequenz, konnten wichtige Informationen über die Sauerstoffverteilung im Überstandswasser gewonnen werden.

Zusammenfassung

In Sedimenten mit einem hohen organischen Anteil laufen vermehrt sauerstoffverbrauchenden Bakterielle Abbauprozesse ab. Diese Sedimente gelten als Sauerstoffzehrend und sind verantwortlich für eine mangelnde Sauerstoffversorgung der Fischembryonen im Fischei-Sedimentkontakttest. Die hierdurch verzögerte Embryonalentwicklung lässt nur bedingt Aussagen zu, ob auftretende letale Effekte toxischen Wirkungen Schadstoffen zuzuweisen sind. Das Ziel dieser Bachelorarbeit war die Erfassung und die Sicherstellung einer Mindestsauerstoffkonzentration im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttests. Diese Arbeit wurde am Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) angefertigt.

Zunächst wurden zwei Mikrosonden-Messsysteme auf dem Markt gesucht und auf die Labortauglichkeit im Routinebetrieb getestet. Zur Auswahl standen eine Clark-Messsonde von der Firma UniSense (Aarhus N, Dänemark) und eine LDO-Messsonde von der Firma PreSens (Regensburg, Deutschland).

Bei Versuchen zur Verteilung der Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser des Fischei-Sedimentkontakttest kam es zu großen Konzentrationsunterschieden zwischen der Wasseroberfläche und der Wasserphase direkt über dem Sediment, wo sich die Fischeier befinden. Während nachgewiesen werden konnte, dass vom Verdünnungswasser, den Positiv-Kontrollen und vom Quarzsand keine Sauerstoffzehrung ausgeht, stellte sich bei Versuchen mit Sedimentproben aus der Bille (Fischerhof) ein Konzentrationsunterschied von bis zu 6 mg O₂/l ein. Durch die Erhöhung der Schüttelfrequenz eines Horizontalschüttlers konnte schließlich Sauerstoff eingetragen werden und eine ausreichende Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser sichergestellt werden.

Versuche, die speziell die Auswirkungen der Schüttelfrequenzen auf die Fischeier untersuchten, ergaben, dass mit dem Anstieg der Schüttelfrequenz auch die Häufigkeit der letalen Effekte bei den Embryonen des Zebraärlblings anstieg.

Literaturverzeichnis

ALABASTER, J.S. & LLOYD, R. (1980): Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths, London and Boston, FAO-EIFAC. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie 66/3 S. 443. doi: 10.1002/iroh.19810660329

ALABASTER, J. S., SHURBEN, D. G., MALLETT, M. J. (1979): The survival of smolts of salmon *Salmo salar* L. at low concentrations of dissolved oxygen. Journal of Fish Biology 15/1. S. 1-8. doi: 10.1111/j.1095-8649.1979.tb03567.x

ARNI, A. (1995): Grundkurs Chemie II: Organische Chemie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. ISBN-13: 978-3-527-29229-5

AQUARIUM-GUIDE.DE (2013): <http://www.aquarium-guide.de/zebrabaerbling.htm> (Stand: 26.08.2013)

BANG, A., GRONKJAER, P., MALTE, H. (2004): Individual variation in the rate of oxygen consumption by zebrafish embryos. Journal of Fish Biology 64. S. 1285-1296. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00391.x

BARRIONUEVO, W. R. & BURGGREN, W. W. (1999): O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂. Department of Biological Sciences. University of North Texas. Denton. Texas 76203-5220. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 265. S. R505-R513. <http://ajpregu.physiology.org/content/276/2/R505.full.html> (Stand: August 2013)

BARRIONUEVO, W. R., FERNANDES, M. N., ROCHA, O. (2010): Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. Brazilian Journal of Biology 70/2. S. 425-434. <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v70n2/27.pdf> (Stand: August 2013)

BEUTH.DE. (2013): <http://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-15088/113162875> (Stand: August 2013)

BOHL, M. (1999): Warnung von gefährlichem Krebshandel!. Fischer und Teichwirt. Jahrgang 50/11. S. 437

BRAUNBECK, T., BOETTCHER, M., HOLLERT, H., KOSMEHL, T., LAMMER, E., LEIST, E., RUDOLF, M. SEITZ, N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. Aquatic Ecology and Toxicology Group. Department of Zoology. University of Heidelberg. D-Heidelberg. Altex 22. S. 87-102. http://www.altex.ch/resources/altex_2_2005_Braunbeck.pdf (Stand: August 2013)

CHAPMAN, P. M. (1990): The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. Elsevier Science Publishers B. V.. Amsterdam. The Science of the Total Environment 97/98. S. 815-825.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048969790902772> (Stand: August 2013)

FROESE, R. & PAULY, D. (2008): FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (02/2008)

CLARK, JR., L. C., WOLF, R., GRANGER, D., TAYLOR, Z. (1953): Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. Journal of Applied Physiology 6. S. 189-193.

<http://jap.physiology.org/content/6/3/189.full.pdf> (Stand: August 2013)

COLAS, H. (1988): Faustzahlen für Hobbyteichwirte und Fischzüchter. Fisch und Fang Taschenkalender. S. 191-204

CORTEMEGLIA, C. & BEITINGER, T.L. (2005): Temperature tolerances of wildtype and red transgenic zebra danios. Transactions of the American Fisheries Society 134/6. S. 1431-1437. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17374297> (Stand: August 2013)

de GROOT, S.J. (2002): A review of the past and present status of anadromous fish species in the Netherlands: is restocking the Rhine feasible?. Ecological Restoration of Aquatic and Semi-Aquatic Ecosystems in the Netherlands (NW Europe) S. 205-218. ISBN-13: 978-90-481-6174-4

DIN (1995): DIN 1319-1. Grundlagen der Messtechnik - Teil 1: Grundbegriffe. Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN (1998): DIN EN ISO 7346-3. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Teil 3: Durchflussverfahren (ISO 7346-3:1996). Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN (2009): DIN EN ISO 15088-6. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio). Deutsches Institut für Normung e.V.

EUROPÄISCHE UNION (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 327 vom 22. Dezember 2000. EG WRRL

EUROPÄISCHE UNION (2008): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien

Literaturverzeichnis

82/176/EWG, 83/513/EWG, 84/156/EWG, 84/491/EWG, 86/280/EWG und zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG

FENT, K. (2003): Ökotoxikologie - Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2. Auflage. ISBN-13: 978-31-310-9992-1

FREWEBS.COM (2012): Geschlechtliche Unterschiede Danio rerio
<http://www.freewebs.com/fish-master/Danio.jpg> (Stand: 19.11.2012)

GESTIS STOFFDATENBANK. (2013):
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/011850.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/011850.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) (Stand: 13.07.2013)

GESCHICHTSVEREIN-KOENGEN. (2012): <http://geschichtsverein-koengen.de/IndRevolution.htm#Deutschland> (Stand: 08.10.2012)

GRAW, J. (2010): Genetik. Springer Verlag. Heidelberg. S. 575. ISBN-13: 978-3-642-04998-9

GRILLITSCH, S., MEDGYESY, N., SCHWERTE, T., PELSTER, B. (2005): The influence of environmental pO₂ on hemoglobin oxygen saturation in developing zebrafish Danio rerio. The Journal of Experimental Biology 208. S. 309–316. doi: 10.1242/jeb.01410

GROTE, M., WALTER, H., ALTENBURGER, R. (2004): Toxizitätsuntersuchungen von Elbsedimenten in Kontakttest mit Lemna minor und Danio rerio. BfG Veranstaltungen: Statusseminar-Sedimentkontakttest. S. 25-35

HAMILTON, F. (1822): An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Fellow of the Royal Societies of London and Edinburgh. S. 323-324.
<http://archive.org/details/accountoffishesf00hami> (Stand: 26.08.2013)

Häck, M. (o.J.): Ein neuartiges optisches Verfahren zur Messung der Sauerstoffkonzentration im Wasser - Lumineszenz Dissolved Oxygen (LDO)

HEISE, S., KRÜGER, F., FÖRSTNER, U., BABOROWSKI, M., GÖTZ, R., STACHEL, B. (2007): Bewertung der Risiken durch Feststoffgebundene Schadstoffe im Elbeinzugsgebiet. Im Auftrag der Flussgebietsgemeinschaft Elbe und Hamburg Port Authority. Erstellt vom Beratungszentrum für integriertes Sedimentmanagement (BIS/TuTech) an der TU Hamburg-Harburg. S. 29. <http://bis.tutech.de/cms/?page=downloads> (Stand: 24.08.2013)

HELFMAN, G., COLLETTE, B., FACEY, D. E., BOWEN, B. W. (1997): The Diversity of Fishes. Blackwell Science, Malden, MA. 528 pp. ISBN 978-1-4051-2494-2

HOCHLEITHNER, M. (1996): Störe - Verbreitung, Lebensweise, Aquakultur. Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg. S: 202. ISBN 3-9500968-2-5

Literaturverzeichnis

HOLLERT, H., (2001): Entwicklung eines kombinierten Untersuchungssystems für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung von Fließgewässersedimenten und -schwebstoffen. Dissertation, Universität Heidelberg. <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/1602> (Stand: 26.08.2013).

HOLLERT, H., KOSMEHL, T., RUDOLF, M., KEITER, S., MANZ, W., REIFFERSCHIED, G., BRANUBECK, T. (2004): Ein neuer Sedimentkontakttest mit *Danio rerio* zum Nachweis des embryotoxischen und genotoxischen Potentials von nativen Sedimenten. BfG Veranstaltungen: Statusseminar-Sedimentkontakttest. S. 56-80.

IKSE (1991): Erstes Aktionsprogramm zur Reduzierung der Schadstofffrachten in der Elbe und ihrem Einzugsgebiet

INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT QUALITÄTSMANAGEMENTHANDBUCH (2009): Fischei-Test. SOP HU411.105, Version 03, 07.12.2009. S. 5

INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT QUALITÄTSMANAGEMENTHANDBUCH (2013): Fischei-Sedimentkontakttest. Bestimmung der Wirkung von Sedimentproben auf die Entwicklung von Fischeiern (Fischei-Sedimentkontakttest). Entwurf Version: 02

IGB-BERLIN. (2013): <http://www.igb-berlin.de/pressemitteilungen-nachrichten-alle/items/stoere-auf-dem-weg-in-der-elbe.html> (Stand: 18.07.2013)

JACOB, E., DREXEL, M., SCHWERTE, T., PELSTER, B. (2002): Influence of hypoxia and of hypoxemia on the development of cardiac activity in zebrafish larvae. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283. S. R911-R917. <http://ajpregu.physiology.org/content/283/4/R911> (Stand: 23.08.2013)

KAUTSKY H. (1939): Quenching of luminescence by oxygen, *Trans. Faraday Soc.*,35, S. 216-219. doi: 10.1039/TF9393500216

KEITER, S. (2007): Der Fischrückgang in der Donau – Ein Modell zur Bewertung der Belastung von Sedimenten. Dissertation, Universität Heidelberg. Seite 32-35. <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/7704/> (Stand: 24.08.2013)

KEHRER, A. (2008): Die Wirkung von Pharmaka und Pestiziden einzeln und in Kombination auf die Embryonalentwicklung des Zebrafischlings (*Danio rerio*). Dissertation, Universität Dresden. <http://d-nb.info/1008452866> (Stand: 25.08.2013)

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B., SCHILLING, T. F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203/3. S. 253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302

KOELLE-ZOO.DE (2013): <http://www.koelle-zoo.de/aquaristik/tiere-pflanzen/suesswasser/fsw-30-02b.jpg> (Stand: 09.06.2013)

- KÜSTER, E. & ALTENBURGER, R. (2008):** Oxygen Decline in Biotesting of Environmental Samples - Is There a Need for Consideration in the Acute Zebrafish Embryo Assay?. *Environ Toxicol* 23/6 S. 745-750. doi: 10.1002/tox.20377
- LANGE, MONICA, GEBAUER, W., MARKL, J., NAGEL, R. (1995):** Comparison of Testing Acute Toxicity on Embryo of Zebrafish an RTG-2 Cytotoxicity as Possible Alternatives to the Acute Fish Test. *Chemosphere* 30/11. S. 2087-2102.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004565359500088P> (Stand: 25.08.2013).
- LAWRENCE, C. (2007):** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*) A review. *Aquaculture* 269/1-4 S. 1-20.
- LICHTFUß, R. & BRÜMMER, G. (1977):** Schwermetallbelastung von Elbe-Sedimenten, Springer-Verlag, Naturwissenschaften 64/3. S. 122-125. doi: 10.1007/BF00450569
- MARTINOVIC, D., VILLENEUVE, D.L., KAHL, M. D., BLAKE, L. S., BRODIN, J. D., ANKLEY, G. T. (2009):** Hypoxia alters gene expression in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 95/4. S. 258–272. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.08.021
- MBM-LEHRMITTEL.DE (2013):** http://www.mbm-lehrmittel.de/images/articles/210-410-07-kristallisierschalen-aus-glas-500-ml-mit-ausguss-nach-din-12_1_5.jpg (Stand: 07.08.2013)
- MCCLURE, M.M., MCINTYRE, P.B., MCCUNE, A.R. (2006):** Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 69/2. S. 553–570. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x
- MÖLLER, H. & SCHOLZ, U. (1991):** Avoidance of oxygen-poor zones by fish in the Elbe River. *Journal of Applied Ichthyology* 7/3. S. 176-182. doi: 10.1111/j.1439-0426.1991.tb00524.x
- MULLINS, M.C., HAMMERSCHMIDT, M., HAFFTER, P, NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1994):** Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* 4/3. S. 189-202. doi:10.1016/S0960-9822(00)00048-8
- OTTO S. A. & ZAHN, S. (2008):** Temperatur- und Sauerstoff-Toleranz ausgewählter Wanderfischarten der Elbe
- PADILLA, P. A. & ROTH, M. B. (2001):** Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98/13. S. 7331-7335. www.pnas.org/ycgi/doi/10.1073/pnas.131213198 (Stand: 25.08.2013)
- POPMA, T. & MASSER, M. (1999):** Tilapia: life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center Publication 283.
<https://srac.tamu.edu/index.cfm/event/getFactSheet/whichfactsheet/53/> (Stand: 26.08.2013)

PRESENS. (2006): Instruction Manual Microx TX3.

http://www.loligosystems.com/upload/files/Microx_TX3.pdf (Stand: 26.08.2013)

PRESENS. (2013): Oxygen_Unit_Calculation_dv1_1.

<http://www.presens.de/support/download-center/tools-utilities.html>. Stand: August 2013

PRIVOLVNEV, T.I. (1954): Physiological adaptations of fishes to new conditions of existence.

Trudy Soveshch. Ikhtiol. Kom. Akademii Nauk SSSR 3. S. 40-49

RAASCH, C. (2011): Fischei-Sedimentkontakttest mit Embryonen des Zebraabärblings.

Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg). Masterarbeit.

www.hamburg.de/contentblob/3169628/data/masterarbeit-2011.pdf. Stand: August 2013

RAMSAY, J.M., FEIST, G.W., VARGA, Z.M., WESTERFIELD, M., KENT, M.L., SCHRECK, C.B. (2006):

Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*.

Aquaculture 258/1-4. S. 565-574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.020> (Stand 25.08.2013)

REVSBECH, N. P. (1989): An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.*

34/2. S. 474-478. http://aslo.org/lo/toc/vol_34/issue_2/0474.pdf (Stand: 26.08.2013)

ROCHA, P. S., BERNECKER, C., STRECKER, R., MARIANI, C. F., POMPEO, M. L. M., STORCH, V. HOLLERT, H., BRAUNBECK, T. (2011): Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to

assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74. S. 1951-1959. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.07.009.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802730> (Stand: 26.08.2013)

SADLER, K. (1979): Effects of temperature on the growth and survival of the European eel,

Anguilla anguilla L.. *Journal of Fish Biology* 15/4. S. 499-507. doi: 10.1111/j.1095-8649.1979.tb03633.x

SCHAEFER, J. & RYAN, A. (2006): Developmental plasticity in the thermal tolerance of

zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 69/3. S. 722-734. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01145.x

SCHÄPERCLAUS, W. (1990): Fischkrankheiten. Akademie-Verlag Berlin, 5. Auflage, Teil II:

509-1123.

SCHUBERT, F. (2012): Sensortechnik, HAW Hamburg Fakultät Technische Informatik, S.16

SCHULTE, C. (1997): Entwicklung und Validierung einer Methode zur Ermittlung der

Toxizität von Chemikalien gegenüber Embryonen von *Brachydanio rerio*. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität Mainz.

SEVERINGHAUS, J. W. & ASTRUP, P. B. (1986): History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. *Journal of Clinical Monitoring and Computing* 2/2. S. 125-139.
doi: 10.1007/BF01637680

SPENCE, R. & FATEMA, M. K., REICHARD, M., HUQ, K. A., WAHAB, M. A., AHMED, Z. F., SMITH, C. (2006): The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh, *Journal of Fish Biology* 69/5. S. 1435-1448. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. (2007): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83/1. S. 13-34.
doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

SPENCE, R., & SMITH, C. (2006): Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Frontiers in Zoology* 3. S. 5.
doi:10.1186/1742-9994-3-5

SPORS, J. (2001): Vergleich von Messmethoden für photosynthetische Gasflüsse und Entwicklung eines neuen ortsauflösenden Verfahrens mit dem Massenspektrometer. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. http://www.zbm.uni-kiel.de/aghansen/Abschlussarbeiten/spors_dipl.pdf (Stand: 26.08.2013)

STALLKNECHT, H. (1994): Barben und Bärblinge, Bissendorf, ISBN: 389356179X

STRECKER, R. (2008): Untersuchung zum Sauerstoffbedarf des Zebrabärblings (*Danio rerio*) im Sedimentkontakttest. Diplomarbeit. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/14839/1/Strecker%20Dissertation.pdf> (Stand: 26.08.2013)

STRECKER, R., SEILER, T.-B., HOLLERT, H., BRAUNBECK, T. (2011): Oxygen requirements of zebrafish embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 153/3. S. 318-327.
doi: 10.1016/j.cbpc.2010.12.002

TURNPENNY, A. W. H., CLOUGH, S. C., HOLDEN, S.D.J., BRIDGES, M., BIRD, H., O'KEEFE, N.J., JOHNSON, J., EDMONDS, M., HINKS, C. (2004): Tideway Strategy: Experimental studies on the dissolved oxygen requirements of fish. FCR 374/04 Babbie Aquatic (FARL)

UNISENSE.COM (2012): UniSense OX-500 Sonde.
http://www.unisense.com/files/Images/Sensorbilleder/RD-500_900x430.jpg (Stand: 19.11.2012)

UNISENSE.COM (2013): <http://www.unisense.com/O2/> (Stand: 13.07.2013)

VOBACH, M., KAMMANN, U. (2003): Der Fischei-Test – Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen. *Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch* 50/3. S. 126-130.
http://aquaticcommons.org/3104/1/03-3_Seite126-130_bf.pdf (Stand: 24.08.2013).

WALDEHOE.AT (2013):

http://www.waldehoe.at/WebRoot/Store14/Shops/63564413/5009/9ABB/3203/6527/5AE3/COA8/28B9/88ED/Becherglas_1000_ml.JPG (Stand: 24.08.2013)

WOLTER, C. & ARLINGHUS, R. (2003): Fische & Fischerei in Berlin. Zeitschrift für Fischkunde, Suppl.Bd. 2, 164pp.

WTW (2002): Operating manual CelloX 325.

<http://www.globalw.com/downloads/WQ/cellox325.pdf> (Stand: 26.08.2013)

WTW (2010): Operating manual FDO 925.

<http://www.globalw.com/downloads/WQ/FDO925.pdf> (Stand: 26.08.2013)

YAQOOB, N. & SCHWERTE, T. (2010): Cardiovascular and respiratory developmental plasticity under oxygen depleted environment and genetically hypoxic zebrafisch (Danio rerio).

Comparative Biochemistry and Physiology 154/4. S. 475-484.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.033> (Stand: 26.08.2013)

ZIERFISCHVERZEICHNIS.DE (2012):

http://www.zierfischverzeichnis.de/klassen/pisces/cypriniformes/cyprinidae/danio_reio.htm (Stand: 19.11.2012)

Anhang

Übersicht

ANHANG I.	MAXIMAL IM WASSER GELÖSTE SAUERSTOFFKONZENTRATION IN ABHÄNGIGKEIT DER TEMPERATUR BEI NORMDRUCK	II
ANHANG II.	ERGEBNISSE: VERSUCH (12) SEDIMENT (FISCHERHOF), OHNE BEWEGUNG	III
ANHANG III.	ERGEBNISSE: VERSUCH (13) SEDIMENT (FISCHERHOF), 70 UPM.....	IV
ANHANG IV.	ERGEBNISSE: VERSUCH (14) SEDIMENT (FISCHERHOF), 90 UPM.....	V
ANHANG V.	ERGEBNISSE: VERSUCH (15) SEDIMENT (FISCHERHOF), 110 UPM.....	VI
ANHANG VI.	ERGEBNISSE: VERSUCH (A) QUARZSAND, 50 UPM	VII
ANHANG VII.	ERGEBNISSE: VERSUCH (B) QUARZSAND, 70 UPM.....	VIII
ANHANG VIII.	ERGEBNISSE: VERSUCH (C) QUARZSAND, 90 UPM.....	IX
ANHANG IX.	ERGEBNISSE: VERSUCH (D) QUARZSAND, 110 UPM	X
ANHANG X.	ERGEBNISSE: VERSUCH (E) QUARZSAND, 130 UPM	XI
ANHANG XI.	ERGEBNISSE: VERSUCH (16), SEDIMENT (FISCHERHOF) SOP, 90 UPM	XII
ANHANG XII.	2. ENTWURF: STANDARD OPERATING PROCEDURE – SOP.....	XIII

Anhang

Anhang I. Maximal im Wasser gelöste Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit der Temperatur bei Normdruck

Anhang I Maximal im Wasser gelöste Sauerstoffkonzentration [mg/l] in Abhängigkeit der Temperatur bei Normdruck (1013 hPa)

°C	,0	,1	,2	,3	,4	,5	,6	,7	,8	,9
0	14,64	14,60	14,55	14,51	14,47	14,43	14,39	14,35	14,31	14,27
1	14,23	14,19	14,15	14,10	14,06	14,03	13,99	13,95	13,91	13,87
2	13,83	13,79	13,75	13,71	13,68	13,64	13,60	13,56	13,52	13,49
3	13,45	13,41	13,38	13,34	13,30	13,27	13,23	13,20	13,16	13,12
4	13,09	13,05	13,02	12,98	12,95	12,92	12,88	12,85	12,81	12,78
5	12,75	12,71	12,68	12,65	12,61	12,58	12,55	12,52	12,48	12,45
6	12,42	12,39	12,36	12,32	12,29	12,26	12,23	12,20	12,17	12,14
7	12,11	12,08	12,05	12,02	11,99	11,96	11,93	11,90	11,87	11,84
8	11,81	11,78	11,75	11,72	11,69	11,67	11,64	11,61	11,58	11,55
9	11,53	11,50	11,47	11,44	11,42	11,39	11,36	11,33	11,31	11,28
10	11,25	11,23	11,20	11,18	11,15	11,12	11,10	11,07	11,05	11,02
11	10,99	10,97	10,94	10,92	10,89	10,87	10,84	10,82	10,79	10,77
12	10,75	10,72	10,70	10,67	10,65	10,63	10,60	10,58	10,55	10,53
13	10,51	10,48	10,46	10,44	10,41	10,39	10,37	10,35	10,32	10,30
14	10,28	10,26	10,23	10,21	10,19	10,17	10,15	10,12	10,10	10,08
15	10,06	10,04	10,02	9,99	9,97	9,95	9,93	9,91	9,89	9,87
16	9,85	9,83	9,81	9,78	9,76	9,74	9,72	9,70	9,68	9,66
17	9,64	9,62	9,60	9,58	9,56	9,54	9,53	9,51	9,49	9,47
18	9,45	9,43	9,41	9,39	9,37	9,35	9,33	9,31	9,30	9,28
19	9,26	9,24	9,22	9,20	9,19	9,17	9,15	9,13	9,11	9,09
20	9,08	9,06	9,04	9,02	9,01	8,99	8,97	8,95	8,94	8,92
21	8,90	8,88	8,87	8,85	8,83	8,82	8,80	8,78	8,76	8,75
22	8,73	8,71	8,70	8,68	8,66	8,65	8,63	8,62	8,60	8,58
23	8,57	8,55	8,53	8,52	8,50	8,49	8,47	8,46	8,44	8,42
24	8,41	8,39	8,38	8,36	8,35	8,33	8,32	8,30	8,28	8,27
25	8,25	8,24	8,22	8,21	8,19	8,18	8,16	8,15	8,14	8,12
26	8,11	8,09	8,08	8,06	8,05	8,03	8,02	8,00	7,99	7,98
27	7,96	7,95	7,93	7,92	7,90	7,89	7,88	7,86	7,85	7,83
28	7,82	7,81	7,79	7,78	7,77	7,75	7,74	7,73	7,71	7,70
29	7,69	7,67	7,66	7,65	7,63	7,62	7,61	7,59	7,58	7,57
30	7,55	7,54	7,53	7,51	7,50	7,49	7,48	7,46	7,45	7,44
31	7,42	7,41	7,40	7,39	7,37	7,36	7,35	7,34	7,32	7,31
32	7,30	7,29	7,28	7,26	7,25	7,24	7,23	7,21	7,20	7,19
33	7,18	7,17	7,15	7,14	7,13	7,12	7,11	7,09	7,08	7,07
34	7,06	7,05	7,04	7,02	7,01	7,00	6,99	6,98	6,97	6,96
35	6,94	6,93	6,92	6,91	6,90	6,89	6,88	6,87	6,85	6,84
36	6,83	6,82	6,81	6,80	6,79	6,78	6,77	6,75	6,74	6,73
37	6,72	6,76	6,70	6,69	6,68	6,67	6,66	6,65	6,64	6,63
38	6,61	6,60	6,59	6,58	6,57	6,56	6,55	6,54	6,53	6,52
39	6,51	6,50	6,49	6,48	6,47	6,46	6,45	6,44	6,43	6,42
40	6,41	6,40	6,39	6,38	6,37	6,36	6,35	6,34	6,33	6,32

Anhang

Anhang II. Ergebnisse:

Versuch (12) Sediment (Fischerhof), ohne Bewegung

Anhang II Versuch (12) Positiv- und Negativkontrolle sowie Sediment (Fischerhof)

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), ohne Bewegung							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	3	-	2
	2	-	-	-	4	-	1
	3	-	-	-	5	-	-
	4	-	-	-	5	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	4	-	1
	2	-	-	-	4	-	1
	3	-	-	-	3	-	2
	4	-	-	-	5	-	-

Negativ-Kontrolle, ohne Bewegung							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Sediment (Fischerhof), ohne Bewegung							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 25 Mortalität = 4 %	1	-	4	3*24 1*12	1	-	-
	2	-	5	2*24 1*12 2*8	-	-	-
	3	-	5	1*12 4*8	-	-	-
	4	-	5	3*24 1*18 1*12	-	-	-
	5	-	5	2*24 3*18	-	-	-
Summe		-	24		1	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang III. Ergebnisse:

Versuch (13) Sediment (Fischerhof), 70 UpM

Anhang III Versuch (13) Positiv- und Negativkontrolle sowie Sediment (Fischerhof), 70 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	3	-	2
	2	-	-	-	4	-	1
	3	-	-	-	5	-	-
	4	-	-	-	5	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	4	-	1
	2	-	-	-	4	-	1
	3	-	-	-	3	-	2
	4	-	-	-	5	-	-

Negativ-Kontrolle, 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Sediment (Fischerhof), 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	5	-	-	-	-	-
	2	2	3	-	-	-	-
	3	4	1	-	-	-	-
	4	3	2	-	-	-	-
	5	4	1	-	-	-	-
	6	4	1	-	-	-	-
	7	2	3	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	3	2	-	-	-	-
	10	3	2	-	-	-	-
Summe		30	20		-	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Frühschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koagulierte Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang IV. Ergebnisse:

Versuch (14) Sediment (Fischerhof), 90 UpM

Anhang IV Versuch (14) Positiv- und Negativkontrolle sowie Sediment (Fischerhof), 90 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	-	-	5
	2	-	-	-	2	-	3
	3	-	-	-	2	-	3
	4	-	-	-	2	-	3
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	1	-	4
	2	-	-	-	1	-	4
	3	-	-	-	1	-	4
	4	-	-	-	1	-	4

Negativ-Kontrolle, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	4	-	1	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Sediment (Fischerhof), 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 8 %	1	-	4	-	1	-	-
	2	1	4	-	-	-	-
	3	3	2	-	-	-	-
	4	1	4	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	3	1	-	1	-	-
	8	1	4	-	-	-	-
	9	5	-	-	-	-	-
	10	3	-	-	-	2	-
Summe		17	29		4	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Frühschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koagulierte Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang V. Ergebnisse: Versuch (15) Sediment (Fischerhof), 110 UpM

Anhang V Versuch (15) Positiv- und Negativkontrolle sowie Sediment (Fischerhof), 110 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	2	-	3
	2	-	-	-	2	-	3
	3	-	-	-	2	-	3
	4	-	-	-	5	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	-	-	5
	2	-	-	-	-	-	5
	3	-	-	-	2	-	3
	4	-	-	-	1	-	4

Negativ-Kontrolle, 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 10 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	3	-	2	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	4	-	1	-	-

Sediment (Fischerhof), 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 18 %	1	3	2	-	-	-	-
	2	1	3	-	1	-	-
	3	-	3	-	2	-	-
	4	1	2	-	2	-	-
	5	2	3	-	-	-	-
	6	-	3	-	1	1	-
	7	1	3	-	1	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	1	3	-	-	1	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		9	32		7	2	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Frühschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koagulierte Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang VI. Ergebnisse: Versuch (a) Quarzsand, 50 UpM

Anhang VI Versuch (a) Positiv- und Negativkontrolle sowie Quarzsand, 50 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 50 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 25 Mortalität = 92 %	1	-	1	-	-	-	4
	2	-	1	-	2	1	1
	3	-	-	-	3	1	1
	4	-	-	-	-	1	4
	5	-	-	-	4	-	1
Quarzsand Kontrolle n = 25 Mortalität = 92 %	1	-	-	-	1	-	4
	2	-	-	-	5	-	-
	3	-	1	-	1	-	3
	4	-	1	-	-	-	4
	5	-	-	-	-	-	5

Negativ-Kontrolle, 50 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 25 Mortalität = 8 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	4	-	1	-	-
	5	-	4	-	1	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 25 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-

Quarzsand, 50 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 2 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	49		1	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang VII. Ergebnisse: Versuch (b) Quarzsand, 70 UpM

Anhang VII Versuch (b) Positiv- und Negativkontrolle sowie Quarzsand, 70 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	3	-	2
	2	-	-	-	1	-	4
	3	-	-	-	1	1	3
	4	-	-	-	1	1	3
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	2	2	1
	2	-	-	-	1	-	4
	3	-	-	-	1	1	3
	4	-	-	-	1	2	2

Negativ-Kontrolle, 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 10 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 10 %	1	-	4	-	1	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Quarzsand, 70 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 2 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	4	-	1	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	49		1	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang VIII. Ergebnisse: Versuch (c) Quarzsand, 90 UpM

Anhang VIII Versuch (c) Positiv- und Negativkontrolle sowie Quarzsand, 90 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	2	2	1
	2	-	-	-	3	-	2
	3	-	-	-	4	-	1
	4	-	-	-	4	1	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	3	1	1
	2	-	-	-	3	1	1
	3	-	-	-	3	1	1
	4	-	-	-	3	1	1

Negativ-Kontrolle, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 4 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	-	-	1
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-

Quarzsand, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	50		-	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang IX. Ergebnisse: Versuch (d) Quarzsand, 110 UpM

Anhang IX Versuch (d) Positiv- und Negativkontrolle sowie Quarzsand, 110 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 95 %	1	-	-	-	-	-	5
	2	-	-	-	-	-	5
	3	-	-	-	1	2	2
	4	-	1	-	1	2	1
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 100 %	1	-	-	-	-	-	5
	2	-	-	-	-	-	5
	3	-	-	-	-	-	5
	4	-	-	-	1	-	4

Negativ-Kontrolle, 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	4	-	1	-	-

Quarzsand, 110 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 8 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	4	-	1	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	4	-	1	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	4	-	1	-	-
Summe		-	46		4	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang X. Ergebnisse: Versuch (e) Quarzsand, 130 UpM

Anhang X Versuch (e) Positiv- und Negativkontrolle sowie Quarzsand, 130 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l), 130 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 95 %	1	-	-	-	1	-	4
	2	-	-	-	1	-	4
	3	-	1	-	-	-	4
	4	-	-	-	-	-	5
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 90 %	1	-	1	-	1	-	3
	2	-	1	-	3	-	1
	3	-	-	-	-	-	5
	4	-	-	-	1	-	4

Negativ-Kontrolle, 130 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 5 %	1	-	4	-	1	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Quarzsand, 130 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
	5	-	5	-	-	-	-
	6	-	5	-	-	-	-
	7	-	5	-	-	-	-
	8	-	5	-	-	-	-
	9	-	5	-	-	-	-
	10	-	5	-	-	-	-
Summe		-	50		-	-	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Frühschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)

Anhang

Anhang XI. Ergebnisse:

Versuch (16), Sediment (Fischerhof) SOP, 90 UpM

Anhang XI Versuch (16) Positiv- und Negativkontrolle sowie Sediment (Fischerhof) SOP, 90 UpM

Positiv-Kontrolle 3,4-DCA (3,7 mg/l) SOP, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 70 %	1	-	1	-	3	-	1
	2	-	1	-	4	-	-
	3	-	3	-	2	-	-
	4	-	1	-	4	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 75 %	1	-	1	-	4	-	-
	2	-	4	-	1	-	-
	3	-	-	-	4	-	1
	4	-	-	-	5	-	-

Negativ-Kontrolle SOP, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
wässrige Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	1	4	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	-	5	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-
Quarzsand Kontrolle n = 20 Mortalität = 0 %	1	-	5	-	-	-	-
	2	-	5	-	-	-	-
	3	1	4	-	-	-	-
	4	-	5	-	-	-	-

Sediment (Fischerhof) SOP, 90 UpM							
	Nr.	F	N	U*hpf	K	S	H
n = 50 Mortalität = 4 %	1	2	3	-	-	-	-
	2	4	1	-	-	-	-
	3	5	-	-	-	-	-
	4	3	2	-	-	-	-
	5	-	4	-	-	1	-
	6	3	2	-	-	-	-
	7	3	1	-	-	1	-
	8	4	1	-	-	-	-
	9	2	3	-	-	-	-
	10	2	3	-	-	-	-
Summe		28	20		-	2	-

Legende:

Mortalität: Sterberate in Prozent der Gesamtindividuen, **F:** Fröhschlupf, **N:** normal entwickelter Embryo, **U*hpf:** Anzahl und Entwicklungsstand unterentwickelter Embryonen (Stunden nach Befruchtung), **K:** koaguliertes Ei (letal), **S:** keine Schwanzablösung (letal), **H:** kein Herzschlag (letal)



Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 1 von 13

Version: 02

Gültig ab:

Bestimmung der Wirkung von Sedimentproben auf die Entwicklung von Fischeiern (Fischei-Sedimentkontakttest)

Arbeitsexemplar für

- Arbeitsplatz
-

- SOP Sammlung HU41
- Zentrales QMH
- Regi

- Informationsexemplar (unterliegt nicht dem Änderungsdienst)

	Name	Datum	Unterschrift



Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 2 von 13

Version: 02

Gültig ab:

1 Inhaltsübersicht

1	Inhaltsübersicht	2
2	Geltungsbereich, Messverfahren, Verantwortlichkeiten	3
3	Chemikalien und Geräte	3
4	Probenahme, Probenkonservierung, Probenlagerung	5
5	Ansetzen, Lagerung und Handhabung der Standardlösungen und Reagenzien	7
7	Proben- und Testvorbereitung	9
8	Messung, Auswertung, Ergebnisse, Dokumentation	10
9	Qualitätssicherungsmaßnahmen	12
10	Gerätewartung, Wartungsintervalle	12
11	Hinweise zur Fehlersuche	12
12	Entsorgung von Proben, Reagenzien und Standards	13
13	Reinigung der Glaswaren (Kristallisierschalen)	13
14	Liste der Änderungen	13

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 3 von 13

Version: 02

Gültig ab:

2 Geltungsbereich, Messverfahren, Verantwortlichkeiten

Fische spielen als Konsumenten eine wichtige Rolle in aquatischen Nahrungsketten. Für den Fischei-Test dienen Eier des Zebraäbrblings (*Danio rerio*). Der Zebraäbrbling gehört innerhalb der Klasse der Knochenfische (*Osteichthyes*) zur Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*). Zebraäbrlinge können leicht gezüchtet werden und produzieren das ganze Jahr über Eier. Die Embryonalentwicklung ist in der Literatur gut beschrieben. Die Entwicklung der Fischembryonen kann durch Wasser- und Sedimentinhaltsstoffe beeinträchtigt werden.¹

Der Fischei-Sedimentkontakttest wird in Anlehnung an die DIN EN ISO 15088 – T6 (DIN 38415-6, Stand: Juni 2009) durchgeführt. Die Testdauer beträgt 48 Stunden bei einer Temperatur von 26°C. Als toxikologische Endpunkte dient der Tod der Embryonen durch Koagulation der Eier, die nicht erfolgte Schwanzablösung vom Dotter, der fehlender Herzschlag, eine fehlende Blutzirkulation und ein Herzödem.

Darüber hinaus ist die „Empfehlung für die Haltung, den Transport und das tierschutzgerechte Töten von Versuchsfischen“ der Tierärztlichen Vereinigung e.V. (Stand: Jan 2009) zu beachten.

Verantwortlich ist der biologische Laborbereich HU411. Er ist bei Unregelmäßigkeiten oder Fragen zu den Proben oder zu diesem Verfahren einzuschalten.²

3 Chemikalien und Geräte

CaCl₂ x 2 H₂O, p.a., z.B. Merck Art. 2382

MgSO₄ x 7 H₂O, p.a., z.B. Merck Art. 5886

KCl, p.a., z.B. Merck Art. 4936

NaHCO₃, p.a., z.B. Merck Art. 6329

3,4-Dichloranilin

Quarzsand (F36, Quarzwerke GmbH Frechen)

pH-Meter z.B. WTW 526 mit Elektrode z.B. Blue Line 23pH

Sauerstoff-Messgerät mit Thermometer PreSens Microx mit Sauerstoffsensoren z.B. TX 3

El. Leitfähigkeits-Messgerät mit Sensor z.B. WTW inoLab Cond Level 2³

HCl, 0,1 n, z.B. Merck Art 1.09060.1000

NaOH, 0,1 n, z.B. Merck Art 1.09137.1000

Inversmikroskop

Kaltlichtquelle

Horizontalschüttler

Kühlinkubator

¹ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

² Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

³ Die hier aufgeführten (markierten) Sensoren sollten durch Mikrosonden ersetzt werden.



Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 4 von 13

Version: 02

Gültig ab:

20 ml Kristallisierschalen, oder TC Testplate mit 6 Wells z.B. Renner GmbH Nr. 38040 (Zellkulturplatten aus Polystyrol)

Binokular

Parafilm (für Kristallisierschalen) bzw. Abdeckklebefolie (für Zellkulturplatten)

24-Well-Zellkulturplatte (ohne Beschichtung) für die Auswertung

Glastrichter und Papier-Filter, z.B. Schleicher & Schuell, Du. 15 cm (Nr. 311 645) und 32 cm (Nr. 3111653)

Pipette mit 500 –2500 µl und Pipettenspitzen

Einweg-Plastikpipette

Messkolben und Messzylinder 1ml, 10ml, 100ml

Salz für Artemienzucht (normales handelsübliches Speisesalz oder Meersalz)

div. Aquarien mit Laichschalen, Kunstpflanzen, Futterautomaten und Außenfilter

Edelstahlsieb

Aktivkohlepatrone und Kupfer-Ionen-Austauscher

Teststäbchen für Ammonium, Nitrit, Nitrat und Wasserhärte zur Überprüfung der Hälterungsaquarien (siehe Kap. 9).

Labortagebuch

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 5 von 13

Version: 02

Gültig ab:

4 Probenahme, Probenkonservierung, Probenlagerung

4.1 Gefriertrocknung⁴

Die Gefriertrocknung wird nach SOP HU412.012 durchgeführt.

Sedimente:

Überstehendes Wasser wird abdekantiert. Die Restprobe muss vor der Trocknung über ein 2 mm Sieb gesiebt werden.

Schwebstoffproben:

Überstehendes Wasser wird abdekantiert. Die Probe wird durch Rühren homogenisiert.

Abhängig von der weiteren geplanten Bearbeitung der Proben bzw. den zu bestimmenden Parametern werden unterschiedliche Gefäße für die Trocknung verwendet. In jedem Fall werden die Gefäße mit der Tagebuchnummer der jeweiligen Probe beschriftet.

Probe in die Edelstahlschale bis ca. 1 cm unter dem oberen Rand einfüllen, diese mit dem Sieb abdecken, um ein Verspritzen oder Verwirbeln der Proben im Trocknungsraum zu vermeiden (blauen Gummiring nicht vergessen).

Die Proben müssen vor der Trocknung auf mindestens -35 °C heruntergekühlt werden (Tiefkühlschrank), da die Proben sonst in der Gefriertrocknungsanlage verspritzen.

Anlage: Amsco Finn Aqua, Lyovac GT2

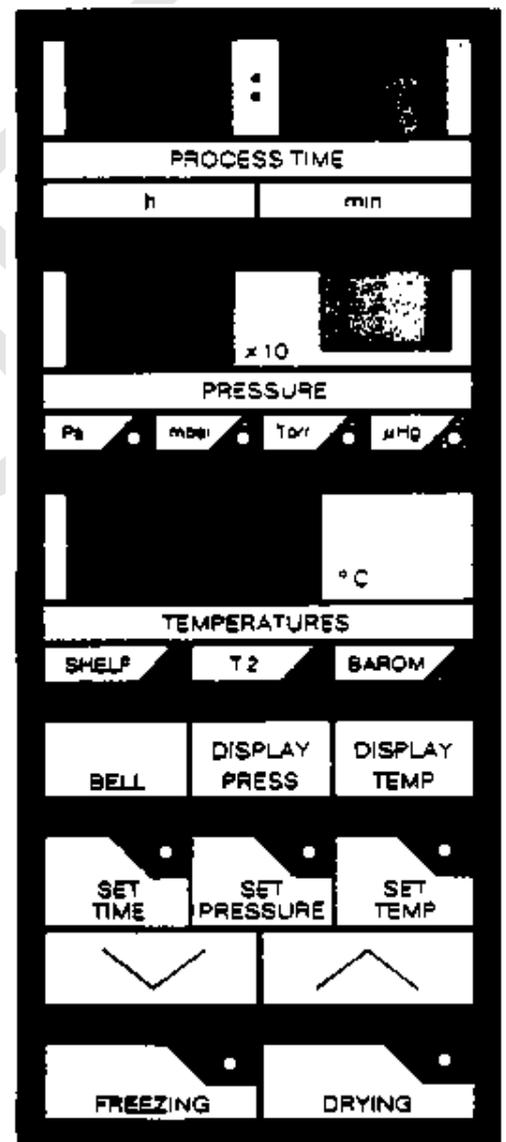
Einstellungen:

Die Pumpe wird immer mit Gasballast betrieben (Hebel an der Vorderseite auf „Gasballast“). Die Temperatur der Stellplatten soll immer auf -35 °C eingestellt sein (Überprüfung: <Display Temp> drücken, bis LED neben „Shelf“ leuchtet, dann <Set Temp> drücken). Die voreingestellte Temperatur wird blinkend angezeigt.

Vorbereitung der Gefriertrocknungsanlage:

Die Gefriertrocknungsanlage besitzt keinen Netzschalter, bleibt also immer im Standbybetrieb. Der Netzschalter der Pumpe bleibt immer eingeschaltet, die Pumpe wird über die Anlagenregelung gesteuert.

Vor dem Einsetzen der Proben muss die Vakuumpumpe ca. eine halbe Stunde warmlaufen und die Kühlschlangen müssen vorgekühlt werden:



⁴ Quelle: SOP H22.012 -02 vom 15.02.2005

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 6 von 13

Version: 02

Gültig ab:

Das Druckventil wird geschlossen, indem <Set Pressure> gedrückt (die „Pressure“-Anzeige blinkt) und mit den Pfeiltasten „A“ gewählt wird (liegt in der Liste unter dem niedrigsten Druck). Dann wird noch einmal <Set Pressure> gedrückt, die Anzeige wird konstant. Nun werden mit der Taste <Drying> die Pumpe und die Kältemaschine eingeschaltet.

Die Stellflächen für die Schalen werden bei Nichtgebrauch im Gefrierschrank gelagert und erst in das Gerät eingesetzt, wenn die Proben getrocknet werden sollen.

Dichtigkeitstest:

Der Dichtigkeitstest ist sehr wichtig, da von ihm abhängt, ob der Trocknungserfolg über den Druck kontrolliert werden kann!

Vor dem Test ist zu prüfen, ob noch Kondensat am Boden der Kühlkammer vorhanden ist. Dies muss über das Ablaufventil und/oder durch Auswischen entfernt werden.

Um die Dichtigkeit der Anlage zu prüfen, setzt man die Abdeckhaube auf, schließt Ablauf- und Belüftungsventil. Die Lochplatte zum Trennen von Kühlkammer und Trockenkammer wird mit dem Magnetschieber geöffnet.

Dann stellt man mit <Set Pressure> den Druck auf 1×10^{-3} mbar ein (Einheit beachten! Die LED neben „mbar“ muss leuchten).

Nach ca. einer halben Stunde sollte der Druck im Bereich 10^{-2} mbar liegen. Ist das nicht der Fall, so sollte eine Fehlerüberprüfung vorgenommen werden (sonst: siehe SOP H22.012 -02 vom 15.02.2005).

Liegt der Druck im gewünschten Bereich, so schließt man mit dem Magnetschieber die Lochplatte. Der Druck sollte in den nächsten fünf Minuten nur unwesentlich ansteigen und unter 10^{-1} mbar bleiben (sonst: siehe SOP H22.012 -02 vom 15.02.2005).

Danach wird die Anlage belüftet und die Abdeckhaube abgenommen.

Gefriertrocknung:

Die tiefgefrorenen Proben und die Stellflächen werden aus dem Gefrierschrank genommen, die Stellflächen werden in das Gestell eingesetzt und die Stecker für die Heizung angeschlossen. In eine der Stellflächen wird der Temperaturfühler zusammen mit etwas Wärmeleitpaste gesteckt.

Nun wird die Abdeckhaube aufgesetzt. Das Belüftungsventil und das Kondensatablaufventil werden geschlossen. Dann wird mit <Set Pressure> (s.o.) der Druck auf 1×10^{-2} mbar eingestellt. Das Druckventil öffnet sich hörbar. In der Druckanzeige erscheint die Meldung „PU“, bis ein Druck von weniger als 20 mbar erreicht wird. Dies muss innerhalb der nächsten 15 Minuten geschehen, anderenfalls gibt es ein Leck im System oder die Probe ist nicht ausreichend eingefroren worden, so dass sie bereits wieder angetaut ist.

Beenden der Gefriertrocknung:

Zur Überprüfung des Trocknungserfolgs schließt man die Lochplatte zwischen Kühl- und Trockenkammer. Steigt der Druck innerhalb der nächsten fünf Minuten nicht an, so ist die Trocknung abgeschlossen. Anderenfalls muss weiter getrocknet werden.

Die Gefriertrocknungsanlage wird mit der Taste <Drying> ausgeschaltet. Dann wird belüftet. Nach dem Abtauen der Kühlschlange wird das Kondensatwasser abgelassen.



Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 7 von 13

Version: 02

Gültig ab:

Die Proben werden entnommen und in eine geeignete Flasche gefüllt (Flasche mit der Tagebuchnummer beschriftet).

4.2 Quarzsand testen

Jede neue Charge Quarzsand muss auf schädigende Wirkung getestet werden. Dazu wird der neue Quarzsand als Probe getestet. Ist der Test unauffällig, kann der Quarzsand ohne weitere Behandlung verwendet werden. Sollten Effekte auftreten muss der Quarzsand gewaschen und noch einmal getestet werden.

Zum Waschen des Quarzsandes werden ungefähr 50 g Quarzsand in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit ca. 200 ml bidestilliertem Wasser 2 min lang geschüttelt. Anschließend erfolgen die vorsichtige Abdenkantierung des Wassers und die Wiederholung des Waschvorgangs. Danach wird der Quarzsand abgefiltert, in eine Abdampfschale überführt und das restliche Wasser über Nacht in einem Trockenschrank bei 110 °C verdampft.

5 Ansetzen, Lagerung und Handhabung der Standardlösungen und Reagenzien⁵

Alle Lösungen und Chemikalien deren Haltbarkeit begrenzt ist, sind auf dem Gebinde mit dem Haltbarkeitsdatum zu versehen, sofern das gültige Haltbarkeitsdatum nicht vom Hersteller aufgedruckt ist.

Zusammensetzung des Verdünnungswassers:

294,0 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

123,3 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

63,0 mg/l NaHCO_3

5,5 mg/l KCl

Vor Verwendung bis zur Sauerstoffsättigung (entspricht etwa 8 mg/l O_2) belüften (ca. 24 Stunden) und auf 26 +/- 1°C temperieren. Das Verdünnungswasser wird mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Herstellung der 3,4-Dichloranilin Stammlösung

0,05 g Dichloranilin in 500ml Verdünnungswasser 24h rühren, pH-Wert auf 7,0 einstellen.

Die Stammlösungen sind lichtgeschützt im Kühlschrank bis zu sechs Monate verwendbar.

⁵ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 8 von 13

Version: 02

Gültig ab:

6 Hälterung und Zucht ⁶

Die Zebrabärblinge können bezogen werden bei:

Umweltbundesamt

FG III 3.4 "Überwachungsverfahren Abwasser, Labor"

Dienstgebäude Marienfelde, Schichauweg 58, D - 12307 Berlin

Die Fische können dann im Labor weiter gezüchtet werden. Für die Eigewinnung werden nur Fische verwendet, die zwischen sechs und 24 Monate alt sind. Als Hälterungs- und Zuchtwasser wird Leitungswasser verwendet, das über eine Aktivkohlepatrone und einen Kupfer-Ionen-Austauscher gelaufen ist. Die Fische werden zweimal am Tag mit Trockenfutter mittels Futterautomat gefüttert. Montags, Mittwoch und Freitag mit kleineren Mengen selbstgezüchteten Artemien, und ggf. gefrorenen oder lebenden Mückenlarven oder anderen im Laborhandel erhältlichen Organismen gefüttert. Die Junglarven bekommen kleinste Mengen Staubfutter. Die Artemieneier werden im Kühlschrank (Raum 334), gefrorene Mückenlarven im Gefrierfach (Raum 334) gelagert.

Die Aquarien werden wöchentlich gereinigt.

Die Aquarien (auch die Becken für die Nachzucht) sind durchnummeriert. Es wird ein detailliertes Bestandsbuch mit Angaben zum Zugang und Verbleib der Tiere geführt (bei HU41133).

Die Wassertemperatur wird kontinuierlich in einem Aquarium mit einem Datalogger aufgezeichnet. Der Nitrit-, Nitrat- und Ammoniumgehalt wird wöchentlich in allen Aquarien bestimmt. pH-Wert und Sauerstoffgehalt werden zweimal wöchentlich gemessen. Da die Wasserhärte nur geringen Schwankungen unterliegt, reicht hier eine monatliche Messung aus. Die Dokumentation aller Messwerte erfolgt auf dem Formular SOP HU411.105-03_F01-02 (siehe auch Kapitel 9).

Am Nachmittag werden die Laichkästen mit den Pflanzenattrappen in die zwei separaten Laichaquarien gesetzt. Das umsetzen der Fische geschieht aus einem Aquarium pro Laichkasten im Verhältnis von 2:1 (Männchen : Weibchen) Erst hiernach wird gefüttert. Die Eiablage erfolgt in den ersten Stunden nach dem das Licht angeht.

Beim Teilwasserwechsel sollte die ausgetauschte Wassermenge nicht zu groß sein (ca. 1/3 des Beckenvolumen), um größere Schwankungen speziell der Wassertemperatur zu vermeiden. Ansonsten kann das Austauschwasser zuvor an Zimmertemperatur angeglichen werden.

⁶ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 9 von 13

Version: 02

Gültig ab:

7 Proben- und Testvorbereitung

Probenvorbereitung:

Tag vor der Eiablage:

Die Kontrollproben werden am Nachmittag vor dem tatsächlichen Versuchsbeginn vorbereitet. Dafür werden entweder 6-Well-Platten oder 20 ml Kristallisierschalen verwendet. Dabei sind die Glasschalen zu bevorzugen, da an diesen die Adhäsion und damit der Verlust organischer Substanzen reduziert werden. Die Nachteile der Kristallisierschalen sind, dass bei Proben mit möglichen vorhandenen Schwermetallen diese überproportional an das Glas sorbieren.

Es wird je 3 g Quarzsand in insgesamt acht Schalen eingewogen. Dabei werden vier der acht Schalen für die Quarznegativkontrollen und vier Schalen für die Quarzpositivkontrollen verwendet. Für die Genauigkeit der Einwaage hat sich ein Wert von 1% als sinnvoll herausgestellt ($3,00 \pm 0,03$ g). In die Schalen werden dann jeweils 4 ml Verdünnungswasser gegeben. Die Zugabe der 3,4-Dichloranilin-Lösung erfolgt für die Positivkontrollen des Quarzsands und der wässrigen Positivkontrollen erst am nächsten Tag. Die wässrigen Kontrollen werden in vier Negativkontrollen und vier Positivkontrollen aufgeteilt. Dafür werden je 4 ml Verdünnungswasser in die acht Schalen gegeben.

Für die vier Sedimentproben kann bereits 3 g Sediment in Kristallisierschalen eingewogen werden, mit Parafilm verschlossen und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

Anschließend werden alle Kontroll-Schalen mit Parafilm verschlossen und über Nacht im Kühlinkubator bei 26°C auf einem Horizontalschüttler bei 90 rpm geschüttelt, um eine ausreichende Sauerstoffsättigung zu gewährleisten.

Tag der Eiablage (Versuchstag):

Am Versuchstag müssen vor der Eiauswahl noch die Sedimentproben und Positivkontrollen vorbereitet werden. Für die vier Sedimentproben werden 4 ml Verdünnungswasser zugegeben. Bei einer höheren Wasseraufnahme des Sediments muss jedoch eine weitere Zugabe des Verdünnungswassers stattfinden. Als Richtwert sollten nach vollständiger Sättigung des Sediments mit dem Verdünnungswasser noch 2 ml Verdünnungswasser zugegeben werden.

Die Positivkontrollen werden mit 185 µl 3,4-Dichloranilin-Lösung (100 mg/l) versetzt. Die 3,4-Dichloranilin-Konzentration beträgt 3,7 mg/l. Dies entspricht dem LC_{70} -Wert von Fischeiern mit 3,4-Dichloranilin. Praktisch sollte die Mortalität jedoch zwischen 20% und 90% liegen. Bei den Quarzsandpositivkontrollen werden jedoch aufgrund der Bindung an die Quarzpartikel niedrigere Werte beobachtet.

Eigewinnung und Testaufbau

Die Laichschalen werden am Nachmittag vor dem Versuch in die Aquarien gestellt und dann am nächsten Morgen herausgenommen. Die Eier sind als kleine weißlich-hyaline Kügelchen zu erkennen. Unter dem Bino wird geprüft, ob mindestens 50 % der Eier befruchtet sind. Befruchtete Eier sind daran zu erkennen, dass im Ei erste Zellen ausgebildet sind (die erste

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 10 von 13

Version: 02

Gültig ab:

Zellteilung erfolgt bei 26 °C etwa 15 min nach der Befruchtung).⁷ Es ist sicherzustellen, dass sich die befruchteten Eier in einem Zellstadium zwischen 4 und 128 Zellen befinden.

Die Eier werden mit dem Sieblöffel in eine 100 ml Kristallierschale, die mit Verdünnungswasser gefüllt ist, überführt. Von dort werden jeweils fünf Eier mit einer 5 ml-Eppendorfpipette und einem Volumen von 1 ml in eines der Probenschalen (Sedimentproben und Negativkontrollen) überführt. Bei den Positivkontrollen werden je fünf Eier in 815 µl überführt. Die Schalen werden anschließend mit Parafilm verschlossen und bleiben für 48 h bei 26 °C Temperatur (+/- 1 °C) unter konstanten Bewegungen bei 90 rpm im Kühlinkubator.

Messung der abiotischen Parameter:

Es sind die el. Leitfähigkeit, der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt nach 48 h in allen Kontroll- und Sedimentproben zu messen.⁸

8 Messung, Auswertung, Ergebnisse, Dokumentation⁹

Nach 48 h werden die Embryonen unter Beleuchtung mit einer Kaltlichtquelle mit einer 5 ml Pipette vom Sediment gesammelt. Dabei können die fünf Eier gemeinsam überführt werden. Die Eier werden anschließend zur Auswertung auf eine 24-Wellplatte überführt. Mit dem Inversmikroskop wird jedes Ei auf seinen Entwicklungsstand untersucht. Dieser wird auf dem Testprotokoll protokolliert.

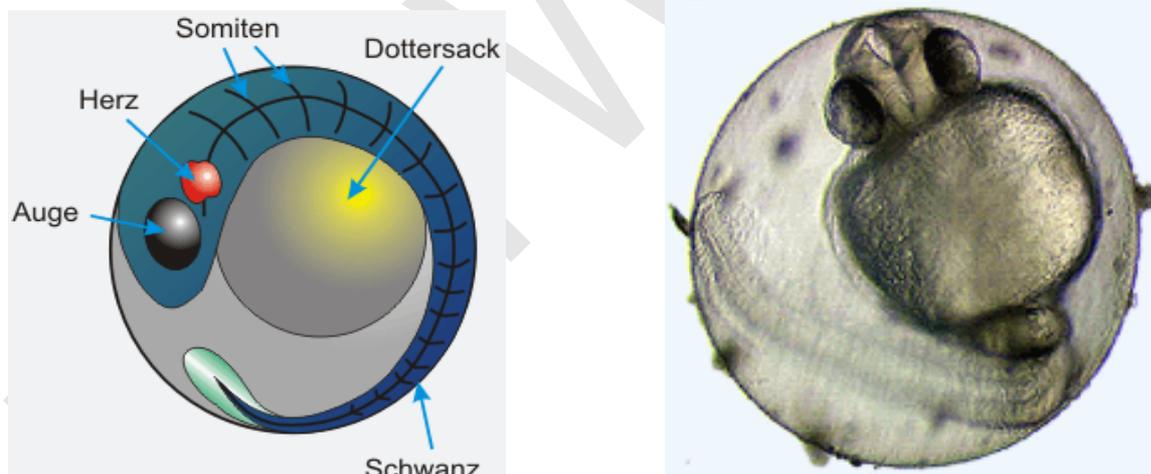


Abbildung 8.1 Schematischer Aufbau eines Fischembryos Embryo nach 48 Stunden

⁷ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

⁸ Die abiotischen Parameter müssen in Zukunft mit Mikrosonden gemessen werden. Dazu sollten verschiedene Versuche durchgeführt werden. Sauerstoffmessung mit der PreSens Microx TX 3

⁹ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 11 von 13

Version: 02

Gültig ab:

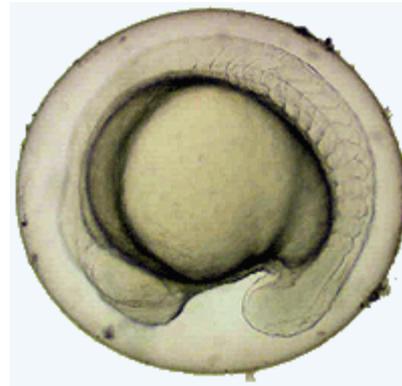


Abbildung 8.2 koaguliertes Ei (links), keine Schwanzablösung (rechts)

Auf dem Testprotokoll wird für jedes einzelne Ei der Zustand protokolliert. Hierfür werden folgende Kürzel verwendet:

N = normal entwickelter Keim

K = koagulierter Keim (letal)

S = keine Schwanzablösung (letal)

H = kein Herzschlag (letal)

Anschließend wird die Summe der toten Embryonen ermittelt.

Gültigkeitskriterien:

Der Test wird als gültig gewertet, wenn mindestens 90 % der Embryonen in der externen Kontrollgruppe überleben und in der Positivkontrolle mit 3,7 mg/l 3,4-Dichloranilin ein Effekt größer als 10 % auftritt, also mindestens zwei tote Embryonen festgestellt werden.

Auswertung:

Verdünnungsreihen mit Quarzsand oder Verdünnungswasser¹⁰

Dokumentation:

Die Angaben zur Probe und der Probenvorbereitung (pH-Wert, el. Leitfähigkeit und Sauerstoffgehalt) sowie die Testdurchführung werden auf dem Testprotokoll dokumentiert. Für jede untersuchte Probe wird ein Testprotokoll erstellt (siehe: SOP H411.105-02_F01-01).

¹⁰ Wie bei Biotests üblich sollten auch der Sedimentkontakttest in Zukunft mit Verdünnungsreihen durchgeführt werden. Hierzu sollten in Zukunft Versuchsreihen durchgeführt werden.

Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP

Fischei-Sedimentkontakttest

Seite 12 von 13

Version: 02

Gültig ab:

9 Qualitätssicherungsmaßnahmen¹¹

Zu jedem Test ist eine interne und externe Kontrolle sowie eine festgelegte Konzentration mit der Referenzsubstanz 3,4-Dichloranilin mitzuführen.

Einmal jährlich muss das Zuchtwasser überprüft werden (Leitungswasser vor und nach Aktivkohlepatrone und Cu-Ionen-Austauscher), um eine erhöhte Belastung der Zuchtfische speziell mit Metallen ausschließen zu können.

Ferner wird ein Tagebuch geführt, in dem Angaben zur Eiablage, Fütterung und Besonderheiten notiert werden.

Die wasserchemischen Überprüfungen der Aquarien werden mit Merckoquant-Teststäbchen durchgeführt (Lagerung im Kühlschrank Raum 334 bzw. in Raum 325). Es sollten folgende Werte eingehalten werden:

Nitrat: empfohlen 20 mg/l, maximal 100 mg/l (Messung ein Mal pro Woche)

Nitrit: empfohlen 0,1 mg/l, maximal 1 mg/l (Messung ein Mal pro Woche)

Ammoniak in Abhängigkeit vom pH-Wert: der Ammoniak-Gehalt sollte 0,025 mg/l nicht übersteigen, d.h. **Ammonium** darf mit den Teststäbchen nicht nachweisbar sein (Messung ein Mal pro Woche).

Sollten die empfohlenen Werte überschritten werden, ist umgehend ein Teilwasserwechsel vorzunehmen.

Darüber hinaus wird auch die **Wasserhärte** monatlich, der **pH-Wert** und der **Sauerstoffgehalt** zwei Mal pro Woche ermittelt. Die **Wassertemperatur** wird kontinuierlich in einem Aquarium mit einem Datalogger aufgezeichnet.

Die erhobenen Werte werden im Protokoll SOP HU411.105-03_F01-02 dokumentiert.

10 Gerätewartung, Wartungsintervalle¹²

Das verwendete pH-Meter muss vor jeder Verwendung kalibriert werden (s. SOP HU412.042 Bestimmung des pH-Wertes in Wasserproben). Jede Kalibration ist im Gerätebuch für das pH-Meter zu dokumentieren.

Das Sauerstoffmessgerät muss einmalig nach der Montage einer neuen Messsonde kalibriert werden. Mit ihr kann ansonsten kalibrierungsfrei gemessen werden.

11 Hinweise zur Fehlersuche¹³

Fehler: nur geringe oder keine Eiproduktion oder Mortalität in der Zucht.
mögliche Ursachen:

1. Futter unzureichend.

¹¹ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

¹² Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009

¹³ Quelle: SOP HU411.105-Version 03 vom 07.12.2009



Qualitätsmanagementhandbuch HU4

SOP **Fischei-Sedimentkontakttest**

Seite 13 von 13

Version: 02

Gültig ab:

2. Zuchtwasser belastet. Abhilfe: Zuchtwasser analysieren, ggf. Ionen-Austauscher erneuern.
3. Verunreinigung der Aquarien oder Krankheiten. Abhilfe: komplette Reinigung ggf. neue Fische beschaffen.

12 Entsorgung von Proben, Reagenzien und Standards

Das Sediment und der Quarzsand aus der Negativkontrolle werden in das Weck-Glas „Abfall Sediment“ und der Quarzsand der Positivkontrolle in das Weck-Glas „Abfall Sediment DCA“ überführt.

13 Reinigung der Glaswaren (Kristallisierschalen)¹⁴

Nach dem Gebrauch der Kristallisierschalen toxische Wässer und Sedimente fachgerecht Entsorgen und mit Aqua Dest nachspülen.

Die Kristallisierschalen durchlaufen folgendes Spülprogramm:

1. Spülen mit Spülmittel
2. Säurebad (3% HCL) über Nacht
3. Spülen ohne Spülmittel (Aqua Dest)
4. Trockenschrank (60°C) 20-30min

14 Liste der Änderungen

Änderung	Datum	Namenszeichen wiss. Betreuung

¹⁴ Quelle: DIN EN ISO 5667-16 / L1 / 6.3 Reinigung der Geräte / Seite 12