Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren auf die Induktion von Metallothionein-Isoformen der Kliesche (*Limanda limanda L.*)

DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie -Abteilung Lebensmittelchemieder Universität Hamburg

vorgelegt von

Markus Lacorn

aus Pinneberg

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis Mai 1999 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, an der Universität Hamburg angefertigt.

Die finanzielle Unterstützung der Arbeit erfolgte durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie innerhalb des Verbundvorhabens "STRESSTOX" (Früherkennung toxischer Belastungen bei marinen Organismen, 03F0172).

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hühnerfuß

Tag der mündlichen Prüfung: 2.10.99

Danksagungen

Für die Überlassung des Themas und das stete Interesse an dieser Arbeit sowie der Bereitstellung geeigneter Arbeitsbedingungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart sehr bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Hühnerfuß danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt:

Angelika Lahrssen, Nina Rotzoll, Julia Pruns, Britta Scheffler und Silke Gnädig für ihren großartigen Einsatz, der maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat

Dr. Thomas Simat für das immerwährende Interesse an der Meeresforschung sowie seine mentale und fachliche Unterstützung bei statistischen Problemen

Gundula Piechotta für 3 Jahre beste Zusammenarbeit

Dr. Thomas Lang und Ursula Kürschner für die Probenahme der Klieschen und die Wochenendeinsätze während der Hälterungsexperimente

Den Mannschaften der Forschungsschiffe Walter Herwig III und Uthörn für die Bereitstellung von Probematerial, die windstillen Seefahrten und immer genügend Fisch in der Hock

Dr. U. Kammann, Dr. Krüner, P. Marold, Dr. V. Dethlefsen, Dr. H.-St. Jenke, M. Trenk, M. Vobach, J. Weidling-Kumerow, A. Schulz, G. Nagel, H. Kinder für fachliche Unterstützung, die Möglichkeit zur Teilnahme an Seefahrten und Analysen

Den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Lebensmittelchemie

Dem BMBF und meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung der Arbeit

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 ALLGEMEINER TEIL	3
2.1 BIOMARKER	3
2.2 KLIESCHE (LIMANDA LIMANDA L.)	5
2.2.1 Habitus	5
2.2.2 Vorkommen	6
2.2.3 Wachstum und Reproduktionszyklus	6
2.2.4 Eignung als Monitoringorganismus	1
2.3 METALLOTHIONEINE	8
2.3.1 Struktur und Charaktensierung 2.3.2 Vorkommen	0 9
2.3.3 Funktion und Induktion	9
2.3.4 Isoformen: Bildung und Funktion	12
3 MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 HÄLTERUNGSEXPERIMENTE	13
3.1.1 Experiment Cd (Cd-Exposition)	14
3.2.2 Experiment ST (Variation abiotischer Faktoren)	15
3.2 PROBENAHME IM FREILAND	16
3.2.1 Nord- und Ostsee	16
3.3.2 Jahresgang	18
3.4 METALLOTHIONEIN-STANDARD	19
3.5 HOMOGENISIERUNG UND CYTOSOLGEWINNUNG	19
3.6 Cd-SATURATION	19
3.7 ACETONFÄLLUNG	19
3.8 GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE	19
3.9 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	20
3.10 UV-ABSORPTION	20
3.11 ULTRAFILTRATION	20
3.12 PROTEINBESTIMMUNG	21
3.13 METALLBESTIMMUNG	21
3.13.1 Druckaufschluß	21
3.13.2 Cd-Bestimmung mittels GF-AAS	21
2.14. DEDECIMINATION OF MALE AND	21
3.14 BERECHNUNG DER WII-GEHALTE	21
3.15 LIPIDBESTIMMUNG	22
3.16 STATISTIK	22

4 METHODENENTWICKLUNG	23
4.1 ARBEITSPLAN	23
4.2 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG	24
4.2.1 Zentrifugation	24
4.2.2 GPC	24
4.2.3 IEC	25
4.2.4 Proteindenaturierung	27
4.2.5 Metallzusammensetzung und Cd-Saturation	29
4.2.6 Identifizierung der Cd-bindenden Proteine als MT-Isoformen	31
4.3 QUANTIFIZIERUNG	32
4.3.1 Auswahl der Methode	32
4.3.2 Bezugsgröße	32
4.3.3 Optimierung der Cd-Saturation	32
4.3.4 Methode	35
4.3.5 Validierung	36
5 ERGEBNISSE	39
5.1 HÄLTERUNGSEXPERIMENT Cd	39
5.1.1 Schwermetallgehalte	39
5.1.2 MT-Gehalte	41
5.1.3 Korrelationen der MT-Gehalte mit den Schwermetallgehalten	43
5.2 HÄLTERUNGSEXPERIMENT ST	44
5.2.1 MT-Gehalte	44
5.3 FREILAND	45
5.3.1 Schwermetallgehalte	45
5.3.2 MT-Gehalte	51
5.3.3 Korrelationen einzelner Parameter	55
5.4 JAHRESGANG	58
5.4.1 Abiotische Faktoren	58
5.4.2 Lipidgehalt	59
5.4.3 Schwermetallgehalte	59
5.4.4 MT-Gehalte	61
5.4.5 Korrelationen einzelner Parameter	63
6 DISKUSSION	65
6.1 EINFLUB VON CADMIUM	66
6.2 EINFLUB VON ABIOTISCHEN UND BIOTISCHEN FAKTOREN	72
6.2.1 Zink – MT-Induktion	72
6.2.2 Temperatur – MT-Induktion	73
6.2.3 Salinität – MT-Induktion	74
6.2.4 Saisonale Einflüsse – MT-Induktion	74
6.3 BEWERTUNG DER MT ALS BIOMARKER	79
7 ZUSAMMENFASSUNG	81

8 ANHANG	85
8.1 METHODEN	85
8.1.1 Homogenisierung und Cd-Saturation	85
8.1.2 Proteinbestimmung	86
8.1.3 Acetonfällung	87
8.1.4 Gelpermeationschromatographie	88
8.1.5 Anionenaustauschchromatographie	89
8.1.6 Konzentrierung und Entsalzung	90
8.1.7 Atomabsorptionsspektrometrie	91
8.1.8 Berechnung der MT-Gehalte	95
8.1.9 Lipidbestimmung	95
8.2 PROBENAHME	97
8.2.1 Stationsdaten zur Freilandprobenahme	97
8.3 DATEN DES TIERVERSUCHES Cd	99
8.4 DATEN DES TIERVERSUCHES ST	102
8.5 DATEN DER FREILANDAUSFAHRT WH 179	103
8.6 DATEN DER FREILANDAUSFAHRT WH 185	107
8.7 DATEN DER FREILANDAUSFAHRT WH 191	110
8.8 DATEN DES JAHRESGANGES	114
8.9 CHEMIKALIEN UND GERÄTE	118
8.9.1 Chemikalien	116
8.9.2 Geräte und Zubehör	120
9 LITERATURVERZEICHNIS	121
EIGENE PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	129

Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorption-Unit	IOC	Intergovernmental Oceano	
BFA	Bundesforschungsanstalt		graphic Commission	
BgVV	Bundesamt für gesundheitlichen	2-MCE	2-Mercaptoethanol	
	Verbraucherschutz und	MG	Molekulargewicht	
	Veterinärmedizin	MT	Metallothionein	
Bidest.	Bidestilliert	MT-I; MT-1	Metallothionein-Isoform 1	
BMBF	Bundesministerium für	MT-II; MT-2	Metallothionein-Isoform 2	
	Bildung und Forschung	MTF	Metalltranskriptionsfaktor	
BSA	Bovine Serum Albumine	MTI	Metalltranskriptionsinhibitor	
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt	MRE	metallregulierendes	
	und Hydrographie		Element	
CEC	Commission of the European	MS-222	3-Aminobenzoesäure-	
	Community		ethylester	
CRM	Certified Reference Material	NMR	Nuclear-Magnetic-	
Cys	Cystein		Resonance	
Da	Dalton	PBS	Phosphate-buffered Saline	
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan	pl	isoelektrischer Punkt	
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent	PRISMA	Prozesse im Schadstoff-	
	Assay		kreislauf Meer-Atmosphäre	
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase		ÖkosystemDeutsche Bucht	
F-AAS	Flammen-Atomabsorptions-	RIA	Radio Immuno Assay	
	Spektrometrie	RP-HPLC	Reversed-Phase High Per-	
GF-AAS	Graphitrohrofen-Atomabsorptions-		formance Liquid Chromato-	
	spektrometrie		graphy	
GPC	Gelpermeationschromatographie	Temp	Temperatur	
GSI	Gonado-somatischer Index	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-	
ICES	International Council for the		aminomethan	
	Exploration of the Sea	UV	Ultraviolett	
IEC	Ion Exchange Chromatography	WH	Fischereiforschungsschiff	
			Walter Herwig III	

1 Einleitung

Marine Lebensräume sind einer starken Belastung von Schadstoffen aus anthropogenen Quellen ausgesetzt. Zu diesen Schadstoffen zählen unter anderem chlorierte Kohlenwasserstoffe, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Schwermetalle sowie eine Vielzahl bisher nicht identifizierter Stoffe. Eine geringe Anzahl dieser Substanzen sind Gegenstand nationaler und internationaler Monitoringprogramme, z.B. unter Leitung des International Council of the Exploration of the Sea (ICES) (HAARICH und HARMS, 1997). Im Vordergrund stehen dabei analytisch erfaßbare toxische Stoffe. Eine Messung von Einzelsubstanzen, selbst unter der Prämisse eines bekannten toxischen Effektes, ist jedoch kaum geeignet, den Zustand des Ökosystems Meer zu beschreiben. In erster Linie sind die Effekte der Schadstoffe auf das Ökosystem und eine Vorhersage der zukünftigen Entwicklung von Interesse (LANGE und LAMBERT, 1995). Die Kenntnis der Konzentration eines Schadstoffes - ermittelt durch chemische Analyse - läßt selten eine Aussage hinsichtlich der Verfügbarkeit im Organismus zu. Kompliziert wird der Sachverhalt durch das Vorliegen von Schadstoffgemischen und der Bildung von eventuell toxischen Metaboliten. Ihre antagonistischen bzw. synergistischen Effekte sind bis heute nahezu unbekannt und stellen einen großen Unsicherheitsfaktor in der Bewertung des Zustandes des Ökosystems Meer dar (MC CARTHY und SHUGART, 1990).

Solche schadstoffbedingten Effekte werden ausgelöst durch Wechselwirkungen zwischen Kontaminanten und der belebten Umwelt. Die Bestimmung dieser Effekte ist geeignet, das Auftreten einer Schädigung des Ökosystems Meer zu erfassen. Aus diesem Grund nehmen sogenannte Effektmonitoringprogramme unter Verwendung von Biomarkern zunehmend eine bedeutende Position im Konzept des Umweltschutzes ein.

Biomarker sind als "Antwort" eines Organismus auf schadstoffinduzierten Streß zu sehen. Es handelt sich um Indikatoren für Veränderungen auf zellulärer oder biochemischer Ebene, deren Auswirkungen sich auf verschiedenen Organisationsebenen – von der biochemischen Ebene hin zur Populationsebene – manifestieren. Ein Beispiel für die Reaktion eines Organismus auf biochemischer Ebene ist die Bildung von Streßproteinen (SANDERS, 1993). Eine Gruppe solcher Proteine stellen die Metallothioneine (MT) dar, welche durch Schwermetalle wie Cd und Cu im Organismus induzierbar sind und sich durch ihre Fähigkeit zur Metallbindung sowie einen hohen Cysteingehalt auszeichnen (GEORGE und OLSSON, 1994). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum ist die Bildung von Isoformen, welche durch den Austausch einiger Aminosäuren eine Veränderung des isoelektrischen Punktes bewirken, wodurch eine chromatographische Trennung mit Ionenaustauschern möglich ist (PENG et al., 1991). In der Regel bilden höherentwickelte Organismen wie Säuger, Vögel und Fische zwei Isoformen, welchen unterschiedliche Aufgaben (z.B. Transport

verschiedener essentieller Spurenelemente wie Cu und Zn) im Organismus zugesprochen werden (BREMNER und BEATTIE, 1990; ROESIJADI, 1992). Die Eignung von MT als Biomarker einer Schwermetallbelastung wurden in Labor- und Freilandversuchen schon mehrfach überprüft. Dabei zeigten sich insbesondere bei Untersuchungen im Freiland unterschiedliche Ergebnisse. Eine Korrelation zwischen Metall- und MT-gehalten wurde bereits von SULAIMAN et al. (1991) festgestellt, während in anderen Untersuchungen keine Zusammenhänge erkannt werden konnten (GALGANI et al., 1992, PEDERSEN und LUNDEBYE, 1996). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte unter Umständen mit dem Einfluß von physiologischen Faktoren wie der Änderung der Wassertemperatur oder des Salzgehaltes sowie des Reproduktionsstatus erklärbar sein. SABOROWSKI (1996) konnte einen Einfluß dieser Faktoren bei der Untersuchung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität in Klieschen (Limanda limanda) nachweisen. Es zeigte sich, daß die saisonalen Anderungen in der EROD-Aktivität Ausmaße annimmt, die für die Beurteilung der Eignung als Biomarker entscheidend sind. Ohne Kenntnis dieser Daten könnten bei Vergleich der Effekte bei Fischen zweier Stationen natürliche Faktoren einen anthropogenen Einfluß vortäuschen und so irrtümlicherweise die Biomarker-Induktion auf einen Schadstoffeinfluß zurückgeführt werden. Für MT in Fischen wurden in diesem Zusammenhang erste Untersuchungen vorgenommen, die auf ähnliche Einflüsse hindeuten (OLSSON et al., 1987).

Es ist das Ziel der Untersuchungen, basierend auf einer Isolierung der MT, eine Methode zur Quantifizierung der MT-Isoformen zu entwickeln und im Anschluß den Einfluß der Faktoren Cadmiumbelastung, Temperaturänderung, Salzgehaltsänderung, Zn-Gehalt und Laichstatus bei Klieschen zu untersuchen. Dazu werden an festgelegten Stationen in Nord- und Ostsee über einen Zeitraum von zwei Jahren im Frühsommer und im Winter Proben genommen und MT-Gehalte mit Schwermetallgehalten verglichen. Um schadstoffbedingte Effekte von physiologischen Effekten abgrenzen zu können, werden über ein Jahr hinweg an einer ausgewählten Station Proben genommen. Parallel dazu erfolgt in Tierversuchen die Überprüfung der Induktion der MT durch Cd und Umweltparameter wie Veränderung der Temperatur und des Salzgehaltes. Aus diesen Ergebnissen kann die Eignung von MT-Isoformen der Kliesche als Biomarker einer Schwermetallbelastung überprüft werden.

Als Untersuchungsorganismus wurde der Plattfisch Kliesche ausgewählt. Dieser Fisch eignet sich wegen seines häufigen Vorkommens in Nord- und Ostsee sowie der Anfälligkeit gegenüber Schadstoffen und ist aus diesen Gründen bereits Gegenstand einer Vielzahl von Monitoringprogrammen.

Die Untersuchung der Eignung von MT als Biomarker einer Schwermetallexposition wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojektes "Stresstox" durchgeführt.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Biomarker

Der Einsatz von Biomarkern zur Erfassung eines Schadstoffeintrages bzw. -effektes hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. In der unbelasteten natürlichen Umgebung halten Organismen eine Homöostase aufrecht. Nach Exposition mit Schadstoffen werden molekulare, biochemische und/oder physiologische kompensatorische Mechanismen aktiviert, die in der Inhibition oder Aktivierung eines oder mehrerer physiologischer Prozesse oder Funktionen resultieren (EVERAARTS, 1995). Biomarker können sich von der molekularen Ebene bis hin zu der des Ökosystems auf allen möglichen Organisationsebenen 1 manifestieren. Tab. gibt einige Beispiele für Biomarker verschiedener Organisationsebenen.

Ebene	Biomarker Literatur	
Molekular	DNA-Addukte	FRENCH et al. (1996)
Biochemisch	Metallothioneine	KAMMANN et al. (1997)
Zellulär	Apoptose	PIECHOTTA et al. (1999)
Organ	Tumorbildung	HINTON (1989)
Organismus	Lymphocystis	DETHLEFSEN (1988)
Population	Populationszahlen	WAHL et al. (1995)

Veränderungen auf molekularer oder biochemischer Ebene lassen sich am einfachsten der Wirkung eines Schadstoffes zuordnen. Die Antwort des Organismus erfolgt dabei schnell und ist häufig einfach zu messen und zu beurteilen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der gezielten Induktion dieser Biomarker in Laborexperimenten und somit eine eindeutige Beweisführung des Zusammenhanges zwischen Schadstoff und Biomarker. Mit der Entfernung von der molekularen Ebene hin zur Populationsebene wird eine Beweisführung schwieriger und ist erst in wenigen Fällen gelungen, z.B. die Verringerung der Eierschalendicke durch Dichlor-diphenyl-trichlorethan (DDT) und den damit verbundenen verminderten Bruterfolg bei Seevögeln (beschrieben bei PEAKALL, 1992). Abb. 1 zeigt die Zusammenhänge zwischen der Exposition mit einem Schadstoff und der Antwort des Organismus auf verschiedenen Organisationsebenen.



Öffentliches Interesse nimmt zu

Abb. 1: Schema der Reaktionskaskade einer Schadstoffexposition

Die Biomarker können je nach Art der Antwort des Organismus auf die Schadstoffexposition in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Expositionsbiomarker zeigen, daß der untersuchte Organismus einem Schadstoff ausgesetzt worden ist und diesen in seinen aufgenommen zählen zu diesen Körper hat. ΜT Biomarkern, da sie eine Schwermetallexposition durch verstärkte Expression anzeigen (BENSON et al., 1990). Effektbiomarker geben Hinweise, ob durch Schadstoffe bereits eine Schädigung oder Veränderung im Organismus eingetreten ist (PEAKALL und WALKER, 1994). Ein Beispiel für einen Effektbiomarker stellt die Apoptose, der programmierte Zelltod dar (WAGNER et al., 1998).

Da die Einflüsse und Effekte auf einen Biomarker meist komplex sind, müssen bei der Überprüfung der Anwendbarkeit eines Biomarkers verschiedene Anforderungen erfüllt sein (SANDERS, 1990; PEAKALL, 1992).

- Es sollte eine qualitative und quantitative Beziehung zwischen Exposition und Biomarker bestehen.
- Der Biomarker muß bei möglichst vielen verschiedenen Organismen in Labor- und Feldexperimenten meßbar sein.
- Der Biomarker sollte in Hinblick auf die Monitoringanwendbarkeit einfach zu messen sein und keine speziellen Techniken erfordern.
- Der Biomarker sollte nicht von der Reaktion auf natürliche und physiologische Stressoren, wie Veränderung der Wassertemperatur oder des Salzgehaltes sowie des Reproduktionsstatus abhängig sein.
- Der Biomarker soll nach Exposition mit dem Schadstoff oder den Schadstoffen möglichst lange und gleichbleibend meßbar sein.

2.2 Kliesche (Limanda limanda L.)

2.2.1 Habitus

Die Kliesche (*Limanda limanda L.*) ist ein Plattfisch aus der Familie der Pleuronectiden. Ihr Körper erreicht eine Länge von 35-40 cm und unterscheidet sich durch die über der Brustflosse liegende halbkreisförmige hochgezogene Seitenlinie von anderen Plattfischen (s. Abb. 2).



Abb. 2: Kliesche (*Limanda limanda L.*)

Das Nahrungsspektrum der Kliesche umfaßt neben Würmern, Schnecken, Muscheln und kleinen Krebsen hauptsächlich Schlangensterne (Klasse: Orphiuroidae) (SABOROWSKI, 1996). Die sich aus pelagischen Eiern entwickelnden bilateral-symmetrischen Larven leben zunächst im freien Wasser. Dort erfolgt die Umwandlung zum asymmetrischen, seitlich stark abgeflachten Jungfisch und im Anschluß der Übergang zum Bodenleben. Die Kliesche bevorzugt sandige bis schlickige Meeresböden in Tiefen von 7-70 m (BOHL, 1957).

2.2.2 Vorkommen

Die Kliesche ist der häufigste Plattfisch in der Nordsee, besitzt aber nur untergeordnete wirtschaftliche Bedeutung. Die zumeist geringe Größe und das häufige Auftreten von äußerlichen Krankheiten sind hierfür die Ursachen (DETHLEFSEN, 1988). Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich über die Nordsee, die westliche und mittlere Ostsee und das isländische Schelf. Am häufigsten kommt die Kliesche in der südlichen Nordsee und Deutschen Bucht bei Wassertiefen von 20-40 m vor (BOHL, 1957). Im Vergleich zur Scholle oder Flunder ist sie relativ standorttreu und unternimmt keine ausgedehnten Laichwanderungen. Eine Ausnahme bilden küstennah lebende Tiere, die während des Winters aus den abkühlenden Gewässern zur tieferen See hin ausweichen und nach dem Laichen im Frühjahr in die wieder erwärmten Gewässer zurückkehren. Weibchen und Männchen weisen dabei unterschiedliche Zyklen auf. Männchen kehren in der Regel später in die Küstengewässer zurück als Weibchen (SABOROWSKI, 1996). In Markierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß Klieschen an der belgischen Küste in der zweiten Hälfte des Jahres ca. 80 nautische Meilen (entspricht 150 km) nach Nordosten wanderten (LEE, 1972; DE CLERCK, 1984). Die Rückkehr erfolgte im Frühjahr des folgenden Jahres.

2.2.3 Wachstum und Reproduktionszyklus

Die Weibchen sind bei einer Länge von etwa 13 cm spätestens im 3. Lebensjahr geschlechtsreif, während es die Männchen schon bei einer Länge von 11 cm in einem Alter von 2 Jahren werden. Die Weibchen werden durchschnittlich größer als die Männchen und dominieren vor allem im Winter zahlenmäßig (z.B. in der Deutschen Bucht, LANG, pers. Mitteilung, 1998) (BOHL, 1957).

Das Gonadenwachstum setzt bei den Klieschen im Oktober/November ein. Die Entwicklung der Geschlechtsorgane ist bei den Weibchen mit einem Ovarienanteil von maximal 20 % und den Männchen mit maximal 2.5 % Testesanteil des Körpergewichtes abgeschlossen (SABOROWSKI, 1996). Die Laichzeit liegt in den Monaten Februar bis April und unterliegt einer regionalen Variabilität, wobei in den südlicheren Gebieten das Ablaichen früher einsetzt. Nach dem Laichen wird das Gewebe der Ovarien bzw. Testes zum größten Teil

resorbiert und die Geschlechtsorgane gehen in einen Ruhezustand über. Einhergehend mit der Entwicklung der Gonaden verlaufen die Konzentrationen der Hormone 17ß-Estradiol und Testosteron, die die Vitellogenese steuern (SABOROWSKI, 1996).

Für die Kliesche typisch ist ein saisonaler Zyklus der Speicherlipide in der Leber. Im Laufe des Jahres werden die über die Nahrung aufgenommenen Lipide in der Leber gespeichert, um während der Gonadenreifung im Winter aufgezehrt oder in die Gonaden verlagert zu werden. Die höchsten durchschnittlichen Lipidgehalte wurden dabei im Herbst (Oktober) mit etwa 38 %, die niedrigsten im Frühjahr (April) mit etwa 5 % festgestellt (SABOROWSKI und BUCHHOLZ, 1996).

2.2.4 Eignung als Monitoringorganismus

Die Kliesche wurde bereits mehrfach in Effektmonitoringprogrammen als Monitoringorganismus eingesetzt, z.B. PRISMA (Prozesse im Schadstoffkreislauf Meer-Atmosphäre Ökosystem Deutsche Bucht), ICES/IOC-Workshop in Bremerhaven (STEBBING et al., 1992; VETHAAK und RHEINALLT, 1992; LANG und DETHLEFSEN, 1996). Die Gründe dafür sind die Verbreitung in der gesamten Nordsee und Teilen der Ostsee, die relative Standorttreue und ihre Häufigkeit während des gesamten Jahres. Für die Bewertung von Biomarkern ist die Durchführung von Laborexperimenten mit der damit verbundenen Hälterung von Klieschen unerläßlich. KAMMANN (1995) zeigte, daß die Kliesche über mehrere Wochen gehältert werden kann. Zur Erfassung von Langzeiteffekten, z.B. der Akkumulation von Schadstoffen wird es notwendig, das Alter der Fische zu bestimmen. Dieses ist bei Klieschen mittels Analyse der im Kopf gelegenen Otolithen relativ einfach möglich (MAIER, 1908). Die Lebern der Klieschen sind ausreichend groß, um verschiedene Untersuchungen an dem gleichen Probenmaterial durchführen zu können. Die Kliesche repräsentiert als karnivorer Organismus ein höheres trophisches Niveau und ist deshalb in ihrer Lebensspanne einer größeren Menge an Schadstoffen ausgesetzt. Sie reagiert auf anthropogene Umwelteinflüsse besonders empfindlich, weshalb sie z.B. in der stark mit anthropogenen Schadstoffen belasteten südlichen Nordsee eine hohe Rate an Hautkrankheiten, Skelettdeformationen und Leberveränderungen aufweist (WAHL et al., 1995).

Insgesamt existiert ein umfangreiches Datenmaterial zur Populationsbiologie, Verbreitung, Schadstoffbelastung und Physiologie der Kliesche. Diese Daten sind eine notwendige Voraussetzung, um schadstoffbedingte von physiologischen bzw. abiotischen Veränderungen unterscheiden zu können und potentielle Biomarker zu bewerten.

2.3 Metallothioneine

2.3.1 Struktur und Charakterisierung

MT sind wasserlösliche Proteine mit einem MG von 7 kDa. Bedingt durch die ellipsoide Form besitzen sie ein apparentes MG von 10 – 14 kDa, bestimmt unter Einsatz der Gelpermeationschromatographie (GPC) (ROESIJADI, 1992). In der Regel setzen sie sich aus 61 Aminosäuren zusammen, wobei etwa ein Drittel aller Aminosäuren durch Cystein (Cys) repräsentiert wird. Ein weiteres Merkmal ist das Fehlen von aromatischen Aminosäuren und Histidin. Die Abfolge der Cys-Reste in der Sequenz der MT ist in allen bisher beschriebenen MT charakteristisch, wobei die Sequenz Cys-X-Cys (X steht dabei für eine andere Aminosäure) ein wiederkehrendes Strukturelement darstellt.

Aus diesen strukturellen Eigenschaften leiten sich die metallbindenden Eigenschaften der MT ab. Generell sind 7 zweiwertige Metallionen, wie Cd und Zn, oder 12 einwertige Metallionen, wie Cu und Hg gebunden, wobei die Metallzusammensetzung in den MT unterschiedlich ist und gewöhnlich verschiedene Metalle an ein MT gebunden sind. Die Bindung erfolgt über das Schwefelatom des Cysteins, wobei alle Cys-Reste beteiligt sind (KÄGI und SCHÄFFER, 1988). Mit der ¹¹³Cd-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß die Metallionen im MT von Säugetieren in zwei Clustern angeordnet sind. Abb. 3 zeigt beispielhaft ein Cd-MT-Molekül. Der C-terminale Cluster enthält dabei 4 Cd-Ionen und 11 Cysteinreste, der N-terminale Cluster dagegen 3 Cd-Ionen und 9 Cysteinreste (WINGE und MIKLOSSY, 1982).



Abb. 3: Clusterstruktur der MT (nach WINGE und MIKLOSSY, 1982)

Die Affinität verschiedener Metallionen steigt in Bezug auf die MT in folgender Reihenfolge, die typisch für Metall-Thiolat-Komplexe ist (ANG und WONG, 1991; GEORGE und OLSSON, 1994): Zn (II) < Cd (II) < Cu (I) < Ag (I).

Die Stellung von Quecksilber in dieser Reihenfolge ist nicht eindeutig zuzuordnen. Nach DUTTON et al. (1993) kann Hg im sauren Milieu alle anderen Metalle verdrängen, während es im Neutralen nur so fest bindet wie Zn (II) (HUNZIKER und KÄGI, 1985).

Bedingt durch diese unterschiedlichen Affinitäten kommt es zum Austausch der am schwächsten gebundenen Metalle durch solche mit einer höheren Affinität. Zudem findet zwischen verschiedenen MT-Molekülen ein ständiger dynamischer Metallionenaustausch statt (ROESIJADI, 1996).

Bei pH-Werten kleiner 2 sind die Metall-Thiolat-Komplexe instabil, so daß das metallfreie Apoprotein vorliegt (RICHARDS und BEATTIE, 1995). Das metallfreie Apoprotein ist empfindlich gegen Sauerstoff und neigt unter diesen Bedingungen zur Bildung von intra- und intermolekularen Cystinbrücken (KLEIN et al., 1994). Aus der Art der Metall- und Aminosäurezusammensetzung resultieren besondere optische Eigenschaften. Aufgrund der fehlenden aromatischen Aminosäuren findet keine Absorption bei 280 nm statt. Dagegen bewirkt der Metall-Thiolat-Komplex eine Absorption bei 254 nm (STILLMAN, 1991; DUQUESNE und RICHARD, 1994). Die Peptidbindung absorbiert bei 220 nm.

Bedingt durch die kompakte Struktur der Metall-Thiolat–Komplexe sind die MT relativ unempfindlich gegen Hitze (10 min, 90 °C) und wäßrige Acetonlösungen (50 %) (THOMPSON und SUTHERLAND, 1992).

2.3.2 Vorkommen

MT wurden bei allen untersuchten Wirbeltieren und einigen Wirbellosen isoliert und charakterisiert (KÄGI und SCHÄFFER, 1988). Je weiter ein Organismus entwicklungsgeschichtlich von den Wirbeltieren entfernt ist, desto häufiger werden abweichende Charakteristika von den oben beschriebenen nachgewiesen (STONE und OVERNELL, 1985).

2.3.3 Funktion und Induktion

Die Funktion der MT speziell im marinen Organismus ist nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert (KARIN, 1985; COSSON et al., 1991; GEORGE und LANGSTON, 1994).

MT stellt mengenmäßig das bedeutendste Zn-Protein in der Zelle dar. Es konnte gezeigt werden, daß Zink-MT Zn auf Apoenzyme übertragen kann und somit die Aktivierung dieses Enzyms bewirkt. MT wird bei niedrigen Zn-Gehalten in der Zelle innerhalb von mehreren Stunden abgebaut (KARIN, 1985). Ähnliche Beobachtungen konnten für Cu gemacht werden

(BROUWER et al., 1989). Allgemein wird daher davon ausgegangen, daß die Hauptaufgabe der MT in der Zn- und Cu-Homöostase liegt (BREMNER und BEATTIE, 1990; VALLEE, 1995). Durch sie wird die Speicherung und der Transport von Cu und Zn reguliert. VALLEE (1995) beschreibt, daß Zn nie vollständig durch Metallionen mit höherer Affinität ersetzt wird, um die Zn-Regulierung aufrecht zu erhalten. Abb. 4 zeigt ein von ROESIJADI (1996) entwickeltes Modell für die mögliche Biosynthese von MT durch Zn-Induktion. Zunächst ist der Metalltranskriptionsfaktor (MTF) durch den Metalltranskriptionsinhibitor (MTI) blockiert (I). Bei der Induktion durch Zn wird die Blockierung aufgehoben, indem Zn mit dem MTI eine Bindung eingeht. MTF liegt somit ungebunden vor (II) und kann im nächsten Schritt das metallregulierende Element (MRE) im MT-Gen aktivieren. Es kommt zur Neusynthese von MT (III). Dadurch wird der Anteil der freien Zn-Ionen auf einem niedrigen Wert gehalten.



Abb. 4: Induktion von MT durch Zn (ROESIJADI, 1996); MTF: Metalltranskriptionsfaktor; MTI: Metalltranskriptionsinhibitor; MREs: metallregulierende Elemente.

Eine Induktion der MT findet auch durch Cd, Glucocorticoide und cytotoxische Stoffe statt (KÄGI, 1991; GEORGE und LANGSTON, 1994). Die Induktion durch Cd ließ eine Beteiligung der MT an einer bis dahin noch unbekannten Schwermetalldetoxifizierung vermuten (GEORGE, 1990). Durch die Bindung am MT steht das Cd nicht mehr für schädigende Prozesse, z.B. eine Enzyminaktivierung zur Verfügung (FRIEDBERG, 1974). Generell besteht die Frage, ob ein Metall wie Cd, welches normalerweise in der Natur nur in Spuren vorkommt, die Entwicklung eines Detoxifizierungssystems für Schwermetalle erklärt. Ein weiterer ungeklärter Punkt ist die Deutung der ständigen Expression des Proteins, auch wenn keine nichtessentiellen Schwermetalle anwesend sind (KARIN, 1985). Diese Fakten ließen ROESIJADI (1996) vermuten, daß es sich bei der Induktion von MT durch Cd lediglich um eine Verdrängungsreaktion von Zn aufgrund der höheren Affinität von Cd zu

cytosolischen Liganden handelt. Abb. 5 zeigt die Zusammenhänge dieser Theorie. Dabei stellt der Hauptschritt die Verdrängung von Zn aus cytosolischen Liganden dar. Freigesetztes Zn induziert, wie schon in Abb. 4 dargestellt, MT. Dieses tritt in Wechselwirkung mit dem Cd-beladenen cytosolischen Liganden und bewirkt den Austausch des Cd, welches nun an MT gebunden vorliegt.



Abb. 5: Induktion von MT durch Cd (ROESIJADI, 1996); MTF: Metall-Transkriptionsfaktor; MIT: Metall-Transkriptionsinhibitor; MREs: metallregulierende Elemente.

Eine verstärkte Induktion von MT wird auch durch physiologische Faktoren und Umweltveränderungen wie Reproduktionsstatus, Temperatur- und Salzgehaltsveränderung und Ernährung beobachtet (OLSSON et al., 1996; HYLLAND et al., 1998). Viele dieser Faktoren sind indirekt mit einer Erhöhung des Zn-Gehaltes im Organismus verbunden (COSSON, 1992), wodurch es zu einer Induktion nach ROESIJADI (1996), wie in Abb. 4 beschrieben, kommt.

2.3.4 Isoformen: Bildung und Funktion

In vielen Organismen kommen die MT in Form von zwei Isoformen vor, die aufgrund der Elutionsreihenfolge von einer Anionenaustauschersäule als MT-I und MT-II bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung und im pl (3.9 und 4.6), nicht aber in Anzahl und Stellung der Cysteinreste. Mit Hilfe der RP-HPLC lassen sich diese Isoformen noch in weitere Subisoformen trennen, die sich in der Aminosäurezusammensetzung, nicht aber im pl, unterscheiden (KLAUSER et al., 1983). MT aquatischer Tierarten setzen sich häufig aus zwei Isoformen zusammen. Beispiele dafür sind die Kliesche Limanda limanda (DUQUESNE und RICHARD, 1994), die Regenbogenforelle (Oncorhynchus mykiss) (OLSSON und HAUX, 1985) und die Limande (Microstomus kitt) (DUQUESNE und RICHARD, 1994). Dagegen konnten OVERNELL und COOMBS (1979) aus Cd-exponierten Schollen (Pleuronectes platessa) nur ein Isoform isolieren.

Hinsichtlich der Metallbindung konnten KAMMANN et al. (1997) unterschiedliches Verhalten bei der Bindung von Hg der MT von Brassen zeigen. KUROSHIMA (1995) wies eine unterschiedliche Induktion der Isoformen durch Cd und Zn in Meerbrassen nach.

Die Funktion dieser Isoformen ist teilweise ungeklärt. Es wurde gezeigt, daß die Isoformen durch eine Multi-Gen-Gruppe kodiert werden, deren Promotoren verschieden auf Induktoren reagieren (RICHARDS et al., 1984). DALLINGER (1996) dagegen vermutet, daß es sich um Genmutationen handelt, und daß die Isoformen keine unterschiedlichen Aufgaben besitzen. Es ist eher mit einer zeit- und gewebeabhängigen Expression zu rechnen.

3 Material und Methoden

3.1 Hälterungsexperimente

Die Durchführung der Hälterungsexperimente wurde in der Außenstelle des Institutes für Fischereiökologie (Bundesforschungsanstalt (BFA) für Fischerei) in Cuxhaven vorgenommen. Die Experimente wurden in 80 L Flachbecken mit Abmessungen von 80 x 50 x 20 cm bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Da die Aquarienanlage nicht direkt mit Nordseewasser versorgt werden konnte, wurde zu Beginn des jeweiligen Experimentes eine ausreichende Menge Nordseewasser in einem Tank angeliefert und über den Zeitraum des Versuches im Durchfluß (12-15 mL/min) eingeleitet. Die Becken wurden ständig mit Frischluft versorgt. Die Besatzdichte betrug 5 - 7 Klieschen pro Becken. Im folgenden wurden die Klieschen eines Beckens als Gruppe bezeichnet. Für die Hälterungsexperimente wurden weibliche Klieschen zwischen 20 und 25 cm ausgewählt. Es wurde durch die Beschränkung auf kleinere Fische sichergestellt, daß das Alter der Fische nicht zu stark variierte und bei der begrenzten Anzahl der Fische in einer Behandlungsgruppe so zu starke Unterschiede auftraten.

Die Fütterung erfolgte täglich mit herkömmlichem Fischfutter (Trouvit pro Agua 20/2). Die Versuche begannen nach einer Akklimatisierungsphase von 4 - 6 Wochen. Während der Probenahme wurden folgende Parameter in allen Fällen bestimmt: Länge, Gewicht und Alter. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. T. Lang (BFA für Fischerei) vorgenommen. Die Betäubung bei der Injektion und vor der Probenahme erfolgte durch Behandlung mit MS-222 (3-Aminobenzoesäureethylester)-haltigem Meerwasser (0.17 g/L) für 3 min. Für die Probenahme wurden die Fische mit einem Schnitt durch die Wirbelsäule am Kopf getötet, die Leber entnommen und für die einzelnen Untersuchungen geteilt. Die Proben für die MT-Bestimmung wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Lagerung der Proben für die Schwermetallbestimmung erfolgte bei –20 °C.

Die Isolierung der MT-Isoformen (s. Kap. 4) erforderte eine größere Menge an Lebermaterial Cd-induzierter Klieschen. Dazu wurde in einem nicht näher aufgeführten Experiment etwa 60 weiblichen Klieschen nach Betäubung intraperitoneal 100 µL einer Cd-Lösung (1 g/L) in 0.7% iger NaCl-Lösung injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden die Tiere betäubt und wie bereits beschrieben die Lebern entnommen und gelagert.

3.1.1 Experiment Cd (Cd-Exposition)

Experiment 1 begann am 09.02.1998. Die Akklimatisierungsphase vor dem Versuch betrug 4 Wochen. Die Betäubung der Fische für die intraperitoneale Injektion erfolgte mit MS-222haltigem Meerwasser (0.17 g/L). Tab. 2 zeigt die Behandlungen der unterschiedlichen Versuchsgruppen und gibt eine Übersicht über den Probenahmeplan an den vier aufgeführten Tagen. Drei Gruppen (entsprechend 3 Becken) erhielten weder eine Betäubung noch eine Injektion (Bezeichnung der Gruppe "K oder Kontrolle"), um zu überprüfen inwiefern die Injektion und die Betäubung eine Auswirkung haben. Vier Gruppen erhielten intraperitoneal 0.7% NaCl in dest. Wasser (Bezeichnung der Gruppen "PBS"). 15 Gruppen erhielten intraperitoneale Injektionen von Cd-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen in 0.7% NaCl (gelöst in dest. Wasser). Die Angabe zur Menge des applizierten Cd in Tab. 2 bezieht sich auf kg Körpergewicht. Das Injektionsvolumen betrug etwa 100 µL. Die µg- bzw. mg-Angaben bezogen auf kg Körpergewicht sind demnach nur als Schätzwerte anzusehen, da die intraperitoneale Injektion zu Verlusten durch Ausfluß aus der Bauchhöhle führen kann und eine Gewichtsbestimmung leicht zu Schädigungen des Fisches an der Schleimhaut führen kann. Aus diesem Grund wurden parallel zur MT-Analyse die Bestimmung der Cd-Gehalte durchgeführt. Die Probenahme erfolgte am 1., 2., 5. und 10. Tag. Die Probenahme erfolgt nach dem in Kapitel 3.1. beschriebenen Verfahren.

Bezeichnung	Behandlung der Fische	Anzahl der Proben			
der Gruppe		1. Tag	2. Tag	5. Tag	10. Tag
К	-	7	-	5	7
PBS	0.7 % NaCl	7	7	7	6
5 mg	5 mg Cd/kg	6	6	6	6
1 mg	1 mg Cd/kg	6	6	5	6
100 µg	100 µg Cd/kg	6	6	6	6
10 µg	10 µg Cd/kg	6	6	6	6

Tab. 2: Expositions- und Probenahmeschema des Experimentes Cd (Cd-Exposition)

3.2.2 Experiment ST (Variation abiotischer Faktoren)

Experiment ST begann am 17.11.1997. Die Akklimatisierungsphase vor dem Versuch betrug 6 Wochen. Tab. 3 zeigt die Behandlungen der unterschiedlichen Versuchsgruppen und gibt eine Übersicht über den Probenahmeplan am siebten Tag. Zwei Gruppen (entsprechend 2 Becken) wurden bei den Akklimatisierungsbedingungen von 33 ‰ Salinität und 4°C Wassertemperatur gehalten (Bezeichnung der Gruppen "K"). Zwei Gruppen wurden innerhalb von 2 Stunden auf eine verringerte Salinität von 25 ‰ gebracht (Bezeichnung der Gruppen "S"). Dazu wurde in einem Tank Seewasser mit Frischwasser auf eine Salinität von 25 ‰ eingestellt, der Wasserstand in den Hälterungsbecken möglichst weit abgesenkt, das Wasser mit verringerter Salinität zugelassen und im Durchfluß weiter zugeleitet. Die Temperatur wurde bei 4°C gehalten. Zwei weitere Becken mit Klieschen wurden bei der natürlichen Salinität von 33 ‰ aber einer um 5°C erhöhten Temperatur gehalten (Bezeichnung der Gruppe "T"). Diese Temperaturerhöhung wurde innerhalb von 2 Stunden vorgenommen und durch Einsatz von elektrischen Aquarienheizstäben (Tronic, 150 W) gehalten. Die Probenahme erfolgte nach dem in Kapitel 3.1. beschriebenen Verfahren mit der Ausnahme, daß keine Schadstoffproben entnommen worden sind.

Bezeichnung	Behandlung der Fische	Anzahl der Proben		
der Gruppe		7. Tag		
К	33 ‰; 4 °C	9		
S	25 ‰; 4 °C	10		
Т	33 ‰; 9 °C	10		

Tab. 3: Expositions- und Probenahmeschema des Experimentes ST (Variation abiotischer Faktoren)

3.2 Probenahme im Freiland

3.2.1 Nord- und Ostsee

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Belastungszustände und jahreszeitlicher Einflüsse wurden Proben an unterschiedlichen Stationen im Winter und Frühsommer genommen. Die Probenahme wurde im Rahmen der Routineausfahrten des Fischereiforschungsschiffes Walter Herwig III (WH) der BFA für Fischerei durchgeführt. Die Lage der Stationen ist in Abb. 6 (Nordsee) und Abb. 7 (Ostsee) dargestellt.



Abb. 6: Lage der Stationen in der Nordsee



Abb. 7: Lage der Stationen in der Ostsee

Beprobung an diesen Stationen ist seit Jahren Teil der Schadstoff-Die und Effektmonitoringprogramme der BFA. Allgemein wurde darauf geachtet, daß die Stationen weit voneinander entfernt lagen, um so einer möglichen "Durchmischung" der Klieschenpopulationen zweier Stationen vorzubeugen. Die Auswahl der Stationen wurde vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Häufigkeit von Krankheiten sowie bekannten Daten zur Schwermetall- und PCB-Belastung der Klieschen getroffen (CLAUßEN, 1990; LANDGRAFF, 1995; LANG, pers. Mittl., 1998): Station N 01 nordwestlich von Helgoland weist eine hohe Belastung mit Organochlorverbindungen auf. Die Belastung mit Cd ist im Vergleich zu den anderen Stationen geringer. Die Station N 06 im Einflußbereich des schottischen Flusses Forth zeichnet sich durch eine hohe Schwermetallbelastung aus. N 04 ist eine Station auf dem Gebiet der Doggerbank in der zentralen Nordsee, die mit 30 m Tiefe flacher ist als die umgebende Nordsee. Hier werden die Wassermassen der nordwestlichen Nordsee aus dem Norden von Schottland kommend unter dem Einfluß der Wassermassen aus dem Englischen Kanal verteilt. Station G 08 im Englischen Kanal gilt wegen der geringen Anzahl von Fischkrankheiten als Referenzstation (LANG, 1996, pers. Mitteilung). Klieschen der anderen Nordseestation zeichnen sich durch vergleichsweise hohe Anteile an kranken Fischen aus. Die Ostseestation B 01 liegt vor der Kieler Förde, während B 12 die östlichste Station darstellt, an der in der Ostsee aufgrund der abnehmenden Salinität noch Klieschen vorkommen (vgl. Anhang 8.2.1).

Die Schleppzeit mit einem Grundschleppnetz betrug jeweils eine Stunde. Routinemäßig wurden an allen Stationen die geographische Länge und Breite, die Wassertemperatur, die Salinität, die Tiefe und der Sauerstoffgehalt bestimmt. Diese Daten sind im Anhang unter 8.2.1 aufgeführt.

Es wurden Klieschen ab 25 cm Länge für die Untersuchung im Freiland ausgewählt, weil nur so eine ausreichende Größe der Lebern sichergestellt werden konnte. Die Untersuchung wurde auf weibliche Klieschen begrenzt, um zu jeder Jahreszeit eine genügend große Anzahl an Fischen zu erhalten. Die Probenahme für das Freiland erfolgte im Rahmen von Routineausfahrten der BFA für Fischerei. Es wurden routinemäßig von der BFA folgende Parameter ermittelt: Länge, Gewicht, Alter und teilweise der gonadosomatische Index (GSI; Quotient aus Gonaden- und Gesamtgewicht; Angabe in %). Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. T. Lang durchgeführt. Die Probenahme der Lebern erfolgte vergleichbar mit der Probenahme für die Tierversuche (vgl. 3.1).

Die benötigte Probenanzahl (Klieschen pro Station) zur angestrebten Unterscheidung der einzelnen Stationen untereinander konnte im Vorfeld für die Cd-Bestimmung berechnet werden. Dabei wurde auf das umfangreiche Datenmaterial von CLAUßEN (1990) zurückgegriffen, wonach in der Nordsee Standardabweichungen der Cd-Gehalte der Klieschen einer Stationen von 40 bis 104 µg/kg zu erwarten sind. Nach STORM (1986) konnte dadurch bei Vorgabe einer Probeanzahl der kritische Differenzbetrag zur signifikanten Unterscheidung (p<0.05) der Mittelwerte zweier Stationen berechnet werden. Bei Messung von 25 Proben pro Station lassen sich Meßstationen unterscheiden, die eine Differenz der Cd-Gehalte von 22 bis 58 µg/kg aufweisen. Nach CLAUßEN (1990) sind in der Nordsee Unterschiede von 10 bis 150 µg/kg zu erwarten. Für die MT-Bestimmung ist eine Berechnung aufgrund des fehlenden Datenmaterials nicht möglich. Aus praktischen Gründen wird die Probeanzahl auf 10 begrenzt.

3.3.2 Jahresgang

Für die genaue Untersuchung der saisonalen Zusammenhänge, d.h. der Abhängigkeit der MT-Konzentrationen von Reproduktionszyklus, Wassertemperatur und Ernährungszustand wurde die monatliche Beprobung an einer Station durchgeführt. Als geeignet für diese Untersuchung wurde die Nordseestation N 01 nordwestlich von Helgoland ausgewählt, weil sie am einfachsten das ganze Jahr über zu erreichen war und bereits vergleichbare Untersuchungen an Klieschen dieser Station zu EROD-Aktivitäten, Lipidgehalten, Nahrungszusammensetzung, Glykogen-, Glucose- und Steroidhormonkonzentrationen

vorlagen (SABOROWSKI, 1996). Die Beprobung erfolgte von Februar 1998 bis Januar 1999. Es wurden jeweils 10 weibliche Klieschen ab 25 cm Länge ausgewählt und nach dem unter 3.1 beschriebenen Probenahmeschema verfahren. Es wurden Proben für die Lipidgehaltsbestimmung, MT-, Zn- und Cd-Analytik gewonnen. Daten zur Wassertemperatur entstammen den Messungen des Feuerschiffes ,Deutsche Bucht' des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) nordwestlich von Station N 01.

3.4 Metallothionein-Standard

Zur Überprüfung der Methoden wurde folgender kommerziell erhältlicher MT-Standard der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt: MT-I, isoliert aus Kaninchenleber (6.2 % Cd und 0.8 % Zn).

3.5 Homogenisierung und Cytosolgewinnung

Die Probe wurde angetaut, mit dem doppelten Volumen an Homogenisierungspuffer (pH 8.6, 2-Mercaptoethanol (2-MCE)-haltig) versetzt und unter Eiskühlung für 2 min im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde für 1 h bei 21000 g bzw. 100000 g zentrifugiert. Durchführung s. Anhang 8.1.1.

3.6 Cd-Saturation

Der Austausch von MT-gebundenem Zn und Cu gegen Cd wurde durch eine Cd-Saturation vorgenommen. Hierzu wurde CdCl₂-Lösung einer bestimmten Konzentration nach der Homogenisierung dem Homogenat zugegeben. Durchführung s. Anhang 8.1.1.

3.7 Acetonfällung

Die fraktionierte Acetonfällung diente der Abtrennung von Proteinen. Die Durchführung erfolgte nach CARTEL (1996) durchgeführt. Dabei wurde das Cytosol auf eine Acetonkonzentration von 50 % gebracht, der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. Nach Erhöhung der Acetonkonzentration auf 80 % wurde der entstehende Niederschlag in Puffer aufgenommen und für die weiteren Untersuchungen bei –80 °C gelagert. Durchführung s. Anhang 8.1.3.

3.8 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) zur Trennung von Proteinen nach Molekulargewichten erfolgte an Sephacryl 100 HR. Das Material ist für die Trennung von Proteinen in einem Bereich von 1 – 100 kDa geeignet. Aufgrund der Größe des Säulenvolumens (850 mm * 26 mm) war die Injektion von bis zu 5 mL möglich und die Säule damit für präparative Zwecke geeignet. Um Absorptionen zwischen Proteinen und Gelmatrix zu verhindern, mußte ein gewisser Salzgehalt im Elutionspuffer vorhanden sein. Als Eluent wurde daher ein Phosphat-NaCI-Puffer (pH 7.0) unter Zusatz von 2-MCE zur Aufrechterhaltung eines reduktiven Milieus eingesetzt (BERGER et al., 1995). Tot- und Säulenvolumen wurden mit Blue Dextran (2000 kDa) und Aceton bestimmt. Die Säule wurde mit einem Proteingemisch bekannter Molekulargewichte kalibriert. Durchführung s. Anhang 8.1.4.

3.9 Ionenaustauschchromatographie

Zur Durchführung Anionenaustauschchromatographie (IEC) der wurde eine Anionenaustauschersäule (Resource Q, 6 mL, Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Es handelte sich dabei um einen stark basischen Austauscher mit einem Gerüst aus Polystyrol-Divinylbenzol-Kopolymeren quarternären Ammoniumgruppen und als Ankergruppen. Dieses Material ließ sich ohne Verlust der Trennleistung mehrfach mit 1 M NaOH und 70 % Ethanol reinigen. Die Kapazität betrug 25 mg Protein/mL Austauscher und ist damit außerordentlich hoch. Die maximale Flußrate betrug 60 mL/min. Der hohe maximale Fluß, das geringe Säulenvolumen in Kombination mit der hohen Kapazität und die Möglichkeit zum ,cleaning in place' erlaubten den Einsatz des Austauschers im analytischen Maßstab. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradient (0 – 0.4 M) bei einem pH von 8.6 (0.02 M Tris-HCl) (KAMMANN, 1995). Durchführung s. Anhang 8.1.5.

3.10 UV-Absorption

Die Eluate von GPC und IEC wurden kontinuierlich photometrisch vermessen. Zum Einsatz kamen 2 UV-Detektoren, die in Reihe geschaltet wurden. Um eine Probe bei den drei Wellenlängen (220, 254, 280 nm) vermessen zu können, wurde die Probe zweimal injiziert und bei der zweiten Injektion eine Wellenlänge beibehalten, die andere verändert. Die Datenaufnahmen erfolgte mit einem Auswertesystem (Bruker Chromstar Software, Version 4.03) (s. 8.1.4; 8.1.5).

3.11 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration dient der Konzentrierung und Entsalzung von Eluaten der GPC und IEC. Es wurden Ultrafilter mit Ausschlußgrenzen von 5 kDa eingesetzt. Durchführung s. Anhang 8.1.6.

3.12 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Cytosole wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Die Messung erfolgte bei 590 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von $20 - 400 \mu g/L$ verwendet. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Durchführung s. Anhang 8.1.2.

3.13 Metallbestimmung

3.13.1 Druckaufschluß

Der Aufschluß erfolgte in Tölgbomben nach BGVV (1989a). Vor dem Aufschluß einer Probe wurden die Tefloneinsätze einem Reinigungsaufschluß mit konzentrierter HNO_3 unterzogen. Die Probeneinwaage betrug 100-500 mg. Nach Aufschluß wurden die Proben auf 10 oder 20 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt. Eluate wurden nicht aufgeschlossen, sondern nur mit 0.2 % HNO_3 angesäuert. Durchführung s. Anhang 8.1.7.2.

3.13.2 Cd-Bestimmung mittels GF-AAS

Die Bestimmung erfolgte mittels GF-AAS und Deuteriumuntergrundkompensation nach BGVV (1989c). Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierreihe im Bereich von 1 – 5 μ g Cd/L. Probelösungen als auch Standards wurden in Doppelbestimmungen vermessen. Durchführung s. Anhang 8.1.7.4.

Die routinemäßige Qualitätskontrolle der Cd-Bestimmung aus Klieschenlebern wurde durch Untersuchung eines zertifizierten Referenzmaterials (CRM Nr. 185, Rinderleber, CEC, Community bureau of reference) sichergestellt. Im gesamten Analysenzeitraum konnte keine Außerkontrollsituation festgestellt werden (vgl. Anhang 8.1.7.5).

3.13.3 Zn-, Cu- und Cd-Bestimmung mittels F-AAS

Die Bestimmung erfolgte mittels F-AAS nach BGVV (1989 b). Die Auswertung wurde mittels Kalibrierreihe im Bereich von 0.25 - 4 mg/L für Zn, 0.5 - 3 mg/L für Cu und 0.25 - 4 mg/L für Cd durchgeführt. Durchführung s. Anhang 8.1.7.3.

Die routinemäßige Qualitätskontrolle der Zn-Bestimmung aus Klieschenlebern wurde durch Untersuchung eines zertifizierten Referenzmaterials sichergestellt (s. 3.13.2). Es konnten im Analysenzeitraum keine Außerkontrollsituationen festgestellt werden (vgl. 8.1.7.5).

3.14 Berechnung der MT-Gehalte

Zur indirekten Bestimmung der MT-Gehalte aus den Cd-Konzentrationen in IEC-Fraktionen wurde nach KUROSHIMA (1995) die Bindung von 7 Cd-Ionen an einem MT-Molekül sowie ein MG von 7 kDa für MT angenommen. Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt des eingesetzten Cytosols bezogen. Formel s. Anhang 8.1.8.

3.15 Lipidbestimmung

Die Lipidbestimmung erfolgte photometrisch nach Umsetzung der Lipide mit Schwefelsäure und der Farbreaktion mit Phosphorsäure-Vanillin-Reagenz nach der Methode von ZÖLLNER und KIRSCH (1962). Die Extraktion wurde nach Na_2SO_4 -Trocknung mit Chloroform-Methanol vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Kalibrierreihe im Bereich von 17.8 – 116 µg unter Einsatz eines kommerziell bezogenen Dorschleberöls. Es wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Durchführung s. Anhang 8.1.9.

3.16 Statistik

Alle Datensätze wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Da aber bei fast allen Datensätzen der Stichprobenumfang zu gering war (n<12) und eine Normalverteilung zwar nachweisbar, aber unwahrscheinlich war, wurden im weiteren Verlauf wenn möglich nicht-parametrische (verteilungsunabhängige) Testmethoden angewandt. Bei dieser Art von Tests werden den einzelnen Werten Ränge zugeordnet, so daß der Datensatz dann rechnerisch einer normalverteilten Datenmenge ähnlicher wird und z.B. Ausreißer leichter berücksichtigt werden können. Der Vergleich von Medianen aus einer größeren Datenmenge, wie z.B. der Vergleich der MT-Gehalte der Klieschen verschiedener Stationen, erfolgte mittels Kruskal-Wallis Rang-Varianzanalyse (H-Test, nicht-parametrisch) mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (parametrisch), wenn ein nachfolgender multipler Vergleichstest notwendig war. Für nicht normalverteilte Daten waren keine multiplen nicht-parametrischen Vergleichstests verfügbar. Beispielsweise konnte auf diese Weise die Station einer Fahrt bestimmt werden, die sich signifikant von den anderen Stationen hinsichtlich einer Variablen unterschied. Unterschieden sich die Varianzen stark, wurden paarweise Vergleiche mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest (U-Test, nichtparametrisch) durchgeführt (vgl. Hälterungsexperiment Cd; Cd-Werte). Die Korrelation zweier nicht normalverteilter Variablen wie z.B. der Vergleich der MT-Gehalte mit den Metallgehalten, wurde über die Spearman-Rangkorrelation berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf p=0.05 festgelegt. Unterschiede auf höherem Signifikanzniveau (p<0.01 bzw. p<0.001) wurden jeweils gekennzeichnet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte u.a. mit Hilfe von Box-Whisker-Plots, wobei Median, Quartile (25-75%), Extremwerte und Ausreißer dargestellt wurden. Der Range wurde nicht unter Einbeziehung der Ausreißer und Extremwerte berechnet. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm SPSS (Version 7.5.2 G) durchgeführt.

4 Methodenentwicklung

4.1 Arbeitsplan

Die nachfolgend beschriebene Methodenentwicklung zur Quantifizierung verfolgte gleichzeitig zwei Ziele: Die Identifizierung bzw. Charakterisierung der isolierten Isoformen und die Ableitung einer Quantifizierungsmethode aus Ergebnissen der MT-Isolierung. Die zu entwickelnde Quantifizierungsmethode musste empfindlich genug sein, die niedrigen MT-Gehalte in Freilandproben zu erfassen. Ferner sollte es durch Einsatz der Methode möglich sein, das erwartete große Probenaufkommen zu bewältigen.

Die Literatur beschreibt unterschiedliche Quantifizierungsmethoden, die auf den beschriebenen Eigenschaften der MT beruhen. Hierbei weisen vor allem die immunologischen Methoden Radio-Immuno-Assay (RIA) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) sowie die Methoden der Metallsaturation hervorragende Eigenschaften wie Empfindlichkeit und Probendurchsatz in Hinblick auf eine Routinemethode auf (DEL RAMO et al., 1995; DUQUESNE et al., 1995). Der Metallsaturation liegt als Prinzip der gezielte Austausch der natürlicherweise gebundenen Metallionen gegen eine Metallspezies (Cd, Ag, Hg) zugrunde. Anschließend werden durch Zugabe von z.B. Hämoglobin überschüssige Metallionen gebundenen Metallionen metallionen jebunden und in dieser Form gebunden hitzepräzipitiert (DEL RAMO et al., 1995). Die gebundenen Metallionen werden indirekt als Quantifizierungsmaß für die MT eingesetzt. Der entscheidende Nachteil dieser Methoden ist die Erfassung aller MT-Isoformen in Summe.

In dieser Untersuchung sollte ausgehend vom Standardisolierungsprotokoll mit Ultrazentrifugation zur Cytosolgewinnung, GPC-Vortrennung und IEC zur Trennung der Isoformen (z.B. PAN et al., 1992) die fraktionierte Acetonfällung (CARTEL, 1996) als Proteindenaturierungsmethode zur zeitlichen Verkürzung der Aufarbeitung hinsichtlich ihrer Effizienz überprüft werden. Ziel war ein Verzicht auf die zeitintensive Methode der GPC. Als Identifizierungsmerkmal der MT während der chromatographischen Trennungen wurde in ersten Linie der Schwermetallgehalt der Proteine herangezogen. Ferner kam das Merkmal der UV-Absorption zum Einsatz.

Die zeitlich verkürzte Aufarbeitung sollte mit einer Cd-Saturation kombiniert werden, um so eine ausreichende Empfindlichkeit über die indirekte Cd-Bestimmung der MT zu erreichen.

4.2 Isolierung und Charakterisierung

4.2.1 Zentrifugation

In der Regel wird für die Isolierung von MT eine Ultrazentrifugation bei 100000 g oder mehr (BERGER et al., 1995) bzw. vereinzelt der Einsatz einer hochtourigen Zentrifuge mit Beschleunigungen von etwa 20000 g beschrieben (GIRALT et al., 1993). Im Folgenden sollte überprüft werden, inwiefern der Einsatz der kostengünstigeren Zentrifugation bei 21000 g vergleichbare Ergebnisse liefert. Als indirektes Maß für die MT wurde der Cd-Gehalt der Zentrifugationsfraktionen gewählt. Zum Einsatz kamen Lebern Cd-exponierter Klieschen. Tab. 4 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Tab. 4: Cadmiumverteilung in den Zentrifugationsfraktionen (n=5, Angaben in %); Mittelwerte (X) mit Standardabweichung (s_r) .

	21000 g			100000 g		
	Pellet	Zentrifugat	Fettschicht	Pellet	Zentrifugat	Fettschicht
$\bm{X} \pm \bm{s}_{r}$	29 ±8	52 ± 5	19 ±6	29 ±7	$\textbf{52}\pm 6$	19 ± 4

Es wird deutlich, daß es zu keiner Veränderung der Cd-Verteilung in den Zentrifugationsfraktionen bei Vergleich der Beschleunigungen von 21000 g und 100000 g kam. In beiden Fällen lagen durchschnittlich 52 % des gesamten Cd im Zentrifugat vor. Die restlichen 48 % verteilten sich zu 29 % auf den Zentrifugationsrückstand (Pellet) und zu 19 % auf die Fettschicht. Im Folgenden wird daher die Zentrifugation bei 21000 g durchgeführt und das erhaltene "Pseudocytosol" als Cytosol bezeichnet.

4.2.2 GPC

4.2.2.1 Kalibrierung

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes (MG) unbekannter Proteine wurde das im Anhang unter 8.1.4.2 (Tab. A-2) aufgeführte Standardgemisch von Proteinen bekannten Molekulargewichts zur Kalibrierung der Säule eingesetzt. Diese Kalibrierung wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt. Im angegebenen MG-bereich von 3.5 – 67 kDa besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Retentionszeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes (vgl. Anhang 8.1.4.2, Abb. A-2). Als weitere Säulencharakteristika wurde das Totvolumen mit 160 min und das Säulenvolumen mit 460 min bestimmt. Es ist ersichtlich, daß auf der verwendeten Sephacryl-Säule Proteine wie MT mit MG von etwa 10 bis 15 kDa im Bereich zwischen 250 und 280 min eluiert werden.

4.2.2.2 Lebercytosol

Die Trennung eines Klieschenlebercytosols ist in Abb. 8 dargestellt. Es wurde die Leber einer Cd-exponierten Klieschen homogenisiert und zentrifugiert. Eine Cd-Saturation fand nicht statt.



Abb. 8: GPC-Trennung eines Lebercytosols (Cd-exponiert); UV-Detektion bei 220 nm in mAU (durchgezogene Linie); Cd-Konzentration in µg/L Eluat (schwarze Balken).

Es wird deutlich, daß im Bereich von 270 min ein Cd-bindendes Protein eluiert. Dieses entsprach nach vorangegangener Kalibration einem MG von 12.7 kDa. Die wiederholte Injektion des Lebercytosols über einen Zeitraum von 4 Wochen ergab ein durchschnittliches MG von 13.2 \pm 0.7 kDa (n=7) für das Cd-bindende Protein. Auf die Messung bei drei Wellenlängen (220, 254 und 280 nm) wurde an dieser Stelle verzichtet, weil im Bereich des Cd-bindenden Proteins zu viele andere Proteine eluierten und eine Interpretation der Ergebnisse erschwert würde.

4.2.3 IEC

Nach Konzentrierung der GPC-Fraktionen, die das Cd-bindende Protein enthielten, wurde das Konzentrat mittels IEC getrennt. Abb. 9 zeigt das entsprechende Chromatogramm. Es zeigt sich die Trennung von zwei Cd-bindenden Proteinen. Das als MT-I bezeichnete Protein eluierte dabei bei 16.5 min. Das als MT-II gekennzeichnete Protein eluierte bei 22.7 min.



Abb. 9: IEC-Trennung des Cd-bindenden Proteins nach GPC-Isolierung; UV-Detektion bei 220 nm in mAU (durchgezogene Linie); Cd-Konzentration in μ g/L Eluat (schwarze Balken).



Abb. 10: IEC-Trennung des Cd-bindenden Proteins nach GPC-Isolierung; UV-Detektion bei 220, 254 und 280 nm (s. Legende); MT-I und MT-II kennzeichnen Cd-bindende Proteine; Auf die Darstellung der Cd-Gehalte der Fraktionen wird wegen der besseren Übersichtlichkeit verzichtet.
Als weiteres Identifizierungsmerkmal diente das für MT charakteristische UV-Absorptionsverhalten. Abb. 10 zeigt die Kombination aus zwei IEC-Chromatogrammen eines weiteren GPC-Isolats (Lebercytosol, Cd-exponiert), bei denen die Wellenlängen 220, 254 und 280 nm vermessen worden sind. Es zeigt sich auch hier die Trennung von zwei Cdbindenden Proteinen (bezeichnet als MT-I und MT-II). Der Vergleich der Absorptionen bei den drei genannten Wellenlängen ergab die stärkste Absorption bei 220 nm, während bei 280 nm nur eine schwache Absorption zu verzeichnen war. Bei 254 nm trat eine um den Faktor zwei geringere Absorption im Vergleich zu 220 nm auf.

Die Messung der nativ gebundenen Metalle Zn, Cu und Cd wird in Kapitel 4.2.5 im Rahmen der Ergebnisse der Cd-Saturation vorgestellt.

4.2.4 Proteindenaturierung

Die Überprüfung der Wirksamkeit der fraktionierten Acetonfällung als Proteindenaturierungsmethode wurde mittels GPC vorgenommen. Es wurde das Lebercytosol von Cd-exponierten Klieschen eingesetzt und der Vorschriften entsprechend behandelt. Abb. 11 zeigt das Ergebnis der Acetonbehandlung.



Abb. 11: GPC-Trennung eines Lebercytosols (Cd-exponiert) nach Acetonbehandlung; UV-Detektion bei 220 nm in mAU (durchgezogene Linie); Cd-Konzentration in μ g/L Eluat (schwarze Balken).

Es zeigt sich, daß die hochmolekularen Proteine nahezu vollständig abgetrennt worden sind. Der Peak bei 460 min entsprach dem Säulenvolumen und ist auf Acetonreste aus der Aufarbeitung zurückzuführen. Das Cd-bindende Protein eluierte nach Acetonbehandlung bei etwa 260 min und entspricht vom MG dem Cd-bindenden Protein in Abb. 8.

Die Acetonfällung stellt somit einen effizienten Reinigungsschritt dar. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese Fällung einen Ersatz für die GPC darstellen kann. Das Lebercytosol einer Cd-exponierten Kliesche wurde acetonbehandelt und mittels IEC getrennt. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt.



Abb. 12: IEC-Trennung eines Acetonextraktes (Lebercytosol, Cd-exponiert); UV-Detektion bei 254 nm in mAU (durchgezogene Linie); Cd-Konzentration in µg/L Eluat (schwarze Balken); MT-I und MT-II kennzeichnen Cd-bindende Proteine.

Es zeigt sich, daß die Acetonfällung ein ausreichendes Potential besitzt, die GPC als Reinigungsschritt zu ersetzen. Es eluierten zwar große Mengen an nicht-retardierten Proteinen im Totvolumen der Säule (zwischen 3 und 9 min); dennoch kam es auch in diesem Fall zu einer Trennung der als MT-I (16 min) und MT-II (21.5 min) bezeichneten Cdbindenden Proteine. Die Elution von Proteinen im Bereich der Cd-bindenden Proteine war vor dem Hintergrund der Entwicklung einer Quantifizierungsmethode ebenfalls akzeptabel. Für eine Isolierung, insbesondere des MT-I, wäre die Kombination aus Acetonfällung und IEC nicht ausreichend.

4.2.5 Metallzusammensetzung und Cd-Saturation

Im Folgenden sollte die Bindung der Schwermetalle Zn, Cu und Cd überprüft werden. Ein wichtiges Charakteristikum der MT ist der Austausch von Metallen unterschiedlicher Affinitäten. Zu diesem Zweck sollte zusätzlich eine Cd-Saturation durchgeführt werden. Abb. 13 zeigt die Bestimmung der Metallzusammensetzung eines Acetonextraktes (Lebercytosol, Cd-exponiert) nach IEC ohne Cd-Saturation während der Aufarbeitung.



Abb. 13: Metallzusammensetzung der MT-Isoformen (ohne Cd-Saturation). UV-Detektion bei 254 nm in mAU (durchgezogene Linie). Metallkonzentrationen in µmol/L Eluat (vgl. Legende). MT-I und MT-II kennzeichnen Cd-bindende Proteine.

Das als MT-I bezeichnete Protein band insgesamt 0.22 µmol der untersuchten Metallionen. Hiervon entfielen 47 % auf Cd, 38 % auf Zn und 15 % auf Cu. Dabei lagen die Cu-Gehalte im Bereich der Nachweisgrenze und waren somit größeren Schwankungen unterworfen. Das zweite als MT-II bezeichnete Protein band insgesamt 1.44 µmol Metallionen. Anteilig entfielen hiervon auf Cd 37 %, auf Zn 40 % und auf Cu 23 %.



Abb. 14: Metallzusammensetzung der MT-Isoformen (mit Cd-Saturation). UV-Detektion bei 254 nm in mAU (durchgezogene Linie). Metallkonzentrationen in µmol/L Eluat (vgl. Legende). MT-I und MT-II kennzeichnen Cd-bindende Proteine.

Abb.14 zeigt die Metallzusammensetzung desselben Acetonextraktes (Lebercytosol, Cdexponiert) nach IEC, der zusätzlich einer Cd-Saturation unterworfen worden ist.

Nach Cd-Saturation wurden von dem als MT-I bezeichneten Protein insgesamt 0.17 µmol der untersuchten Metallionen gebunden. Dieser Wert setzte sich zu 99 % aus Cd und zu 1 % aus Zn zusammen. Das zweite als MT-II bezeichnete Protein band insgesamt 1.43 µmol Metallionen. Anteilig entfielen hiervon 87 % auf Cd, 8 % auf Zn und 5 % auf Cu. Auch hier lagen die Cu-Werte im Bereich der Nachweisgrenze.

Beim Vergleich der Summen der gebundenen Metalle Cd, Zn und Cu des unbehandelten und des Cd-saturierten Acetonextraktes zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Werte für MT-II (1.44 bzw. 1.43 µmol). Der Vergleich der Werte für MT-I zeigt größere Abweichungen, die sich aber auf größere Schwankungen aufgrund der Messung im Bereich der Nachweisgrenze zurückführen lassen (vgl. Anhang 8.1.7.3).

4.2.6 Identifizierung der Cd-bindenden Proteine als MT-Isoformen

Im Folgenden soll auf die Identifizierung der isolierten Cd-bindenden Proteine als MT-Isoformen eingegangen werden. Durch die in den Kapiteln 4.2.2 bis 4.2.5 vorgestellte Isolierung ergeben sich folgende Charakteristika der Cd-bindenden Proteine:

- MG: 13.2 kDa
- Trennung des 13.2 kDa Proteins in zwei Proteine mit unterschiedlichem pl
- UV-Absorption: 220nm > 254 nm > 280 nm
- Stabilität gegenüber Aceton (wäßrige 50 %-ige Lösung)
- Bindung von Zn, Cu und Cd
- Austausch von Zn und Cu gegen Cd

Beim Vergleich dieser Eigenschaften mit den in Kap. 2.3 vorgestellten Eigenschaften der MT ist ein hohes Maß an Übereinstimmung vorhanden: GEORGE und LANGSTON (1994) beschreiben, daß MT mariner Organismen eine sehr hohe Homologie zu Säuger-MT aufweisen. Diese Homologie bezieht sich auf MG, Isoformenbildung, pl und die Metallbindungseigenschaften. Das charakteristische UV-Absorptionsverhalten zeiat Übereinstimmung mit den Ergebnissen von OLSSON und HAUX (1985) sowie mit den spektroskopischen Untersuchungen von ATRIAN et al. (1995). Die Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen wird vergleichbar von THOMPSON und SUTHERLAND (1992) beschrieben. Es wird daher gefolgert, daß es sich bei den als MT-I und MT-II bezeichneten Cd-bindenden Proteinen um die beiden Isoformen der MT handelt. Diese wurden bereits von anderen Autoren beschrieben, die identische oder vergleichbare Isolierungsmethoden aus Klieschenlebern angewandt haben (DUQUESNE und RICHARD, 1994; 1995; KAMMANN, 1995).

Eine Ausnahme von diesen charakteristischen Eigenschaften bildet der Austausch von Cu gegen Cd. GEORGE und OLSSON (1994) sowie DUQUESNE und RICHARD (1994) beschreiben, daß ein Cu-Austausch durch Cd nicht stattfindet. Dagegen beobachtete KLEIN et al. (1994), daß Cd im großen Überschuß Cu verdrängen könnte. Diese Aussage wird unterstützt durch die Untersuchungen von OLSSON et al. (1995) sowie SAITO und KOJIMA (1997), die vermuten, daß ein Austausch von Cu gegen Cd stattfindet oder daß eine höhere Affinität des Cd zu MT vorliegt. Die Bestimmung der Halbwertszeit von ⁶⁴Cu gebunden an MT liegt bei 2 h, während die Halbwertszeit des Proteins (bestimmt durch Inkorporation von [³⁵S]-Cystein) 12 h beträgt. Der gleichzeitig bestimmte Gesamt-Cu-Gehalt des MT verändert sich in dieser Zeit nicht (zitiert bei DUNN et al., 1987). Diese Untersuchungen implizieren einen Cu-Austausch. Die vorliegende Untersuchung belegt, daß ein Austausch möglich ist. Mögliche Gründe könnten die hohe Cd-Konzentration im Vergleich zur MT-Konzentration oder die lange Inkubationszeit von mehr als einer Stunde während der Zentrifugation sein. Im Vergleich zu anderen Autoren wurde in der vorliegenden Untersuchung die Cd-Saturation direkt am Beginn der Aufarbeitung in Anwesenheit großer Proteinmengen durchgeführt und nicht ein Isolat mit Cd versetzt.

4.3 Quantifizierung

4.3.1 Auswahl der Methode

In Kapitel 4.2 wurde im Zusammenhang mit der Isolierung der MT-Isoformen gezeigt, daß die GPC zugunsten der zeitlich schnelleren Acetonfällung ersetzt werden kann. In Hinblick auf eine Routinemethode zur Bewältigung eines großen Probeaufkommens stellt die Kombination aus Acetonfällung und IEC eine geeignete Methode dar. Ein Problem bei der Quantifizierung von MT in Freilandproben ist der geringe Gehalt an MT. Die UV-Detektion reicht aufgrund der geringen Nachweisgrenze und dem Vorkommen von koeluierenden Proteinen (vgl. Kapitel 4.2.4, Abb. 12), vor allem für die Quantifizierung des MT-I, nicht aus. Daher sollte im Folgenden die Möglichkeit der indirekten Quantifizierung der MT über den Cd-Gehalt untersucht werden. Ein vollständig Cd-saturiertes MT-Molekül bindet ungefähr 10 % des Gewichtes an Cd. Die Cd-Bestimmung mittels GF-AAS sollte mit einer Nachweisgrenze von 0.05 µg/L (vgl. Anhang 8.1.7.4) empfindlich genug sein, um die geringen MT-Gehalte (um 20 µg/g Leber; OVERNELL et al., 1987a) im Freiland zu erfassen. Über die Gehalte des mengenmäßig in geringen Mengen vorliegenden MT-I liegen keine quantitativen Informationen vor. Um diese Quantifizierung durchführen zu können, muß das natürlicherweise mehrere Metallspezies bindende MT-Molekül nach Möglichkeit nur eine Metallspezies enthalten. In Kapitel 4.2.5 konnte gezeigt werden, daß der Austausch der natürlicherweise gebundenen Metalle Zn und Cu durch Cd nahezu quantitativ erfolgt.

4.3.2 Bezugsgröße

Die Untersuchung von MT in Freilandproben soll zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt werden. Es ist daher vor dem Hintergrund des ausgeprägten Jahresganges der Leberlipidgehalte (Spanne: 5–38 %; SABOROWSKI und BUCHHOLZ, 1996) nicht sinnvoll, das Leberfrischgewicht als Bezugsgröße zu wählen. Eine geeignete Bezugsgröße stellt der Proteingehalt der Leber bzw. des Cytosols dar.

4.3.3 Optimierung der Cd-Saturation

Bei der angewandten Methode handelt es sich wie beschrieben um eine Kombination aus Cd-Saturation und Acetonfällung mit anschließender Bestimmung des Cd in den MT-haltigen Fraktionen nach der IEC. Die Berechnung der MT-Gehalte erfolgt aus dem Cd-Gehalt und wird auf den Proteingehalt des Cytosols bezogen. Die zugesetzten Mengen an Cd (bezogen auf 1 g Probe) variiert nach Literaturangaben von 0.0005 µg Cd (KLEIN et al., 1994) bis zu 100 µg Cd (KAMMANN et al., 1996). Dabei wird das Cd jeweils zu den Fraktionen gegeben, die bereits einem Reinigungsschritt wie der Hitzefällung unterworfen worden sind (PAN et al., 1991; BERGER et al., 1995; TESSIER und BLAIS, 1996). Bei der in dieser Untersuchung angewendeten Methode erfolgte die Cd-Saturation zu Beginn der Aufarbeitung direkt nach der Homogenisierung bei hohen Proteinkonzentrationen. Diese Proteine binden Cd unspezifisch und bewirken, daß mehr Cd zugegeben werden muß als in anderen Untersuchungen beschrieben. Um die Absättigung der MT und den Zusammenhang zwischen der zugegebenen Cd-Menge (Cd [µg] bezogen auf ein g Lebereinwaage) und dem MT-Gehalt zu überprüfen, wurde ein Homogenat aus mehreren Lebern (Freilandproben) mit verschiedenen Konzentrationen an Cd versetzt. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



Abb. 15: Überprüfung der Cd-Saturation (Mittelwerte; Fehlerbalken kennzeichnen Standardabweichung; n=3); MT-Gehalte in µg/mg Protein (s. Legende).

Je nach Isoform wurde die Absättigung mit Cd und die Verdrängung von Zn und Cu nach unterschiedlichen Cd-Konzentrationen erreicht. Bei dem MT-II-Isoform wurde die Absättigung bei 56 µg Cd erreicht. Das entspricht bei Bezug der MT-Werte auf das Frischgewicht (Rechnung nicht dargestellt) etwa dem 10-fachen Überschuß an Cd, der für eine Absättigung nötig wäre. Bei Erhöhung der Cd-Menge auf bis zu 168 µg tritt keine Veränderung der MT-Werte ein. Es wird deutlich, daß das nur in geringen Konzentrationen

vorliegende MT-I schon bei einer Cd-Gabe von 28 µg vollständig gesättigt ist. Aus diesem Grund wurde die Cd-Saturation mit geringeren Cd-Mengen wiederholt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 16 dargestellt.



Abb. 16: Überprüfung der Cd-Saturation für MT-I (Mittelwerte; Fehlerbalken kennzeichnen Standardabweichung; n=3); MT-Gehalt in μ g/mg Protein.

Aus Abb. 16 geht hervor, daß die vollständige Sättigung des MT-I-Isoforms bereits bei 11.2 µg eingetreten ist. Auch hier entspricht die Cd-Menge einem etwa 10-fachen Überschuß der rechnerisch benötigten Cd-Menge. Für die Quantifizierungsmethode wurde daher die Cd-Saturationsmenge auf 112 µg festgelegt. Diese Menge entspricht bei einem MT-Gehalt von 10 µg/mg Protein einem 10 bis 15-fachen Überschuß an Cd. Das nur in geringen Mengen enthaltene MT-I wird mit einem 100-fachen Überschuß gesättigt, wodurch sich aber keine Beeinträchtigung der erhaltenen Werte ergibt (vgl. Abb. 15).

LEHMANN und KLAASEN (1986) entwickelten eine Cd-Saturationsmethode, wobei die Absättigung der MT ebenfalls mit verschiedenen Mengen Cd überprüft wurde. Die zugegebenen Cd-Mengen entsprachen einem 0.5- bis 3-fachen Überschuß, wobei sich herausstellte, daß ein etwa 2-facher Überschuß ausreichend war. Die Zugabe erfolgte nach der Ultrazentrifugation, also bei niedrigeren Proteinkonzentrationen als in der vorliegenden Untersuchung, wodurch die niedrige Cd-Konzentration erklärt werden kann.

4.3.4 Methode

Die entwickelte Methode ist in Übersicht in Abb. 17 dargestellt. Die gewogene Leber wird homogenisiert und nach Zusatz der CdCl₂-Lösung zentrifugiert. Von dem erhaltenen Cytosol wird ein Teil für die Proteinbestimmung eingefroren. Der Rest wird nach Einwaage der fraktionierten Acetonfällung unterworfen und das 80 %-Acetonpräzipitat im IEC-Puffer aufgenommen. Der Extrakt wird mittels IEC in die Isoformen getrennt und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Die den Isoformen entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und gegebenenfalls verdünnt. Nach Ansäuerung wird mittels GF-AAS der Cd-Gehalt bestimmt und die MT-Gehalte berechnet.



Abb. 17: Aufarbeitungsschema für die Bestimmung von MT-Isoformen aus Klieschenleber

4.3.5 Validierung

Die Validierung der entwickelten Methode dient der Ermittlung von Verfahrenskenndaten. Da für MT-Bestimmungen bisher keine zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung standen, konnte keine Richtigkeitsüberprüfung der Methode stattfinden. Für die Präzisionsbestimmung wurde aus mehreren Klieschenlebern (Freiland) ein Homogenat hergestellt, in Portionen von 1 g bei –80°C gelagert und Wiederholmessungen durchgeführt. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte durch Dotierung des Homogenates mit MT-I-Standard (isoliert aus Kaninchen).

4.3.5.1 Verfahrenskenndaten

Die Bestimmung der Präzision der entwickelten Methode ergab die in der Tab. 5 aufgeführten Kenndaten.

	MT-I [µg/mg Protein]	MT-II [µg/mg Protein]
1	0.74	9.55
2	0.97	8.52
3	0.87	9.53
4	1.04	11.36
5	0.99	8.42
Х	0.92	9.74
Sr	0.12	1.18
CV [%]	13.0	12.1

Tab. 5: Verfahrenskenndaten der MT-Bestimmung (n=5). X=Mittelwert, s_r =Standardabweichung, CV=Variationskoeffizient.

Bei n=5 Wiederholmessungen beträgt die Standardabweichung (s_r) im Fall von MT-I 0.12 µg/mg (Tab. 5). Daraus resultiert ein Variationskoeffizient (CV) von 13%. Für MT-II ergeben sich Werte für s_r von 1.18 und CV von 12.1%. Der relativ hohe Variationskoeffizient liegt z.T. in der spurenanalytischen Bestimmung von Cd begründet. Im Rahmen der Bestimmung der Cd-Gehalte in Klieschenlebern wurde über eine Zeit von 12 Monaten ein zertifiziertes Referenzmaterial mitgeführt. Bei 20 Wiederholmessungen ergab sich ein CV von 9.7 %. Damit ist die relativ hohe Variation der MT-Bestimmung teilweise erklärbar. Eine weitere Unsicherheit ist die isoformengetrennte Fraktionierung nach der IEC. Hier ist es nicht möglich, alle Fraktionen zu vermessen. Durch das isoformengetrennte Vereinigen der Fraktionen kann es zu Ungenauigkeiten kommen. Für die Bestimmung einer biochemischen

Meßgröße ist der CV auf jeden Fall ausreichend, da die Variabilität der einzelnen Proben einer Station größer ist und die erwarteten Unterschiede der MT-Mittelwerte der Klieschen unterschiedlicher Stationen noch größer ausfallen. So bestimmten SULAIMAN et al. (1991) CV von 11 bis 22 % für Flundern unterschiedlicher Stationen. HAMZA-CHAFFAI et al. (1995) beobachteten bei verschiedenen Fischarten vor der tunesischen Küste CV von 30-50%.

4.3.5.2 Nachweisgrenze und praktischer Arbeitsbereich

MT sind natürliche Bestandteile von Klieschenlebern. Es existiert folglich kein Probematerial, in dem diese Proteine nicht vorhanden sind. Aus diesem Grund ist die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht möglich.

Da der MT-Gehalt indirekt über den Cd-Gehalt in den Isoformen bestimmt wird, kann aber die Nachweisgrenze für die MT-Bestimmung aus den Daten der Cd-Bestimmung abgeleitet werden.

Die Nachweisgrenze für die Cd-Bestimmung mittels GF-AAS liegt bei 0.05 μ g/L (berechnet nach der Leerwertmethode, DIN 32645, 1994). Unter Berücksichtigung der Aufarbeitung und einer vollständigen Absättigung der MT mit Cd ergibt sich eine Nachweisgrenze von 1 ng MT/mg Protein (0.02 μ g/g Leber) und eine Bestimmungsgrenze von 4 ng MT/mg Protein (0.09 μ g/g Leber).

In Freilandproben sind natürlicherweise Gehalte an MT enthalten, die weit über diesen Grenzen liegen. Weibliche Klieschen aus der Nordsee weisen laut HYLLAND et al. (1992) Gehalte von 200 bis 300 μ g/g Leber auf (entsprechend etwa 10 bis 15 μ g/mg Protein). Nach Angaben von GEORGE und LANGSTON (1994) haben Schollen einer als unkontaminiert bezeichneten Station MT-Werte von 15 bis 80 μ g/g Leber. Werte für MT-I oder MT-II werden in der Literatur nicht beschrieben.

4.3.5.3 Wiederfindung

Es ist möglich, eine Wiederfindung über den Verlauf der Aufarbeitung bis zur IEC zu berechnen. Dies geschieht über den Gesamtcadmiumgehalt von undotierten und dotierten Proben. Hierbei wird rechnerisch der Cd-Gehalt des MT-I-Standards, der vor der Acetonfällung zugegeben wurde, auf den Cd-Gehalt der undotierten Proben addiert und der daraus resultierende Gehalt mit dem der dotierten Proben verglichen. In den undotierten Proben befanden sich im Durchschnitt 3.64 μ g Cd/mL (s_r=0.62 μ g/mL) bevor sie auf die IEC gegeben wurden. In 1 mL des dotierten Standards sind 4.84 μ g Cd/mL (Herstellerangaben) vorhanden. Theoretisch müßten demnach bei Dotierung mit 1 mL Standard 3.64 + 4.84 μ g Cd/mL in den dotierten Proben vorhanden sein. Praktisch ergab die Messung einen Wert von 8.32 μ g Cd/mL (s_r= 1.54 g/mL) und damit eine Wiederfindung von 98 % für die Acetonfällung. Die Homogenisierung und Zentrifugation kann nicht auf eine mögliche

Wiederfindung geprüft werden. THOMPSON und SUTHERLAND (1992) wiesen in ihren Untersuchungen Wiederfindungen nach der Acetonfällung von 87 % nach. Diese Messungen wurden an Standards durchgeführt und ergaben bei der Messung von dotierten Cytosolen Wiederfindungswerte von 28 % und weniger. Die Unterschiede im analytischen Vorgehen liegen bei THOMPSON und SUTHERLAND (1992) in der Inkubationstemperatur von 0°C nach Acetonzugabe und der Lagertemperatur von 4°C der resolvatisierten Proteine nach der 80 %-igen Acetonfällung. In der vorliegenden Untersuchung wird bei –20 °C gekühlt und die resolvatisierten Proteine nach Beendigung der Acetonfällung sofort bei –80 °C gelagert. Die Bestimmung der Wiederfindung über die gesamte Aufarbeitung einschließlich IEC erwies sich aufgrund eines ungeeigneten MT-I-Standards als schwierig. Der Standard der Firma Sigma weist laut Herstellerangaben 6.2 Gew-% Cd auf. Dieser Wert konnte mit 6.1 % auch bestätigt werden, allerdings zeigte sich bei der IEC, daß der Standard zu 23 % aus dem Isoform MT-II bestand (berechnet über Peakflächen). Eine Bestimmung der Wiederfindung nach der IEC wird daher nicht durchgeführt. Andere Standards waren nicht verfügbar.

5 Ergebnisse

5.1 Hälterungsexperiment Cd

Am 2. Versuchstag wurde keine Gruppe K im Versuch mitgeführt. In der 5 mg/kg-Gruppe des 5. Probenahmetages überlebten 4 von 6 Fischen, während in der 5 mg/kg-Gruppe des letzten Probenahmetages (10. Tag) alle Fische verstarben. Eine vollständige Tabelle mit allen Daten des Experimentes sind im Anhang unter 8.3 aufgeführt.

5.1.1 Schwermetallgehalte

5.1.1.1 Zink

Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Zn-Bestimmungen in den Klieschenleberproben des Hälterungsexperimentes Cd. Aus der Abbildung geht hervor, daß der Zn-Gehalt in den Behandlungsgruppen K, PBS, 10 µg und 100 µg relativ konstant blieb. Die Gehalte in diesen Gruppen lagen im Median zwischen 25.5 und 35.3 mg/kg. Es konnten sowohl innerhalb einer Behandlungsgruppe als auch beim Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



Abb. 18: Zn-Gehalte der Klieschenlebern des Tierversuches Cd (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=4-7 für jede Behandlungsgruppe und -tag).

Die Behandlungsgruppe 1 mg zeigte tendenziell geringere Zn-Gehalte als die Kontrollgruppe (22.9 – 31.6 mg/kg); eine statistische Analyse ergab jedoch keine Unterschiede. Die Behandlungsgruppen mit der höchsten Cd-Konzentration (5 mg) zeigten an allen Behandlungstagen mit 13.3 bis 18.0 mg/kg signifikant niedrigere Zn-Werte als die Kontrollbzw. PBS-Gruppen (p<0.05).

5.1.1.2 Cadmium

Die Cd-Gehalte der Versuchsgruppe K (Kontrolle) lagen zwischen 24.8 und 66.3 µg/kg, die der PBS-Gruppe zwischen 49.2 und 98.2 µg/kg (vgl. Abb. 19).



Abb. 19: Cd-Gehalte der Klieschen des Tierversuches Cd. Versuchsgruppen K, PBS und 10 μ g (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=4-7 für jede Behandlungruppe und -tag).

Die Gruppe mit der niedrigsten Cd-Behandlung (10 µg) zeigte am 5. und am 10. Tag mit medianen Cd-Gehalten von 236.9 bzw. 260.0 µg/kg signifikant höhere Werte als die PBSbzw. K-Gruppe.

Die Gruppe der 100 μ g-Behandlung wies einen Cd-Konzentrationsverlauf (Median) von 462, 916, 2683 und 3950 μ g/kg auf (Abb. 20). Vom ersten Behandlungstag an zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontroll- bzw. PBS-Gruppe (p<0.01) sowie zur 10 μ g-Behandlungsgruppe (p<0.05). Innerhalb der Gruppe ist ein Anstieg der Werte zu verzeichnen (p<0.05). Lediglich zwischen dem 1. und 2. Tag war kein Unterschied festzustellen.



Abb. 20: Cd-Gehalte der Klieschen des Tierversuches Cd. Versuchsgruppen K, 100 μ g, 1 mg und 5 mg (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=4-7 für jede Behandlungsruppe und -tag).

Die 1 mg-Gruppe (vgl. Abb. 20) zeigte einen Konzentrationsanstieg vom 1. bis zum 10. Tag (10101 bis 21447 μ g/kg). Dabei war innerhalb der Gruppe kein Unterschied in den Cd-Gehalten festzustellen (p>0.05). An allen Tagen war ein Unterschied zu allen anderen Versuchsgruppen mit Ausnahme der Gruppe 5 mg nachweisbar (p<0.01).

Die Versuchsgruppe mit der höchsten Cd-Exposition (5 mg; vgl. Abb. 20) zeigte Gehalte von 41928 bis 47822 µg/kg. Während innerhalb der Behandlungsgruppe keine Unterscheidung möglich war, bestand ein signifikanter Unterschied zu allen anderen Gruppen des jeweiligen Versuchstages mit Ausnahme der 1 mg-Behandlungsgruppe.

5.1.2 MT-Gehalte

Abb. 21 stellt die Ergebnisse der Bestimmung von MT-1 aus Klieschen des Versuches Cd dar. Die Behandlungsgruppen K, PBS, 10 μ g und 100 μ g zeigten mediane Gehalte zwischen 0.1 bis zu 0.29 μ g/mg. Es waren keine Unterschiede innerhalb einer dieser Behandlungsgruppen bzw. an einem Behandlungstag im Vergleich der Behandlungsgruppen festzustellen. Es wird deutlich, daß eine Induktion des Isoforms MT-1 bei einer Applikation

von 1 mg/kg eintritt. Die medianen Gehalte erhöhten sich von 0.54 μ g/mg (1. Tag) auf 1.51 μ g/mg (10. Tag). Ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Gruppen K und PBS war am 1. und 2. Versuchstag festzustellen und blieb am 5. bzw. 10. Tag bestehen (p<0.01). Die 5 mg-Behandlungsgruppe zeigte mit 1.51 μ g/mg bereits am 1. Tag einen signifikanten Unterschied zu den Gruppen K und PBS (p<0.001). Die MT-1-Gehalte in dieser Gruppe fielen am 2. Tag auf das Kontrollniveau von etwa 0.2 μ g/mg ab und waren nicht mehr von den Gruppen K und PBS unterscheidbar.



Abb. 21: MT-1-Gehalte der Klieschen des Tierversuches Cd. Alle Behandlungsgruppen und –tage (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=4-7 für jede Behandlungsgruppe und -tag).

Die Gehalte des Isoforms MT-2 für Klieschen des Versuches Cd sind in Abb. 22 dargestellt. Die medianen Gehalte der Kontrollgruppen K und PBS lagen zwischen 0.98 und 1.45 μ g/mg. Es waren keine Unterscheide nachweisbar. Die Behandlungsgruppe mit der niedrigsten Cd-Konzentration (10 μ g/kg) zeigte zwar am letzten Behandlungstag (10. Tag) einen medianen MT-2-Gehalt von 2.59 μ g/mg, dieser war jedoch im Vergleich zu den Kontrollwerten nicht signifikant erhöht. Eine nachweisbare MT-2-Induktion zeigte sich am 5. bzw. 10. Behandlungstag der 100 μ g-Gruppe mit Erhöhung der Gehalte auf 4.36 bzw. 5.85 μ g/mg (p<0.05). Die Gehalte der 1 mg-Gruppe lagen zwischen 3.26 und 6.01 μ g/mg und zeigten keinen zeitlichen Trend innerhalb der Gruppe. Diese Gruppe zeigte an allen Tagen trotz hoher Schwankungen signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen K und PBS. Die Behandlungsgruppe mit der höchsten Cd-Konzentration von 5 mg/kg zeigte an allen Behandlungstagen mit medianen Gehalten von 3.02 bis zu 3.44 µg/mg Unterschiede zum Kontrolllevel der K- und PBS-Gruppen. Alle Gruppen, die eine Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten, waren untereinander nicht verschieden.



Abb. 22: MT-2-Gehalte der Klieschen des Tierversuches Cd. Alle Behandlungsgruppen und –tage (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=4-7 für jede Behandlungsgruppe und -tag).

Der Vergleich der Induktion von MT-1 bzw. MT-2 im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigt, daß MT-1 erst bei einer Konzentration von 1 mg/kg verstärkt induziert wurde, während MT-2 bereits bei 100 µg/kg induziert wurde.

5.1.3 Korrelationen der MT-Gehalte mit den Schwermetallgehalten

Eine Korrelationsüberprüfung nach Spearman ergab signifikante Zusammenhänge zwischen MT-Gehalten und Cd-Gehalten. Die Koeffizienten der Korrelation betrugen für MT-1 und Cd r=0.509, während für MT-2 und Cd ein Werte von r=0.570 festgestellt wurde (p<0.001). Zn-Gehalte und MT-Gehalte korrelierten nicht.

5.2 Hälterungsexperiment ST

Eine vollständige Tabelle aller Daten des Experimentes sind im Anhang unter 8.4 aufgeführt.

5.2.1 MT-Gehalte

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der MT-1-Bestimmung der Klieschenproben aus dem Tierversuch ST. Der mediane Gehalt der Kontrollgruppe lag bei 0.04 μ g/mg, während bei den unter reduziertem Salzgehalt (25 ‰) gehälterten Klieschen ein Anstieg der MT-1-Werte auf 0.41 μ g/mg zu verzeichnen war. Die Erhöhung der Wassertemperatur von 4 °C auf 9 °C bewirkte einen Anstieg der MT-Gehalte auf 0.54 μ g/mg. In beiden Fällen war ein signifikanter Unterschied (p<0.001) der Gehalte im Vergleich zum Kontrollwert festzustellen.



Behandlung

Abb. 23: Hälterungsexperiment ST. MT-1-Gehalte (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=9-10 für jede Behandlungruppe).

Abb. 24 stellt die Ergebnisse des Tierversuches ST für das Isoform MT-2 dar. Die Gehalte der Kontrollgruppe betrugen im Median 0.64 µg/mg. Durch Änderung der Bedingungen stiegen die medianen Gehalte auf 1.76 µg/mg (Salz) bzw. 2.78 µg/mg (Temperatur). Beide Behandlungsstufen unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Die Behandlungsgruppen Salz und Temperatur unterschieden sich ebenfalls signifikant.



Abb. 24: Hälterungsexperiment ST. MT-2-Gehalte (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range; n=9-10 für jede Behandlungsgruppe.

Beim Vergleich der Induktion beider Isoformen zeigt sich, daß mengenmäßig MT-2 überwog. Betrachtet man aber die Zunahme im Vergleich zur Kontrolle so ergab sich eine Zunahme von Faktor 10 bis 13 für MT-1 gegenüber einer Zunahme von 2.7 bis 4.3 für MT-2.

5.3 Freiland

Die vollständigen Datensätze und Korrelationsergebnisse zu den Freilandprobenahmen finden sich im Anhang. Dabei werden unter 8.5 Daten zur Probenahme WH 179, unter 8.6 Daten Probenahme WH 185 und unter 8.7 Daten zur Probenahme WH 191 wiedergegeben.

5.3.1 Schwermetallgehalte

5.3.1.1 Zink

Stationsunterschiede einer Ausfahrt (s. Abb. 25)

WH 179. Die medianen Zn-Gehalte für Klieschen der Ostsee im Dezember bzw. Januar lagen in einem Bereich von 39 mg/kg (Station B 01) bzw. 41 mg/kg (B 12). In der Nordsee wiesen Klieschen der Stationen N 01, N 04 und N 06 Gehalte zwischen 41 und 46 mg/kg auf. Die höchsten Zn-Gehalte mit 54 mg/kg konnten für Klieschen der Station G 08 festgestellt werden. Klieschen dieser Station wiesen signifikant höhere Zn-Gehalte auf als Klieschen der anderen Stationen.



Abb. 25: Jahreszeitlicher Vergleich der Zn-Gehalte in Klieschenlebern aller Ausfahrten (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=25 für jede Station und Ausfahrt).

WH 185. Die Stationen B 01 und B 12 wurden nicht beprobt. Die Zn-Gehalte der Klieschen lagen in einem Bereich von 32 mg/kg (N 01) bis 40 mg/kg (G 08). Klieschen der Station G 08 zeigten signifikant höhere Zn-Werte in den Lebern als Fische der anderen Stationen (p<0.01).

WH 191. Die Zn-Werte lagen für Klieschen der Ostseestationen im Median bei 35 mg/kg (B 01) bzw. 37 mg/kg (B 12). Es ergeben sich signifikante Unterschiede der Stationen B 01 und B 12 zu allen Nordseestationen mit Ausnahme von N 06. Die Stationen B 01 und B 12 unterscheiden sich nicht. Die Werte für Klieschen der Nordseestationen lagen in einem Bereich von 44 mg/kg (N 06) und 59 mg/kg (G08). Die Station G 08 unterscheidet sich bei der Ausfahrt WH 191 in der Nordsee nur von Station N 06 (p<0.01).

Saisonale Unterschiede

Abb. 25 zeigt die Ergebnisse der Zn-Bestimmungen in Klieschenlebern der Ausfahrten WH 179, 185 und 191. Während der Ausfahrt WH 185 wurden die Ostseestationen B 01 und B 12 nicht angelaufen. Ein jahreszeitlicher Vergleich ist an diesen Stationen nicht möglich.

Ein Vergleich der Mediane der Zn-Werte von Klieschen einer Station ergab Unterschiede der Gehalte im Bereich von 7 mg/kg (N 06; WH 185 versus WH 191) bis zu 21 mg/kg (N 04; WH 185 versus WH 191). Dabei waren die Werte im Frühsommer durchgängig niedriger als im Winter. Die Mediane der Zn-Werte der Proben, die während der Ausfahrten im Winter (WH 179 und WH 191) gewonnen wurden, zeigten eine gute Übereinstimmung und wiesen maximale Differenzen der Mediane von 12 mg/kg (N 04) auf. Die geringsten Unterschiede konnten mit 1 mg/kg für N 06 ermittelt werden.

Zur Ermittlung eines Einflusses der Jahreszeit (Winter oder Frühsommer) auf die Zn-Gehalte in Klieschen wurde mittels Kruskall-Wallis-Test jeweils eine Station auf jahreszeitliche Unterschiede untersucht. Die statistische Analyse der Daten zeigt signifikante Unterschiede für alle Nordseestationen im jahreszeitlichen Vergleich (p<0.001). Klieschen der untersuchten Nordseestationen zeichneten sich allgemein durch höhere Zn-Gehalte im Vergleich zu Ostseeklieschen aus (p<0.001).

5.3.1.2 Cadmium

Stationsunterschiede einer Ausfahrt

Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Cd-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 179. Die medianen Cd-Gehalte erstreckten sich über einen Bereich von 46 μ g/kg (B 12) bis zu 310 μ g/kg (N 06). Klieschen der Nordseestationen N 01 und N 04 wiesen mit 130 μ g/kg und 133 μ g/kg nahezu gleiche Gehalte auf. Klieschen der Station G 08 waren durchschnittlich mit 188 μ g Cd/kg belastet. Die statistische Analyse ergab signifikant höhere Cd-Werte der Klieschen der Station N 06 im Vergleich zu allen anderen Stationen (p<0.001). Klieschen der Station B 12 wiesen im Vergleich mit allen untersuchten Nordseestationen signifikant niedrigere Cd-Werte auf. Zusätzlich zu den Stationen N 06 und B 12 unterschied sich Station G 08 von der Ostseestation B 01 (p<0.001).



Abb. 26: Cd-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 179 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=25).



Abb. 27: Cd-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 185 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=25).

Abb. 27 zeigt die Cd-Gehalte von Klieschenlebern der Ausfahrt WH 185. Die Cd-Gehalte der Klieschen lagen in einem Bereich von 135 μ g/kg (N 01) bis 446 μ g/kg (N 06). Klieschen der Station N 06 zeigten signifikant höhere Cd-Werte in den Lebern als Fische der anderen Stationen (p<0.001).



Abb. 28: Cd-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 191 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=25).

Die Untersuchungen zu Cd-Gehalten in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 191 ist in Abb. 28 dargestellt. Die Cd-Werte lagen für Klieschen der Ostseestationen bei 71 μ g/kg (B 12) bzw. 80 μ g/kg (B 01). Die Werte für Klieschen der Nordseestationen lagen in einem Bereich von 115 μ g/kg (N 01) und 161 μ g/kg (N 06). Eine Ausnahme bildeten Klieschen der Station G 08. Hier wurden mediane Gehalte von 483 μ g/kg festgestellt. Es ergab sich daher ein signifikanter Unterschied der Station G 08 zu allen anderen Stationen (p<0.001). Die Station N 06 unterschied sich zusätzlich von Station B 12.

Saisonale Unterschiede

Abb. 29 zeigt in der Übersicht die Ergebnisse der Cd-Bestimmungen in Klieschenlebern der Ausfahrten WH 179, 185 und 191. Klieschen der untersuchten Nordseestationen zeichneten sich allgemein durch höhere Cd-Gehalte im Vergleich zu Ostseeklieschen aus (p<0.001). Die Klieschen der Ostseestation B 01 zeigten bei Vergleich der Mediane der Winter-Ausfahrten (WH 179 und WH 191) keinen Unterschied. Für Station B 12 ergab sich eine signifikante

Differenz der Mediane von 25 µg/kg. Die Ermittlung jahreszeitlicher Unterschiede der Cd-Gehalte von Klieschen der Nordseestationen zeigt, daß für Station N 01 keine Unterschiede auftraten. Die Mediane der Cd-Werte (WH 179, 185, 191) zeigten an dieser Station mit 130, 135 und 115 µg/kg nur geringe, nicht signifikante Unterschiede. Für Klieschen der Stationen N 04 und N 06 ist ein höherer Cd-Wert im Frühsommer festzustellen (p<0.001). Eine Ausnahme in diesen jahreszeitlichen Gehaltsunterschieden bildeten Klieschen der Station G 08. Die medianen Gehalte im Winter (WH 191) waren die höchsten, die während des Untersuchungszeitraumes an dieser Station festgestellt worden sind.



Abb. 29: Jahreszeitlicher Vergleich der Cd-Gehalte in Klieschenlebern aller Ausfahrten (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=25 für jede Station und Ausfahrt).

5.3.2 MT-Gehalte

5.3.2.1 Stationsunterschiede





Abb. 30: MT-1-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 179 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10).

Abb. 30 stellt die Ergebnisse der MT-1-Bestimmung in Klieschen der Ausfahrt WH 179 dar. Die medianen Gehalte lagen zwischen 0.04 μ g/mg (B 01) und 0.2 μ g/mg (N 06). Signifikant höhere Gehalte konnten mit 0.49 μ g/mg bei Klieschen der Station G 08 festgestellt werden (p<0.001).

In Abb. 31 ist die Gehaltsbestimmung für MT-2 wiedergegeben. In der Ostsee konnten Werte um 2 µg/mg festgestellt werden, während in der Nordsee durchgängig höhere Werte zwischen 4.7 und 11.1 µg/mg auftraten. Signifikant höhere Werte ergaben sich für Klieschen der Station N 06 mit 11.1 µg/mg und der Station G 08 mit 8.3 g/mg im Vergleich zu den Stationen in der Ostsee (p<0.01). Wegen der großen Spannweite der MT-2-Werte für Station N 06 konnte kein signifikanter Unterschied zu den Klieschen der anderen Nordseestationen festgestellt werden.



Abb. 31: MT-2-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 179 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10).

Ausfahrt WH 185

Die Ergebnisse der Ausfahrt WH 185 im Frühsommer wurden nicht graphisch dargestellt. Eine Übersichtsdarstellung wird in Abb. 27 und Abb. 28 gegeben. Für MT-1 ergaben sich Gehalte von 0.03 μ g/mg (N 04) bis zu 0.15 μ g/mg (G 08). Klieschen der Stationen G 08 und N 04 unterscheiden sich signifikant (p<0.01). Die Bestimmung von MT-2 lieferte Werte von 1.0 μ g/mg (N 04), 1.9 μ g/mg (N 06), 2.1 μ g/mg (N 01) und 2.9 μ g/mg (G 08). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Ausfahrt WH 191

Abb. 32 gibt die Ergebnisse der MT-1-Bestimmung in Klieschen der Ausfahrt WH 191 wieder. Es ergaben sich Gehalte von 0.03 bzw. 0.05 μ g/mg für Klieschen der Ostseestationen. In der Nordsee lagen die Gehalte durchweg höher und reichen von 0.07 (N 04) bis zu 0.4 μ g/mg (G 08). Die Werte für Station G 08 unterscheiden sich signifikant von allen anderen Stationen in Nord- und Ostsee (p<0.01). Abb. 33 zeigt die Ergebnisse der MT-2-Untersuchungen für die Ausfahrt WH 191. Die medianen Gehalte der Klieschen der untersuchten Stationen lagen zwischen 0.42 μ g/mg (B 12) und 6.49 μ g/mg (G 08). In den Klieschen anderer Stationen konnten Werte von 0.77 (N 04), 1.35 (B 01), 2.47 (N 01) und 4.64 μ g/mg (N 06) festgestellt werden. Die Werte der Stationen N 06 und G 08 unterschieden sich signifikant von allen anderen Stationen N 06 und G 08



Abb. 32: MT-1-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 191 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10).



Abb. 33: MT-2-Gehalte in Klieschenlebern der Ausfahrt WH 191 (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10).

5.3.2.2 Saisonale Unterschiede



Abb. 34: Jahreszeitlicher Vergleich der MT-1-Gehalte in Klieschenlebern aller Ausfahrten (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10 für jede Station und Ausfahrt).

Abb. 34 und 35 zeigen die Ergebnisse der MT-1- bzw. MT-2-Bestimmung in Klieschenlebern der Ausfahrten WH 179, 185 und 191. Klieschen der untersuchten Ostseestationen zeichneten sich unabhängig von der Jahreszeit durch signifikant niedrigere MT-1 und MT-2-Werte im Vergleich zur Nordsee aus (p<0.001). Für die Klieschen der Ostsee ergaben sich bis auf einen signifikanten Unterschied der MT-2-Gehalte für Klieschen der Station B 12 keine Unterschiede.

Ein jahreszeitlicher Vergleich von MT-Werte der Klieschen der Nordseestationen zeigt tendenziell höhere Werte im Winter. Dies galt weniger für MT-1, für das sich signifikante Unterschiede nur beim Vergleich der Ausfahrten WH 179 und WH 185 für die Klieschen der Stationen N 04 und G 08 ergaben. Größere Unterschiede zeigten sich für MT-2. Es bestehen für alle Stationen Unterschiede zwischen der Winterausfahrt WH 179 und der Frühsommerausfahrt WH 185 (p<0.01). Die Unterschiede zwischen den Ausfahrten WH 185 und WH 191 waren nicht signifikant. Der Vergleich der Winterausfahrten (WH 179 und 191) zeigte signifikant niedrigere Werte für Klieschen der Stationen N 01, N 04 und N 06 während der Probennahme WH 191.



Abb. 35: Jahreszeitlicher Vergleich der MT-2-Gehalte in Klieschenlebern aller Ausfahrten (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bzw. 75 %) sowie dem Range; n=10 für jede Station und Ausfahrt).

5.3.3 Korrelationen einzelner Parameter

Tab. 6 gibt die Signifikanzniveaus der Korrelationen von MT- und Cd- bzw. Zn-Werten sowie den Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten wieder. Für die statistischen Untersuchungen wurden die Daten nicht stations- sondern nur getrennt nach Ausfahrten betrachtet. Eine Korrelation auf Stationsniveau konnte wegen der geringen Anzahl der Daten (n=10) nicht festgestellt werden.

		WH 179		WH 185		WH 191	
Schwermetall		MT-1	MT-2	MT-1	MT-2	MT-1	MT-2
Cadmium	р	<0.05	<0.001	n.s.	n.s.	<0.01	<0.001
	r	0.317	0.437	-	-	0.342	0.423
Zink	р	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01	<0.01
	r	0.565	0.477	0.444	0.506	0.357	0.371

Tab. 6: Korrelationen der MT-Gehalte mit den Cd- und Zn-Gehalten (Spearman-Ra	ngkorrelation); p:
Signifikanzniveau; r: Korrelationskoeffizient; n.s.: nicht signifikant.	

Es konnte in allen Fällen eine signifikante Korrelation der Zn-Gehalte sowohl mit MT-1 als auch mit MT-2 festgestellt werden. Als Beispiel sei an dieser Stelle Abb. 36 aufgeführt, in der der Zusammenhang zwischen MT-1- und Zn-Werten (Ausfahrt WH 179) graphisch dargestellt ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall r=0.565 auf einem Signifikanzniveau von p<0.001.



Abb. 36: Streudiagramm mit Trendlinie (MT-1-Gehalte und Zn-Gehalte; WH 179).



Abb. 37: Streudiagramm mit Trendlinie (MT-2-Gehalte und Cd-Gehalte; WH 179).

Ein Korrelation zwischen Cd- und MT-Gehalten konnte bei allen Winterausfahrten (WH 179 und WH 191) festgestellt werden. Abb. 37 zeigt beispielhaft den Zusammenhang zwischen MT-2- und Cd-Werten (Ausfaht WH 179). Der Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall 0.437 (p<0.001).

Neben MT- und Schwermetallgehalten wurden im Rahmen der Probenahme noch die Parameter Wassertemperatur, Salinität, GSI, Lipidgehalt, Alter (nur bei WH 191) und Länge bestimmt. Auszugsweise werden hier die wichtigsten Ergebnisse einer Korrelationsanalyse der Probenahme WH 191 wiedergegeben (Tab. 7). Es zeigten sich Korrelationen von MT-Gehalten und der Temperatur (p<0.001). Ferner wurde ein Zusammenhang von Zn-Gehalt und Temperatur bzw. GSI deutlich (p<0.001). Eine vollständige Darstellung aller Korrelationen der bestimmten Parameter ist im Anhang aufgeführt (8.5; 8.6; 8.7).

Tab. 7: Korrelationen	ausgewählter Para	meter der Prob	enahme WH	191 (Spearman-I	Rangkorrelation).
p: Signifikanzniveau;	r: Korrelationskoef	fizient			

Variablenpaar	r _s	Р
MT-1-Gehalte – Temperatur	0.590	<0.001
MT-2-Gehalte – Temperatur	0.663	<0.001
Zn-Gehalte – Temperatur	0.499	<0.001
Zn-Gehalte – GSI	0.488	<0.001

5.4 Jahresgang

Die Ergebnisse der saisonalen Untersuchungen an Klieschen der Station N 01 im Zeitraum von 12 Monaten sind im Anhang unter 8.8 aufgeführt. Im Monat Juni konnten keine Proben genommen werden. Für die Lipidbestimmung stand nicht immer genügend Material zur Verfügung, so daß für einige Monate keine Daten zum Lipidgehalt vorhanden sind.

5.4.1 Abiotische Faktoren

Die saisonale Entwicklung der Wassertemperatur ist in Abb. 38 a dargestellt. Die niedrigsten Werte wurden im Winter mit 5 °C erreicht. Maximale Wassertemperaturen konnten im Spätsommer (August, September) mit etwa 17 °C festgestellt werden. Die Darstellung der monatlichen Veränderung der Wassertemperatur ist in Abb. 38 b dargestellt. Die stärkste Zunahme der Wassertemperatur war in den Monaten Juli und August zu beobachten. Die stärkste Abkühlung erfolgte mit etwa derselben Rate in den Monaten Oktober, November und Dezember.



Abb. 38: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): a) Wassertemperatur in 30 m Tiefe, b) Monatliche Veränderung der Temperatur (Temperaturdifferenz).

5.4.2 Lipidgehalt

Der Monat August wird nur durch eine Probe repräsentiert und wurde bei statistischen Berechnungen nicht miterfaßt. Minimale Lipidgehalte von etwa 7 % wurden im Frühjahr (März und Mai) erreicht (Abb. 39). Innerhalb von zwei Monaten nahmen die Lipidgehalte auf 32 % zu. Nach einem Maximums in den Monaten September (36 %) nahmen die Gehalte bis zu einem Wert von 11 % im Januar hin ab. Die Lipidgehalte in den Monaten Juli bis November unterschieden sich signifikant von den Lipidgehalten in den übrigen Monaten.



Abb. 39: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): Lipidgehalt in Klieschenlebern (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range).

5.4.3 Schwermetallgehalte

5.4.3.1 Zn-Gehalte

Die saisonale Entwicklung der Zn-Gehalte in den Klieschenlebern ist in Abb. 40 dargestellt. Die geringsten Zn-Gehalte konnten im April mit 20.8 mg/kg festgestellt werden. Zum Juli hin erfolgte ein signifikanter Anstieg der Zn-Gehalte auf 30.2 mg/kg (Median) im Vergleich zum April. Die Werte fielen im September auf 26.3 mg/kg, um im Oktober signifikant auf 39.1 mg/kg anzusteigen. Das Maximum der Zn-Gehalte wurde im Dezember mit 45.6 mg/kg erreicht. Bis zum Januar blieben die Zn-Gehalte auf diesem Niveau.



Abb. 40: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): Zn-Gehalte in Klieschenlebern (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range).



5.4.3.2 Cd-Gehalte

Abb. 41: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): Cd-Gehalte in Klieschenlebern (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range).

Die Ergebnisse der saisonalen Untersuchung der Cd-Gehalte ist in Abb. 41 dargestellt. Es zeigte sich keine deutliche saisonale Entwicklung der Cd-Gehalte. Die statistische Analyse zeigte keine Unterschiede. Die niedrigsten Gehalte konnten bei Beprobung im Oktober mit 70.7 µg/kg festgestellt werden. Die höchsten Gehalte wurden für Klieschen der Beprobung im Monat Dezember nachgewiesen (132.8 µg/kg).

5.4.4 MT-Gehalte

5.4.4.1 MT-1-Gehalte

Die Bestimmung des Isoforms MT-1 in Klieschen im saisonalen Vergleich ist in Abb. 42 dargestellt. Es war eine Tendenz zu höheren Werten in Klieschen der Beprobungsmonate August und September zu erkennen. Es wurden Gehalte von 0.51 µg/mg im September erreicht. Diese Tendenz erwies sich als nicht signifikant. Die niedrigsten Gehalte wurden in Klieschen im Monat Mai mit 0.14 µg/mg festgestellt.



Abb. 42: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): MT-1-Gehalte in Klieschenlebern (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range).

5.4.4.2 MT-2-Gehalte

Abb. 43 zeigt die saisonale Untersuchung der MT-2-Gehalte in Klieschen. Die höchsten Gehalte wurden in Klieschen der Novemberprobenahme mit 6.38 µg/mg festgestellt. Die niedrigsten Gehalte ergaben sich im März mit Gehalten von 1.24 µg/mg. Saisonal betrachtet ergab sich nach niedrigen Gehalten in den Monaten März bis Mai ein signifikanter Anstieg der MT-2-Gehalte auf 4.27 µg/mg im Juli. Die Werte nahmen zum September leicht auf 3.58 µg/mg ab, um Maximalgehalte im November zu erreichen. Zum Januar erfolgte eine Abnahme der Werte auf 3.67µg/mg. Insgesamt bestand ein signifikanter Unterschied der MT-2-Gehalte der Klieschen in den Monaten März, April und Mai von den Werten der Klieschen in den Monaten März, April und Mai von den Werten der Klieschen in den Monaten und Dezember.



Abb. 43: Jahresgang (Februar 1998 bis Januar 1999): MT-2-Gehalte in Klieschenlebern (Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil (25 bis 75 %) sowie dem Range).
5.4.5 Korrelationen einzelner Parameter

Eine statistische Analyse der Daten unter Anwendung der Spearman-Rangkorrelation ergibt Zusammenhänge zwischen den in Tab. 8 aufgeführten Parametern.

Tab. 8: Korrelationen ausgewählter Parameter des Jahresganges (Spearman-Rangkorrelation). p: Signifikanzniveau; r: Korrelationskoeffizient

Variablenpaar	r _s	Р
MT-1-Gehalte – Temperatur	0.273	<0.01
MT-1-Gehalte – Lipidgehalte	0.357	<0.01
MT-2-Gehalte – Temperatur	0.359	<0.001
MT-2-Gehalte – Temperaturdiff. (abs.)	0.504	<0.001
MT-2-Gehalte – Lipidgehalte	0.507	<0.001
MT-2-Gehalte – Zn-Gehalte	0.684	<0.001
Zn-Gehalte – Temperaturdifferenz	-0.596	<0.001
Temperatur – Lipidgehalt	0.762	<0.001

Der Parameter Temperaturdiff. (abs.) stellt die Beträge der Temperaturdifferenz dar. In den Abb. 44 bis 46 sind ausgewählte Streudiagramme zur Veranschaulichung der Korrelationen dargestellt. Dabei wurden zur besseren Übersicht Trendkurven angegeben. Eine vollständige Übersicht zu den Korrelationen der Parameter des Jahresganges wird im Anhang im Kapitel 8.8 gegeben.



Abb. 44: Streudiagramm (Lipidgehalt und Temperatur; Jahresgang).



Abb. 45: Streudiagramm (Zn-Gehalte und Temperaturdifferenz; Jahresgang).



Abb. 46: Streudiagramm (MT-2-Gehalte und Zn-Gehalte; Jahresgang).

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den möglichen Einflußfaktoren einer Induktion von MT-Isoformen in Klieschen. Vor dem Hintergrund der möglichen Eignung der MT-Isoformen als Biomarker einer Schwermetallexposition muß überprüft werden, inwiefern eine Induktion durch das Schwermetall Cd durch natürliche Faktoren, wie z.B. Temperatur- und Salzgehaltsänderungen bzw. Laichstatus, beeinflußt wird. Die wichtigen Faktoren und ihre möglichen Beziehung zueinander sind in Abb. 47 dargestellt.



Abb. 47: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen der Einflußfaktoren einer MT-Induktion

Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge kann die MT-Induktion nur sinnvoll als Schwermetallindikator verwendet werden, wenn der Einfluß der natürlichen Rahmenparameter hinreichend bekannt ist oder zumindest abgeschätzt werden kann.

Die nachfolgende Diskussion gliedert sich in drei Teile. Im ersten Teil wird die Induktion der MT-Isoformen durch Cd ausgeführt, während im zweiten Teil die Zusammenhänge der endogenen bzw. exogenen Faktoren erläutert werden. Im dritten Teil wird eine Gewichtung der erhaltenen Ergebnisse vorgenommen, die MT-Isoformen als potentielle Biomarker bewertet und Empfehlungen für ein Monitoring ausgesprochen.

6.1 Einfluß von Cadmium

Die Untersuchung der Induktion von MT-Isoformen unter kontrollierten Bedingungen erfolgte im Experiment Cd. Die intraperitoneal verabreichten Cd-Mengen wurden so gewählt, daß ein weiter Konzentrationsbereich abgedeckt wurde und somit eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion verfolgt werden konnte. Die parallele Untersuchung der Cd-Gehalte in der Leber gaben die tatsächlich aufgenommenen Mengen wieder, ließen aber keine Rückschlüsse über die tatsächliche Verfügbarkeit und Toxizität des Cd in der Leber zu (LUOMA, 1995). Es zeigten sich im Vergleich zu mitgeführten Kontrollfischen Zunahmen der Cd-Gehalte in der Expositionsgruppe mit niedrigster Cd-Exposition (10 µg-Versuchsgruppe) um etwa 200 µg/kg auf 250 µg/kg. Diese Gehalte entsprachen den Werten, die in Klieschen der Nordsee gemessen werden konnten (vgl. 5.1.1.2). Diese Zunahme der Cd-Gehalte bewirkte keine Induktion der MT innerhalb der Versuchsdauer von 10 Tagen.

Eine Induktion des Isoforms MT-2 konnte erst bei Cd-Gehalten in der Leber von 3950 µg/kg (100 µg-Versuchsgruppe) nach 10 Tagen nachgewiesen werden. Dabei konnte eine 3-fache Zunahme der MT-2-Gehalte am 10. Versuchstag im Vergleich zur Kontrollgruppe K (1.5 µg/mg) festgestellt werden. Damit waren im Tierversuch etwa 40 bis 80-fach erhöhte Cd-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe notwendig, um eine Induktion zu bewirken. Für die 1 mg-Versuchsgruppe war am 10. Versuchstag im Vergleich zur Kontrollgruppe K eine 3.5-fache Zunahme festgestellt worden. GEORGE (1989) stellte bei ähnlichen applizierten Cd-Dosen in Schollen eine Zunahme der Induktion von MT (ohne Isoformentrennung) um den Faktor 5 fest.

Eine Induktion von MT-1 erfolgte erst bei Cd-Gehalten in der Leber von 10000 µg/kg am 10. Versuchstag. Diese Konzentration entsprach 100 bis 200-fach erhöhten Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe und wurde im Rahmen der Freilanduntersuchungen unter keinen Umständen erreicht. Damit konnten die Ergebnisse von KAMMANN (1995) bestätigt werden, die eine Induktion des Isoforms MT-1 erst bei Applikationsdosen von 0.5 mg/kg und 1.5 mg/kg zeigten. Beim Vergleich dieser beiden Dosen zeigte sich, daß die Applikation von 1.5 mg/kg eine Induktion des MT-1 bewirkte, durch die annähernd die Gehalte von MT-2 erreicht wurden. In den eigenen Untersuchungen konnte eine Induktion von MT-1 in vergleichbarem Maße nur in Ausnahmefällen (vgl. Abb. 10) festgestellt werden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis kann nicht gegeben werden. Ein isoformenspezifischer Zusammenhang zur Expositionsdosis hat aber keine praktische Bedeutung, da die Cd-Gehalte in der Leber die natürlicherweise in der Nordsee angetroffenen Werte um ein Vielfaches überstiegen.

Trotz einer positiven Korrelation der MT- und Cd-Werte bestand kein linearer Zusammenhang zwischen MT-Gehalten und Cd-Gehalten in der Leber. Offensichtlich erfolgte die Induktion im Tierversuch nur oberhalb einer kritischen Cd-Konzentration und stieg dann nicht linear mit der Cd-Konzentration in der Leber an. Die Tatsache, daß bei Cd-Konzentrationen oberhalb von 40000 µg/kg letale Ausfälle auftraten, belegt, daß die MT-Induktion im Tierversuch nur in einem relativ eng begrenzten aber absolut gesehen hohem Konzentrationsbereich von 3950 bis 40000 µg Cd/kg eintrat. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von HAMILTON et al. (1987), wonach eine MT-Induktion erst bei Cd-Konzentration feststellbar war, die bereits bei 20 % der Versuchsfische (*Salvelinus fontinalis*) zum Tod führte.

Vergleicht man die höchsten im Tierversuch erreichten MT-2-Gehalte (8.3 µg/mg) mit Ergebnissen der Freilanduntersuchungen von Klieschen in Nord- und Ostsee (maximal 27.1 µg/mg; WH 179; Station G 08; vgl. Anhang 8.5), so wird deutlich, daß im Tierversuch offensichtlich nicht vergleichbare Bedingungen zum Freiland vorlagen. Die Gründe für diese Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

Die Expositionsdosis hat nachweislich einen Einfluß auf die Induktion bzw. Hemmung der Induktion. So beobachtete GEORGE (1989) bei Schollen eine verminderte MT-Induktion nach intraperitonealer Injektion von 1 mg Cd/kg Körpergewicht im Vergleich zur 500 µg/kg-Behandlungsgruppe. Man kann vermuten, daß Cd mit Erreichen einer Grenzkonzentration toxische Effekte zeigt, die die Proteinbiosynthese insgesamt hemmen. Diese Vermutung wurde durch Ergebnisse von Untersuchungen belegt, in denen gezeigt werden konnte, daß Cd in applizierten Konzentrationen von 2 mg/kg die RNA-Transkription hemmte (FAABORG POVLSEN et al., 1990). Die im Tierversuch festgestellten höchsten Gehalte an Cd in der Leber betrugen im Median 48000 µg/kg (Gabe von 5 mg Cd/kg Körpergewicht) und führten bei längerer Hälterung (mehr als 5 Tage) zum Tod der Versuchsfische. PIECHOTTA et al. (1999) stellten nach intraperitonealer Cd-Injektion bei Cd-Konzentrationen in der Leber von Klieschen Gehalte von etwa 10000 µg/kg am 10. Versuchstag fest. Es konnte beobachtet werden, daß verstärkt nekrotische Prozesse auftraten. Nekrose kann als Hinweis für eine irreversible Schädigung der Leber angesehen werden.

Eine verringerte MT-Induktion Cd-Exposition (intraperitoneal) in nach wurden Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss) bei gleichzeitiger Applikation des Steroidhormons 17ß-Estradiol erzielt (OLSSON et al., 1995). 17ß-Estradiol steuert die Vitellogenese bei Fischen und wird in hohen Konzentrationen bis zum Laichen produziert (MOMMSEN und WALSH, 1988). Der Tierversuch in der vorliegenden Untersuchung begann Anfang Februar zur Laichzeit der Klieschen in der südlichen Nordsee (SABOROWSKI, 1996). 17ß-Estradiol setzt bei gleichzeitiger Cd-Gabe nicht nur die MT-Induktion herab, sondern bewirkt auch eine erhöhte Toxizität des Cd (OLSSON et al., 1995). Diese Tatsache könnte zusätzlich zu den bereits angestellten Betrachtungen die hohen Ausfälle in der Behandlungsgruppe mit der höchsten Cd-Exposition (5 mg) erklären.

Eine weitere Erklärung für die geringe oder ausbleibende Induktion könnte nach dem Modell von ROESIJADI (1996) in der primären Induktion von MT durch Zn begründet liegen. Es wurde postuliert, daß Cd scheinbar induzierend wirkt, indem es Zn von bestimmten Liganden verdrängt (vgl. Abb.5) und freigesetztes Zn eine Induktion bewirkt. Vergleicht man die natürlicherweise in Klieschenlebern nachgewiesenen Zn-Gehalte (25 – 50 mg/kg entsprechend 0.4 – 0.8 mol/kg; vgl. 8.5, 8.6 und 8.7) mit den Cd-Gehalten der Klieschenlebern der hohen Expositionsgruppen (1 mg- und 5 mg-Gruppe, 10 – 48 mg/kg entsprechend 0.1 – 0.4 mol/kg; vgl. 8.3) des Tierversuches Cd, so fällt auf, daß die Zn-Gehalte der Klieschen der Freilandprobenahme nicht erreicht wurden. Es besteht somit die Vermutung, daß Cd in der Leber Zn zwar von bestimmten Liganden und MT verdrängt, die freigesetzte Menge an Zn aber für eine Induktion nicht ausreichend ist oder aufgrund der hohen Streuungen der Einzelwerte in Verbindung mit der geringen Anzahl an Proben in einer Versuchsgruppe nicht signifikant ist. Weitere Diskussionspunkte zum Themenkomplex Zn werden unter 6.2 präsentiert.

Ein weiterer Erklärungsgrund liegt in der Applikationsform des Cd. Die intraperitoneale Injektion stellt nicht den natürlichen Aufnahmeweg über Wasser und Nahrung dar (HOGSTRAND und HAUX, 1991). Darüber hinaus besteht ein Unterschied im Akkumulationsverhalten von Cd in Abhängigkeit vom Applikationsweg (Wasser oder intraperitoneal). KAY et al. (1986) konnten nachweisen, daß Regenbogenforellen, die in Cdhaltigem Wasser exponiert wurden, Cd hauptsächlich in Kiemen und Nieren speichern. Eine Akkumulation in der Leber trat nur nach längerer Expositionsdauer auf. Entsprechende Untersuchungen zur Aufnahme von Cd über die Nahrung liegen nicht vor. Als Hinweis sei angemerkt, daß das essentielle Spurenelementes Zn zu 90 % über die Nahrung aufgenommen wird, während lediglich 10 % des Zn über das Wasser aufgenommen werden (zitiert bei OVERNELL et al., 1988). Eine Speicherung von Cd in der Leber innerhalb weniger Tage konnte nur nach intraperitonealer Injektion festgestellt werden. Es ist somit damit zu rechnen, daß unterschiedliche Aufnahmemechanismen je nach Applikationsform vorliegen. Es ist daher möglich, daß die isolierte Betrachtung der Cd-Aufnahme und der damit **MT-Induktion** verbundenen in der Leber ohne Berücksichtigung der Aufnahmegeschwindigkeit bzw. des Aufnahmeweges zur Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann. Für die eigenen Ergebnisse kann damit gefolgert werden, daß Cd MT induziert, die konzentrations- und zeitabhängige Betrachtung der Induktion aber nicht mit den Freilanddaten verglichen werden sollte.

Vor diesem Hintergrund war die Bestimmung von MT-Isoformen und Cd-Gehalten in Klieschen des Freilandes interessant. Die Messung der Cd-Gehalte in Klieschen der Stationen in Nord- und Ostsee zeigte deutliche Unterschiede in der Belastungssituation. Allgemein konnte festgestellt werden, daß Klieschen der Ostsee geringer belastet waren als Klieschen der Nordsee. Belastungsschwerpunkte in der Nordsee waren die Stationen N 06 und G 08.

Klieschen der Station N 06 (nordwestliche Nordsee vor Schottland) zeigten Gehalte von 446 µg/kg im Mai und 161 bis 310 µg/kg im Dezember bzw. Januar. Diese Befunde decken sich mit Untersuchungen von CLAUßEN (1990). Danach sind in dem Gebiet der Station N 06 Cd-Gehalte in den Klieschenlebern im Mai von 332 bis 419 µg/kg und 169 bis 312 µg/kg im Januar zu erwarten. Diese Beobachtungen beschränken sich nicht auf Klieschen. Die Cd-Gehalte des Einsiedlerkrebses (*Pagurus bernhardus*) in diesem Gebiet sind im Vergleich zur südlichen Nordsee ebenfalls erhöht (KARBE et al., 1989). Die 1985 durchgeführte Grundlagenstudie über die Schwermetallgehalte in Organismen der Küstengebiete zeigte, daß die Nordostküste Großbritanniens am Firth of Forth (N 06) als Belastungsschwerpunkt einzustufen ist (ICES, 1988).

Das Gebiet G 08 wurde bisher nur unzureichend untersucht. Erklärungsansätze für die z.T. sehr hohen Cd-Gehalte der Klieschenlebern (vgl. Ausfahrt WH 191; Median: 483 µg/kg) könnten in der räumliche Nähe zu einem der Haupteintragsquellen für Schadstoffe in diesem Gebiet sein, dem Seine-Estuar (COSSA et al., 1992). Da die Strömung im Englischen Kanal immer in Richtung Nordsee gerichtet ist (SÜNDERMANN und DEGENS, 1989), wäre eine Kontamination des Gebietes G 08 erklärbar (vgl. Kapitel 3.3.1; Abb. 6).

Weitere Gründe für unterschiedliche Cd-Gehalte in Organismen und Kompartimenten der Nordsee sollen im Folgenden dargestellt werden.

Einen entscheidenden Einfluß auf die Schadstoffbelastung eines Gebietes hat der Wasseraustausch. Dieser gibt den Zeitraum an, der erforderlich ist, die Wassersäule eines Gebietes in der Nordsee vollständig auszutauschen. Untersuchungen zum Strömungsfeld in der Nordsee haben gezeigt, daß im Gebiet von N 06 eine Wirbelbildung auftritt, die den Austausch verzögert (SÜNDERMANN und DEGENS, 1989). MEIER-REIMER (1979) konnte die Austauschzeit in diesem Gebiet mit 36 bis 42 Monaten bestimmen. Zum Vergleich sei angemerkt, daß die Austauschzeit in der zentralen Nordsee 18-24 Monate beträgt.

Die Verfügbarkeit des Cd aus dem Wasser, d.h. die Verteilung zwischen partikulärgebundenem und gelöstem Cd ist von entscheidendem Einfluß. Beeinflußt werden diese Meßgrößen vom Salzgehalt und dem Anteil an Schwebstoffen, die Cd binden. Bei steigendem Salzgehalt verringert Cd seine Affinität zu den Schwebstoffpartikeln und geht in Lösung (STOEPPLER, 1984). Einen weiteren Aspekt stellt in diesem Zusammenhang die Fähigkeit von Schwebstoffen z.B. Plankton dar, in geringen Konzentrationen Schwermetalle vollständig zu binden. Es ist so bei geringen volumenbezogenen Cd-Konzentrationen z.B. in küstenfernen Regionen möglich, daß die Schwebstoffe geringer Partikelgröße hohe Cd-Beladungen aufweisen (RICK et al., 1990). Diese gegenläufigen Zusammenhänge haben weitreichende Auswirkungen auf die Cd-Konzentrationen vieler Organismen, je nachdem ob die Organismen zur Nahrungsaufnahme oder Kiemenatmung große Mengen Wasser mit Schwebstoffen umsetzen oder mit Sedimenten in Kontakt kommen, die die abgelagerte Form der Schwebstoffe darstellen. Ein möglicher Einfluß der Nahrung der Kliesche auf die Cd-Gehalte in der Leber ist demnach vorstellbar. Nach SABOROWSKI (1996) stellten die Ophiuroiden (Schlangensterne) mit 50 % die Hauptnahrung der Kliesche im Gebiet der Station N 01 dar. Geringere Anteile wiesen Polychaeten mit 13 % auf, während Mollusken und Crustaceen mit weniger als 5 % vertreten waren. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte KNUST (1990) für Klieschen der Anderen Stationen liegen nicht vor. Eine Verschiebung des Nahrungsspektrums wäre aber vorstellbar und könnte unterschiedliche Cd-Gehalte in den Lebern der Klieschen der anderen Stationen liegen nicht vor. Eine Verschiebung

Die z.T. signifikanten jahreszeitlichen Unterschiede der Cd-Gehalte der Klieschen einer Station könnten auf den ausgeprägten Jahresgang des Lipidgehaltes der Klieschen zurückgeführt werden. Vergleicht man die Abnahmen des Lipidgehaltes der Klieschen einzelner Stationen (Ausfahrten WH 179 im Dezember und WH 185 im Mai), so erhält man prozentuale Abnahmen der Gehalte von 32 % (G 08) bis zu 82 % (N 06). Die prozentuale Zunahme der Cd-Gehalte der Klieschen dieser Stationen beträgt 65 % (G 08) bzw. 44 % (N 06). Eine Verlagerung der Lipide während des Gonadenaufbaus in die Ovarien geht mit einer scheinbaren "Konzentrierung" des Cd einher, da dieses nach jetzigem Wissensstand nicht verlagert wird. Ein weiterer Erklärungsansatz stellt die vermehrte Freßaktivität der Klieschen im Mai dar (SABOROWSKI, 1996), wodurch über die Nahrung Cd aufgenommen wird.

Die Bestimmung von MT-Isoformen in marinen Organismen wurde in der beschriebenen Weise noch nicht durchgeführt. Bisher erfolgte eine Bestimmung der Isoformen als Summe und beschränkte sich auf Fische eng umgrenzter Meeresgebiete (HYLLAND et al., 1998; OVERNELL und ABDULLAH, 1988; Fisch: Flunder, *Platichthys flesus*) oder Estuare (SULAIMAN et al., 1991; Fisch: Flunder). Lediglich die Untersuchungen von STAGG et al. (1992) und HYLLAND et al. (1992) fanden an Klieschen eines Transektes von der Elbemündung zur Doggerbank (vergleichbar mit Station N 04) hin statt, wobei die Untersuchungen von STAGG et al. an Kiemen von Klieschen durchgeführt worden sind und somit schwer mit den eigenen Daten verglichen werden konnten. Die Untersuchungen von HYLLAND et al. (1992) sind demnach als einzige mit den eigenen Untersuchungen vergleichbar. Der Bezug der MT-Gehalte erfolgte jedoch nicht auf den Proteingehalt, sondern

auf das Leberfrischgewicht. Die Messungen wurden im März vorgenommen und ergaben MT-Gehalte zwischen 200 und 300 µg/g. Dabei wiesen Klieschen auf der Doggerbank Gehalte um 200 µg/g auf. Für die eigenen Untersuchungen wurden die MT-Ergebnisse auf den Proteingehalt bezogen, können aber auf das Frischgewicht zurückberechnet werden. Es ergeben sich unter Berücksichtigung des Bezugs zum Frischgewicht mediane MT-2-Gehalte der Klieschen der Stationen N 01 und N 04 von 106 bzw. 108 µg/g. Diese Werte stammen von der Ausfahrt WH 179 im Januar. Damit sind die MT-2-Werte der eigenen Untersuchung um den Faktor 2 niedriger als die Werte von HYLLAND et al. (1992). Ein möglicher Grund für die abweichenden Werte könnte in den starken saisonalen Schwankungen der MT-Werte liegen. Bei Vergleich der MT-2-Werte für Klieschen der Station N 01 bei den Probenahmen im Winter (WH 179 und WH 191), zeigten sich mediane Gehalte von 4.73 µg/mg (WH 179) bzw. 2.45 µg/mg (WH 191). Auch hier beträgt der Unterschied etwa 50 %, so daß vermutet werden kann, daß saisonale Unterschiede (z.B. Wassertemperatur) eine Ursache der beobachteten Unterschiede sein können. Die genauen Implikationen hinsichtlich der jahreszeitlichen Entwicklung der MT-Werte werden an späterer Stelle ausgeführt.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte eine Probenahme in Nord- und Ostsee an Stationen mit stark differierenden Schwermetallbelastungen. Die niedrigsten Cd-Gehalte in Klieschen konnten in der Ostsee und die höchsten vor Schottland (N 06) und im Englischen Kanal (G 08) festgestellt werden. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der MT-Analytik ergab positive Korrelationen zwischen Cd- und MT-Gehalten während der Probenahmen im Winter (WH 179 und WH 191). Dabei konnten in beiden Fällen vergleichbare Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen für MT-1 bzw. MT-2 und Cd festgestellt werden. Unterschiedliche Induktions- und Bindungseigenschaften von MT-1 und MT-2 im Hinblick auf Cd konnten sowohl von KUROSHIMA (1995) als auch von OLSSON und HAUX (1985) nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß in Meerbrassen (Pagrus major) durch Cd das Isoform MT-2 induziert wird, während Zn beide Isoformen in gleicher Menge induziert (KUROSHIMA, 1995). OLSSON und HAUX (1985) zeigten, daß in Regenbogenforellen nach Cd-Induktion das Isoform MT-2 mehr Cu und Zn bindet als MT-1, welches mehr Cd bindet. Ein Hauptproblem der Induktionsexperimente in diesen Untersuchungen ist wie im bereits beschriebenen Tierversuch Cd die Applikationsform und -dosis. In Brassen (Abramis brama) der Elbe bindet nur das in geringerer Menge vorliegende Isoform Zn und Hg, während das mengenmäßig überwiegende Isoform ausschließlich Zn bindet (KAMMANN et al., 1997). Diese Untersuchung gibt als einzige einen Hinweis auf Unterschiede in der Metallbindung der Isoformen von Organismen unter natürlichen Belastungssituationen. Da jedoch die Elbe ein anthropogen hoch belastetes Gebiet darstellt und Hg hauptsächlich in Form von Methyl-Hg aufgenommen wird (LANGSTON und SPENCE, 1995), ist ein Vergleich zu Klieschen der Nordsee nur unter Vorbehalt möglich. Darüberhinaus beträgt der gebundene Anteil Hg im

Vergleich zum Zn-Anteil (in mol) lediglich 1 %. Eigene Untersuchungen während der Methodenentwicklung zeigten keine Unterschiede in den Metallbindungseigenschaften, die nicht auf zufällige Abweichungen zurückzuführen wären. Eine Ausnahme bilden die MT-1-Werte von Klieschen der Station G 08. Diese Werte sind im Vergleich zu denen der Klieschen der anderen Stationen deutlich höher. Ebenso bemerkenswert sind die geringen jahreszeitlichen Schwankungen der Werte beim Vergleich von Winter und Frühsommer. Es wird vermutet, daß physiologische Prozesse eine Rolle spielen, die im Kapitel 6.2 genauer ausgeführt werden.

Für die Korrelationsanalyse wurden Daten aller Stationen herangezogen. Eine Analyse der Daten einer Station ist aufgrund der geringen Datenmenge (n=10) nicht sinnvoll. Es gilt zu klären, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen MT-Werten und Cd-Gehalten auf einer Induktion beruht oder ob z.B. Unterschiede im Laichstatus der Klieschen oder unterschiedliche Wassertemperaturen der weit voneinander entfernten Stationen der Grund für eine in diesem Fall scheinbare Korrelation sind. Die Untersuchungen zur Induktion konnten eindeutig beantwortet werden, da eine Nachstellung der natürlichen Situation unmöglich ist. Im folgenden Kapitel 6.2 soll daher der Einfluß von natürlichen Parametern auf die MT-Induktion näher betrachtet werden.

6.2 Einfluß von abiotischen und biotischen Faktoren

Die Untersuchung des Einflusses von abiotischen und biotischen Faktoren auf die MT-Gehalte ist nur bedingt für jeden Faktor isoliert möglich. Viele der Faktoren sind eng miteinander verknüpft und beeinflussen einander. Im Folgenden wird trotzdem zunächst versucht, die Faktoren kurz isoliert voneinander zu diskutieren und im Anschluß die Untersuchungen des Jahresganges mit den möglichen Verknüpfungen darzustellen.

6.2.1 Zink – MT-Induktion

Metallothioneine stellen im Organismus eines der wichtigsten Zn-bindenden Proteine dar (KARIN, 1985). HOGSTRAND et al. (1991) konnten nachweisen, daß etwa 30 % des Zn im Cytosol an MT gebunden vorliegt. In der vorliegenden Untersuchung konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Es wurde festgestellt, daß die Zn-Gehalte in der Leber von Klieschen, abhängig von der Jahreszeit, Werte von 32 - 59 mg/kg aufwiesen. Bei voller Absättigung eines MT-Moleküls mit Zn beträgt der Zn-Anteil am Gewicht 6.5 %. Bei durchschnittlichen MT-Gehalten in Klieschenlebern von 100 bis 300 µg/g (bezogen auf das Frischgewicht) bindet der MT-Pool 6.5 bis 19.6 mg Zn/kg. Damit sind rechnerisch etwa 10 bis 61 % des cytosolischen Zn an MT gebunden. Bedingt durch die Bedeutung von Zn als essentielles Spurenelement (VALLEE und FALCHUK, 1993) ist eine Beteiligung dieses MT-

Pools an der homöostatischen Regelung der Zn-Gehalte wahrscheinlich. Belegt wird diese Annahme durch die Korrelation der Zn-Gehalte mit den MT-Isoformen-Gehalten in Klieschen der Freilandbeprobungen (WH 179, 185, 191, Jahresgang). Vergleichbare Korrelationen wurden bereits mehrfach von anderen Autoren für Fische bestätigt (GEORGE, 1989; HYLLAND et al., 1992). Es wird daher angenommen, daß die Zn-Gehalte der Leber einen entscheidenden Einfluß auf die MT-Induktion haben. Die Ergebnisse der beiden MT-Isoformen zeigten die höchsten MT-1-Gehalte bei Klieschen der Station G 08. Die Zn-Werte der Klieschen dieser Station waren ebenfalls gegenüber den anderen Stationen erhöht. Eine mögliche physiologische Bedeutung ist aber unwahrscheinlich, da die Gehalte im Vergleich zu MT-2 sehr gering sind. DALLINGER (1996) vermutet, daß es sich bei den Isoformen um Produkte von Genmutationen handelt und daß die Isoformen keine unterschiedlichen Aufgaben besitzen. Wahrscheinlicher sei eine zeit- und gewebeabhängige Expression. Weitere Diskussionspunkte werden unter 6.2.4 aufgeführt.

6.2.2 Temperatur – MT-Induktion

Einen weiteren Einflußfaktor auf die MT-Gehalte stellt die Temperatur bzw. die Änderung der Temperatur dar. Im Experiment ST konnte gezeigt werden, daß eine schnelle Temperaturänderung von 4 °C auf 9 °C nach 10 Tagen die Gehalte der MT-Isoformen um den Faktor 4 bis 13 ansteigen läßt. Vergleichbare Ergebnisse konnten CARPENE et al. (1992) bei der Induktion von MT durch Cd bei verschiedenen Temperaturen in Goldfischen feststellen. Der Vergleich der Induktion durch Cd bei 10 °C bzw. 20 °C zeigte eine stärkere Induktion bei der höheren Temperatur. Ein Einfluß der zeitlichen Komponente bei der Veränderung der Temperatur konnte von OLSSON et al. (1996) an Regenbogenforellen nachgewiesen werden. Eine Temperatursenkung von 15 °C auf 2 °C bewirkte eine Zunahme der MT-Werte von 50 nmol/g auf 120 nmol/g. Eine Stabilisierung der Wassertemperatur bei 2 °C zeigte eine leichte Abnahme der Werte auf etwa 100 nmol/g. Die Beobachtungen wurden an juvenilen d.h. nicht geschlechtsreifen Regenbogenforellen in einem See mit den natürlichen Temperaturschwankungen in einem Zeitraum von 8 Monaten festgestellt. Durch den Einsatz der juvenilen Fische konnten Einflüsse, die auf den Reproduktionszyklus zurückzuführen sind, ausgeschlossen werden. BENSON et al. (1990) konnten durch Erniedrigung der Temperatur von 20 °C auf 4 °C für 12 h keine MT-Induktion bei dem Fisch Lepomis macrochirus nachweisen. Diese Untersuchung hat wegen der hohen Temperaturdifferenz jedoch keinen Bezug zu natürlich vorkommenden Bedingungen.

Die positive Korrelation zwischen MT-Gehalten und der Wassertemperatur in Nord- und Ostsee konnte während der Probenahme WH 191 festgestellt werden. Diese Ergebnisse stellen einen Übergang zu den Ergebnissen des Jahresganges dar und werden in diesem Zusammenhang (vgl. 6.2.4) vorgestellt.

6.2.3 Salinität – MT-Induktion

Eine weitere natürliche Einflußgröße stellt der Salzgehalt bzw. die Veränderung des Gehaltes dar. Nach SABOROWSKI (1996) sind an der Station N 01 Schwankungen des Salzgehaltes des Wassers am Grund von 30 bis 34 ‰ zu erwarten. Diese Schwankungen ereignen sich sehr kurzfristig, so daß innerhalb eines Monats oder noch schneller die "normalen" Gehalte von etwa 33 ‰ wieder erreicht werden. In der vorliegenden Untersuchung konnten nach schneller Senkung des Salzgehaltes von 33 ‰ auf 25 ‰ Zunahmen der MT-Isoformengehalte um den Faktor 3 bis 10 am 10. Tag des Versuches festgestellt werden. Eine vergleichsweise geringe Zunahme der MT-Gehalte um den Faktor 0.5 konnten BAER und THOMAS (1990) nach Senkung der Salinität von 30 ‰ auf 5 ‰ bei Einsatz des Fisches *Sciaenops ocellatus* feststellen. Eine solch starke Absenkung der Salinität würden Klieschen als marine Organismen nicht überleben. Die Untersuchungen von CARPENE et al. (1992) an Goldfischen (*Carassius auratus*) zur Induktion durch Cd bei unterschiedlichen Salinitäten (5 ‰, 10 ‰ und 12.5 ‰) ergaben keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Autoren führten diese Ergebnisse auf die Anpassungsfähigkeit des Goldfisches gegenüber Salzwasser zurück.

Während der drei Probenahmen im Freiland (WH 179, 185 und 191) konnten an den einzelnen Stationen starke Unterschiede in den Salinitäten festgestellt werden. Der Bereich erstreckte sich von 16.3 (B 12) bis 35.1 ‰ (G 08). Da jedoch die Änderung der Salinitäten vor allem in der Ostsee augrund geringer Strömungen nur langsam vonstatten gehen, ist ein Einfluß auf die Induktion von MT nicht zu erwarten. In der Nordsee bestanden nur sehr geringe Unterschiede in den Salinitäten (33.0 bis 35.1 ‰). Eine Beeinflussung der MT-Induktion ist bei diesen geringen Schwankungen nicht zu erwarten. Somit kann gefolgert werden, daß die Schwankungen der Salinitäten in der Nord- und Ostsee keinen Einfluß auf die Induktion von MT haben.

6.2.4 Saisonale Einflüsse – MT-Induktion

Eine Untersuchung des Zusammenhangs der z.T. bereits einzeln vorgestellten Faktoren Temperatur, Zn und Laichstatus wurde im Jahresgang vorgenommen. Dabei wurde zusätzlich der Faktor Lipidgehalt untersucht. Aus den Ergebnissen des Jahresganges kann abgeleitet werden, inwieweit die Stationsunterschiede der MT-Gehalte bei den Freilandprobenahmen auf einen Schwermetalleinfluß oder auf rein physiologische Prozesse zurückzuführen sind. Folgende Einflüsse konnten im Jahresgang überprüft werden:

- Temperatureinfluß auf Zn- und MT-Gehalte
- GSI-Abhängigkeit der Zn- und MT-Gehalte
- Einfluß von Cd auf MT-Induktion
- Korrelation von Zn- und MT-Gehalten
- Unterschiedlicher Einfluß der Faktoren auf MT-Isoformen
- Gewichtung des Einflusses einzelner Faktoren

Die GSI-Daten konnten während der Untersuchung nicht erfaßt werden. Es war aber möglich, Rückschlüsse auf den GSI-Verlauf aus den Lipid- und Temperaturdaten zu ziehen. Dazu wurden die Untersuchungen von SABOROWSKI (1996) herangezogen. Bei vergleichbaren Entwicklungen der Temperatur und des Lipidgehaltes aus den eigenen Untersuchungen zeigt der GSI ab November ansteigende Werte mit einem Maximum im Februar (Abb. 48 a). Die anschließende Abnahme der Werte spiegelt die Laichzeit wider. Die Ruhephase mit minimalen GSI-Werten wird im Mai erreicht und dauert bis Oktober.

Die saisonalen Untersuchungen zum MT-1 belegen, daß im Jahresgang keine Veränderung der Gehalte stattfindet. Diese Ergebnisse haben sich bereits in den Freilanduntersuchungen (WH 179, 185, 191) angedeutet, da hier die Unterschiede zwischen Winter und Frühsommer für MT-1 ebenfalls nur gering oder nicht vorhanden waren. Die Ergebnisse des Hälterungsexperimentes ST in bezug auf MT-1 müssen vor diesem Hintergrund als Induktion unter außerordentlichen Bedingungen (Temperaturdifferenz von 5 °C innerhalb weniger Stunden) gesehen werden. Die physiologische Bedeutung des Isoforms MT-1 bleibt deshalb weitgehend ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der Vergleich der saisonalen Verläufe (vgl. Abb. 48 a und b) der übrigen Meßgrößen zeigt, daß die Induktion des MT-2-Isoforms nicht alleine durch die saisonale Veränderung der Zn-Gehalte, sondern mindestens durch einen zweiten Faktor bedingt wird. Die vermehrte Induktion des Isoforms MT-2 im Juli erfolgte nicht gleichzeitig mit einem Anstieg der Konzentration an Zn in der Leber, woraus möglicherweise geschlossen werden kann, daß die ansteigende Temperatur im Juni und Juli für die Induktion verantwortlich war. Diese Vermutung wird durch die eigenen Ergebnisse der Untersuchungen im Tierversuch ST belegt. Weitere Belege aus der Literatur wurden schon unter 6.2.2 aufgeführt.



Abb. 48: Saisonaler Verlauf: a) Wassertemperatur, Lipidgehalt und GSI (nach SABOROWSKI, 1996); b) MT-2- und Zn-Gehalte. Zur Darstellung: Temperatur (------); Fettgehalte (------); MT-2 (------); Zn (υ).

Es wurde ebenfalls schon belegt, daß auch fallende Wassertemperaturen im Herbst und Winter zu einer MT-Induktion führen können (OLSSON et al., 1996). Somit könnte auch im vorliegenden Fall mit einer Induktion in den Herbst- und Wintermonaten (entsprechend der stärksten Abkühlung) gerechnet werden. Dieser Einfluß würde wahrscheinlich durch erhöhte Zn-Werte in der Leber verbunden mit der Bildung der Ovarien überlagert werden. OLSSON et al. (1996) konnten durch Untersuchungen an juvenilen Regenbogenforellen zeigen, daß die Abnahme der Wassertemperatur im Herbst ebenfalls zu einer Erhöhung der Zn-Gehalte in der Leber führt. Diese Untersuchung fand von Juni bis November statt und ergab bei Abnahme der Wassertemperatur von September bis November einen Anstieg der Zn-Gehalte in den Lebern der Fische um 10 bzw. 13 mg/kg auf 33 mg/kg im Vergleich zum Juli

(20 mg/kg). Durch Verwendung der juvenilen Fische konnte eine Erhöhung der Zn-Gehalte in der Leber durch die Bildung der Ovarien ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung zwischen einer Induktion von MT-2 durch eine Veränderung der Wassertemperatur oder erhöhte Zn-Gehalte in der Leber aufgrund des Laichstatus wäre demnach nicht möglich. Die Temperatur-induzierte Bildung von MT-2 in den Monaten Juli und August scheint lediglich durch eine Umverlagerung des Zn in der Leber ohne Konzentrationsveränderung vonstatten zu gehen.

Das Maximum der MT-2-Induktion konnte wie in den Untersuchungen von GOKSØYR et al. (1996) im Herbst in Flundern bei steigenden Zn-Gehalten in der Leber nachgewiesen werden. Diese erhöhten Zn-Gehalte werden mit erhöhten Stoffwechselumsätzen zum Zwecke des Gonadenaufbaus in Zusammenhang gebracht (OLSSON, 1987). Während des Laichens der Klieschen in den Monaten Februar und März konnten in der vorliegenden Untersuchung die geringsten MT-2-Gehalte festgestellt werden. BAER und THOMAS (1990) konnten im Gegensatz dazu während der gesamten Zeit des Gonadenaufbaus und des Laichens 2 bis 3-fach erhöhte MT-Gehalte im Vergleich zur Ruhephase von Cynoscion nebulosus, einer marinen Forellenart, nachweisen. Die ausführlichsten Untersuchungen wurden von OLSSON et al. (1987) durchgeführt. In Regenbogenforellen wurden in Abhängigkeit vom Laichstatus Jahresgänge für Zn und MT bestimmt. Dabei fiel das Maximum der MT-Induktion mit dem Beginn des Laichens (Monat Januar) zusammen. Die Zn-Werte zeigten wie auch die MT-Gehalte ab September verbunden mit dem Gonadenaufbau steigende Werte. Das Maximum der Zn-Werte liegt einen Monat vor dem MT-Maximum im Dezember. Saisonale Untersuchung zur Entwicklung der Zn-Gehalte in Lebern von Pseudopleuronectes americanus zeigten maximale Werte zu Beginn des Gonadenaufbaus im August. Bis zum Erreichen des Laichens im darauffolgenden Juni konnte eine stetige Abnahme der Gehalte festgestellt werden (FLETCHER und KING, 1978).

Vor diesem Hintergrund soll der Versuch unternommen werden zu klären, ob die unterschiedlichen MT-Werte von Klieschen verschiedener Stationen und die Korrelation mit Cd im Winter während der Probenahme im Freiland auf einer Induktion durch Cd beruhen oder Zufall sind. Arbeitshypothese ist, daß eine Induktion durch Cd stattfindet. Gestützt wird diese These durch den Vergleich der jeweils höchsten MT-Werte für die Probenahmen WH 179 und WH 191. Hohe Cd-Werte für Klieschen der Station G 08 werden begleitet von hohen MT-Werten (WH 191). Ein Jahr zuvor (WH 179) waren die MT-Werte zwar insgesamt höher; die stärkste Induktion war hier jedoch -parallel zu den Cd-Werten- bei Klieschen der Station N 06 feststellbar. Die Ergebnisse des Jahresganges haben gezeigt, daß bei Probenahme im Dezember (WH 191) bzw. Januar (WH 179) die MT-Werte nach dem Maximum im November abnehmen. Ein Problem beim Vergleich der Daten ist die unterschiedliche

Wassertemperatur. Im Winter 1996/97 (WH 179) waren ungewöhnlich niedrige Temperaturen zu verzeichnen. Dadurch wurde die Entwicklung der Ovarien verzögert und somit möglicherweise das Maximum der MT-Werte in die Monate Dezember oder Januar verschoben. Dadurch wären die insgesamt höheren MT-Werte der Klieschen der Probenahme WH 179 erklärbar.

Die Stationen der Freilanduntersuchungen liegen räumlich weit voneinander entfernt, so daß eine "Verlagerung" der saisonalen Zyklen wahrscheinlich ist. Dabei kann durch den GSI gut der Reproduktionsstatus und damit der saisonale Verlauf wiedergegeben werden. Danach sind Klieschen der Station N 01 (WH 191) in ihrer Ovarienentwicklung mit einem GSI von 6.9 am weitesten fortgeschritten. Nimmt man diese Station als Bezug, wird deutlich, daß Klieschen der Stationen N 06 (GSI= 4.9) und G 08 (GSI=3.3) in ihrer Gonadenentwicklung zurückliegen und somit die theoretisch erwarteten höheren MT-Werte mit den beobachteten übereinstimmen. Bei Überprüfung dieser Theorie mittels Daten der Freilandprobenahme WH 179 zeigen sich ähnliche Tendenzen. Klieschen der Stationen N 06 und G 08. Folglich müßten auch hier theoretisch die MT-Gehalte der Klieschen der Stationen N 06 und G 08 do 8 höhere Werte aufweisen. Dieses kann durch die Daten der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden.

Bei Überprüfung dieser Theorie anhand der Daten der Ostseeklieschen wird deutlich, daß durch Vergleich des GSI die MT-Werte nicht erklärbar sind. Die niedrigen GSI-Werte deuten auf ein verschobenes Maximum des GSI von Februar nach März oder April hin. Damit wären, vergleichbar mit Klieschen der Stationen N 06 und G 08, hohe MT-Gehalte zu erwarten gewesen. Neben dem GSI sind für Ostseeklieschen auch Daten zu Zn-Gehalten vorhanden. Hier zeigt sich, daß im Winter 1997/98 (WH 191) Werte von 35 bzw. 37 mg/kg ermittelt werden konnten. Diese Gehalte wurden im Jahresgang in Klieschen der Monate September bzw. Oktober festgestellt. Bei Annahme der Vergleichbarkeit eines theoretischen Jahresganges, ermittelt in Ostseeklieschen, mit dem Jahresgang der Station N 01, befänden sich Klieschen der Stationen B 01 und B 12 somit am Beginn ihrer Gonadenentwicklung. Demnach wären niedrigere MT-Gehalte erklärbar.

Die Beschreibung dieses Problems macht deutlich, daß eine Induktion durch Cd im Freiland nicht von einer Induktion durch die Faktoren Laichstatus und Temperaturänderung abgegrenzt werden kann. Die Untersuchungen des Jahresganges haben gezeigt, daß die Faktoren Zn und Temperaturänderung einen weitaus größeren Einfluß auf die MT-Induktion haben als Cd.

6.3 Bewertung der MT als Biomarker

Die Bewertung von MT als Biomarker einer Schwermetallexposition erfordert die Beantwortung folgender Fragen.

- 1. Sind MT durch Schwermetalle induzierbar und besteht eine Konzentrationsabhängigkeit?
- 2. Erfolgt die Induktion zeitlich direkt im Anschluß an die Exposition und ist die Dauer ausreichend, eine Induktion nachzuweisen?
- 3. Ist der Biomarker spezifisch für einen Schadstoff bzw. eine Schadstoffgruppe?
- 4. Erfolgt parallel zur Induktion von MT eine Induktion anderer Biomarker?
- 5. Sind endogene und exogene Faktoren der Induktion bekannt?
- 6. Ist der gewählte Indikatororganismus für ein Monitoring geeignet?

Diese Fragen stellen eine Kombination der Anforderungen an einen Biomarker nach COUILLARD et al. (1995) und PEDERSEN et al. (1997) dar. Im Tierversuch Cd konnte gezeigt werden, daß die MT-Isoformen zwar induzierbar sind, die Konzentrationsabhängigkeit aber nur bedingt gegeben ist. Die Induktion erfolgte zeitlich direkt im Anschluß an die Exposition. Die Ergebnisse dieses Versuches sollten aber nicht direkt mit der Situation im Freiland verglichen werden, da die Exposition artifiziell erfolgte.

Nach jetzigem Kenntnisstand sind MT bei kontrollierter Schadstoffexposition spezifisch für Schwermetalle.

Parallel zu den eigenen Untersuchungen wurden im Rahmen des BMBF-Projektes ,Stresstox' von anderen Gruppen an identischem Probematerial potentielle Biomarker getestet. Ein Vergleich mit diesen Daten zeigt Korrelationen zu dem Biomarker Apoptose (PIECHOTTA, 1999, pers. Mitteilung). Bei diesem Biomarker konnten ähnlich ausgeprägte saisonale Schwankungen festgestellt werden, die sich auf Temperaturänderungen und Laichzyklus zurückführen lassen. Diese Parallelen bestätigen die eigenen Ergebnisse.

Es ist deutlich geworden, daß eine Induktion sowohl durch anthropogene als auch durch natürliche Stressoren stattfindet. Dabei bestimmt der Einfluß der natürlichen Stressoren die Induktion des MT-2 weitaus stärker als der Einfluß durch Cd. Bei Untersuchungen in Nordund Ostsee liegen also immer Kombinationen der Stressoren vor. Die Bewertung der MT als Biomarker erfordert genaue Kenntnis der saisonalen Zusammenhänge in einem Seegebiet bzw. einer Station. Ohne diese Informationen kann beim Vergleich von MT-Ergebnissen aus mehreren Seegebieten schnell ein natürlicher Einfluß anthropogen gewertet werden und der Einsatz von MT als Biomarker einer Schwermetallexposition bedeutungslos werden.

Abschließend muß festgestellt werden, daß die weibliche Kliesche als Monitoringorganismus nur bei Kenntnis der Rahmenparameter Jahreszeit, Temperatur, GSI, Länge und Alter für ein Monitoring einsetzbar ist. Im Vergleich muß festgestellt werden, daß die Kliesche zwar relativ standorttreu ist, dieser Vorteil aber durch die ausgeprägten saisonalen Zyklen vermutlich verloren geht.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren (Cd) auf die Induktion von MT-Isoformen untersucht und ausgehend von diesen Ergebnissen eine Beurteilung der MT-Isoformen als Biomarker einer Schwermetallexposition vorgenommen. Als Untersuchungsorganismus wurde die Kliesche (*Limanda limanda*) gewählt, die bereits mehrfach in Effektmonitoringprogrammen eingesetzt worden ist, so daß viele Daten hinsichtlich Schadstoffgehalten, Krankheiten und Populationsbiologie vorhanden ist.

Basierend auf einer Isolierung, Charakterisierung und anschließenden Identifizierung der MT-Isoformen wurde eine Quantifizierungsmethode zur Bestimmung der Hauptisoformen MT-1 und MT-2 entwickelt. Die Methode beruht auf einem Austausch der gebundenen Metalle gegen Cd. Als effektiver Reiningungsschritt wurde eine zweistufige Acetonfällung der Proteine vorgenommen und das so gereinigte Isolat mittels IEC in die Isoformen getrennt. Die Quantifizierung erfolgte indirekt über die Cd-Gehalte der erhaltenen IEC-Eluate mittels GF-AAS. Die Methode ist ausreichend empfindlich, eine Bestimmung des Isoforms MT-2 und des in geringen Mengen vorkommenden Isoforms MT-1 vorzunehmen.

Es wurden Hälterungsexperimente, Freilandprobenahmen in Nord- und Ostsee sowie die saisonale Untersuchung im Zeitraum von einem Jahr an einer festgelegten Station vorgenommen. Parallel zu den MT-Gehalten wurden die Gehalte an Zn und Cd in den Lebern der untersuchten Fische bestimmt.

Es zeigten sich unterschiedliche Induktionen der Isoformen beim Vergleich der Klieschen unterschiedlicher Stationen. Dabei konnten die niedrigsten Gehalte in Klieschen der Ostsee, die höchsten in Klieschen von Stationen im Englischen Kanal und vor Schottland festgestellt werden. Speziell für MT-1 konnten die höchsten Gehalte in Klieschen der Station im Englischen Kanal bestimmt werden. Beim Vergleich der Daten zwischen Winter und Frühsommer ergaben sich für MT-2 höhere Gehalte im Winter. Parallele Entwicklungen im jahreszeitlichen Vergleich konnten auch für die Zn-Gehalte festgestellt werden. Es konnte sowohl im Winter als auch im Frühsommer eine Korrelation von MT- und Zn-Werten gezeigt werden. Lediglich im Winter ergaben sich Korrelationen von Cd- und MT-Gehalten.

Eine Induktion durch Cd konnte im Hälterungsexperiment nachgewiesen werden, wobei eine Zunahme der MT-Werte erst bei Cd-Konzentrationen in der Leber festgestellt werden konnte, die die natürlichen weit überschreiten. In den Hälterungsexperimenten konnte ebenfalls eine Induktion der Isoformen durch eine Temperaturänderung bzw. Salinitätsänderung erreicht werden.

Diese Ergebnisse wurden in der saisonalen Untersuchung der Klieschen einer festgelegten Station vor Helgoland im Zeitraum eines Jahres genauer untersucht. Es ergaben sich ausgeprägte saisonale Zyklen für MT-2-, Zn- und Lipidgehalte. Ein Vergleich mit dem Laichzyklus und der Wassertemperatur zeigte, daß die MT-2-Gehalte einerseits durch steigende Zn-Gehalte während der Ovarienentwicklung als auch durch steigende Temperaturen im Sommer induziert werden. MT-1 zeigt diesen saisonalen Zyklus nicht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Cd- und MT-Werten festgestellt werden. Vor diesem Hintergrund wurden die beschriebenen Ergebnisse der unterschiedlichen MT-Gehalte in Klieschen der weit voneinander entfernten Stationen betrachtet. Es zeigte sich, daß hauptsächlich natürliche Einflüsse für die Induktion der MT verantwortlich sind. Anthropogene Einflüsse, im Form von Cd, haben einen geringeren Einfluß. Die Bewertung der MT als Biomarker ist daher abhängig von der genauen Kenntnis der saisonalen Zusammenhänge für Fische einer Station. Ansonsten könnten der Einfluß natürlicher Faktoren wie Wassertemperatur und Laichzyklus als anthropogener Einfluß gewertet und so irrtümlicherweise ein schadstoffbezogener Zusammenhang gezogen werden.

Die Eignung der Kliesche als Monitoringorganismus ist als begrenzt anzusehen. Die positive Eigenschaft der relativen Standorttreue wird durch die ausgeprägten saisonalen Zyklen mit den damit verbundenen Auswirkungen auf die Physiologie des Fisches eingeschränkt.

Summary

The present study was undertaken to investigate the influence of anthropogenic (Cd) and natural stressors on MT isoform induction. Based on these results the suitability of MT isoforms as biomarkers of a heavy metal exposure should be evaluated. The marine flatfish dab (Limanda limanda) was selected because of its use as a monitoring organism and available data on xenobiotic burden, diseases and population biology.

Based on the isolation, characterisation and subsequent identification a quantification method for both isoforms (MT-1 and MT-2) was developed. The method rest upon exchange of naturally bound metals against Cd. A two step acetone precipitation was carried out as an effective clean-up procedure. The isolated proteins were separated by means of IEC and eluates were fractionated. Indirect MT determination was performed by measuring the Cd content of these fractions with GF-AAS. The method was sensitive enough to determine minute amounts of MT-1.

Dabs from laboratory experiments and sampling sites in the North Sea and Baltic Sea (December and May) were examined. Seasonal changes and possible influences were evaluated over a 1-year period at a fixed site northwest of Helgoland in the German Bight. Additionally Cd and Zn contents of dab livers were determined.

The mean hepatic MT concentration varied significantly in female dab from different sites. Female dab collected at sites in the Baltic Sea had lower hepatic MT levels, while dab from sites at the Firth of Forth (northwest North Sea) and the English Channel showed the highest levels. Highest MT-1 concentrations were observed in dab from the English Channel, while dab from other site showed no differences for this isoform. A comparison of data from December and May revealed differences for MT-2 and Zn contents with higher concentrations in December. There was a strong correlation between Zn and MT contents in December and May but only correlation between Cd and MT contents in December.

Laboratory experiments showed an induction of MT isoforms at Cd concentrations 40 to 200 times higher than Cd burden found in the North Sea. Furthermore an induction of MT isoforms by temperature or salinity changes was observed.

Seasonal changes during one year were observed for MT-2, Zn and lipid content. No significant changes could be observed for MT-1. MT-2 content were influenced by water temperature and spawning period affecting Zn contents in the latter case. The was a strong correlation between Zn and MT-2 contents but no correlation between Cd and MT contents.

With this information a re-evaluation of MT results from dab in the North Sea and Baltic Sea was undertaken. It was shown that differences in MT contents might be caused by differences in spawning status and anthropogenic Cd burden.

The assessment of MT isoforms as a biomarker of heavy metal exposure depends on knowledge of seasonal changes at every sampling site. Without these information a natural influence on MT induction like water temperature changes or spawning status might be evaluated as an anthropogenic influence.

The suitability of the dab as a monitoring organism is limited. The positive attribute of minor fluctuations in an area is restricted by strong seasonal variations due to spawning physiology.

8 Anhang

8.1 Methoden

8.1.1 Homogenisierung und Cd-Saturation (nach RICHARDS und STEELE, 1987)

<u>Lösungen:</u>	
Aufarbeitungspuffer, pH 8.6	
10 mM Tris	1.2 g Tris
10 mM 2-MCE	0.8 g 2-MCE
	mit bidest. Wasser ad 1000 mL
	pH 8.6 mit 6 M HCl einstellen
CdCl ₂ -Lösung, 1 g/L	100 mg CdCl _{2*} H ₂ O in 100 mL bidest. Wasser
	lösen

Durchführung:

1 g der eingewogenen und angetauten Leber werden mit etwa 1.5 mL des Aufarbeitungspuffers versetzt und unter Eiskühlung 2 Minuten mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wird in 2 mL Reaktionsgefäße eingewogen und bei Cd-Saturation 200 μL der CdCl₂-Lösung zugegeben (entspricht 112 μg Cd absolut). Das Homogenat wird bei Bedarf mit Puffer auf 2 mL aufgefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zentrifugation erfolgt bei 21000 g (bzw. 100000 g bei der Methodenentwicklung) und 4 °C für 1 h. Das entstandene Cytosol wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der Fettschicht abgezogen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß eingewogen oder ohne Einwaage bei –80 °C in Reaktionsgefäßen gelagert. 30 μL des Cytosols werden für die Proteinbestimmung abgenommen, mit Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8.6; vgl. Anhang 1.1.2) auf 2 mL aufgefüllt und bei –20 °C bis zur Messung gelagert.

<u>Geräte:</u>

Homogenisator	Potter-Elvehjem-Teflon-Homogenisator, Thomas
Zentrifuge	3 K12, Sigma
Ultrazentrifuge	Centrikon T-2060, Kontron

8.1.2 Proteinbestimmung (nach BRADFORD, 1976)

Lösungen:	
Lösung 1	35 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
	20 mL H ₃ PO ₄ , 88 %
	10 mL Ethanol, 96 %
	im Dunkeln bei Raumtemperatur lagern
Meßlösung	3 mL Lösung 1
	3 mL H ₃ PO ₄ , 88 %
	1,5 ml Ethanol, 96 %
	42.5 mL Wasser
	im Dunkeln bei Raumtemperatur lagern
Tris-HCI-Puffer, pH 8.6	
20 mM Tris	2.42 g Tris
	mit bidest. Wasser ad 1000 mL;
	pH mit 6 M HCI einstellen
BSA-Stammlösung, 1000 mg/L	in Tris-HCI-Puffer
BSA-Arbeitslösung, 100 mg/L	in Tris-HCI-Puffer

Durchführung:

In die Aussparungen einer Mikrotiterplatte werden die Kalibrierstandards nach dem in Tab. A-1 angegebenen Schema pipettiert.

Standard	BSA-Stammlösung	BSA-Arbeitslösung	Tris-HCI-Puffer
[mg/L]	[µL]	[µL]	[µL]
400	20	-	30
200	10	-	40
100	-	50	-
80	-	40	10
60	-	30	20
40	-	20	30
20	-	10	40
0	-	-	50

 Tab. A-1:
 Pipettierschema der Kalibrierstandards (Proteinbestimmung)

25 μL der Probelösungen (vgl. Anhang 8.1.1) werden in den Aussparungen der Platte mit 25 μL Tris-HCI-Puffer versetzt. Es werden Doppelbestimmungen von Proben, Standards und Blindwert vorgenommen. Nach Zugabe von 200 μL Meßlösung wird die Extinktion bei 590 nm innerhalb von 15 Minuten im Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Vor der Messung wird die Mikrotiterplatte 3 s im Gerät geschüttelt, um Luftblasen zu entfernen. Der Proteingehalt der Proben wird mittels Standardkalibrierreihe über die Software des Readers bestimmt (vgl. Abb. A-1).



Abb. A-1: Kalibrierfunktion der Proteinbestimmung

<u>Geräte:</u> Mikroplatten-Reader Auswertesoftware

Dynex MRX Dynex Revelation 3.04

8.1.3 Acetonfällung (nach CARTEL, 1996)

Lösungen: Aceton, suprasolv, 4°C

Tris-HCI-Puffer, pH 8.6 20 mM Tris

2.42 g Tris mit bidest. Wasser ad 1000 mL und pH mit 6 M HCI einstellen

Durchführung:

Das unter 8.1.1 erhaltene eingewogene Cytosol wird mit dem äquivalenten Volumen an gekühltem Aceton versetzt und für 1 h bei –18 C gekühlt. Es folgt eine Zentrifugation bei 11500 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert, mit dem 1.5-fachen Volumen an gekühltem Aceton (4 °C) versetzt und für 1 h bei –18 °C gekühlt. Es folgt eine Zentrifugation bei 11500 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wird verworfen und der Rückstand in 750 µL Tris-HCI-Puffer resolvatisiert. Bis zur weiteren Verwendung wird die Lösung bei –80 °C gelagert.

Geräte:

Zentrifuge

0444 Dedingungen

3 K12, Sigma

8.1.4 Gelpermeationschromatographie (modifiziert nach MÖLLER, 1997)

o.i.4.i bealingungen	
Pumpe	Schlauchpumpe LKB-Pump P-1, Pharmacia
Flow	1 mL/min
Injektor	6-Wege-Ventil mit 1 mL oder 5 mL Probenschleife
Säule	Sephacryl S 100 HR, 850 * 26 mm, Pharmacia
Kühlung	4 °C mit Haake D 8, Omnilab (Wasserkühlung)
Detektor	L-4000 UV- und L-4250-UV-Vis-Detektor,
	Merck Hitachi, in Reihe
Meßwellenlängen	220 nm, 254 nm, 280 nm
Auswertesystem	Chromstar Software 4.03, Bruker
Fraktionensammler	2212 Helirac, Pharmacia
Eluent	

 60 mM NaCl
 17.5 g NaCl

 20 mM Na₂HPO_{4*}2 H₂O
 17.8 g Na₂HPO_{4*}2 H₂O

 0.02 % NaN₃
 1.0 g NaN₃

 10 mM 2-MCE
 1.8 mL 2-MCE

 in 4.8 L bidest. Wasser lösen und mit 6 M HCl

pH auf 7.0 einstellen. Auf 5 L auffüllen.

Tab. A-2:

8.1.4.2 Kalibrierung

Substanz	MG [kDa]	c [mg/mL]
BSA	67	2.0
Ovalbumin	43	1.5
α -Chymotrypsinogen	25	2.0
Ribonuclease A	13.7	3.0
Aprotinin	6.5	1.5
Insulin-B-Kette	3.5	1.5

Molekulargewichtsstandard, gelöst im GPC-Eluenten



Abb. A-2: Kalibriergerade für die GPC

8.1.5	Anionenaustauschchromatographie	(modifiziert nach	SCUDIERO et al.,	1995)
-------	---------------------------------	-------------------	------------------	-------

8.1.5.1 Bedingungen

Pumpe	L-6220 Intelligent Pump, Merck-Hitachi	
Flow	2 mL/min	
Injektor	6-Wege-Ventil mit 500 µL Probenschleife	
Säule	Resource Q, 6 mL, Pharmacia	
Detektor	L-4000 UV- und L-4250-UV-Vis-Detektor,	
	Merck-Hitachi, in Reihe	
Meßwellenlängen	220 nm, 254 nm, 280 nm	
Auswertesystem	Chromstar Software 4.03, Bruker	
Fraktionensammler	L-5200 Fraction Collector, Merck-Hitachi	

Eluent

A: 20 mM Tris (pH 8.6)	2.42 g Tris
	in 950 mL bidest. Wasser lösen; mit 6 M HCl
	pH auf 8.6 einstellen. Mit bidest. Wasser ad 1000 mL

B: 20 mM Tris (pH 8.6)	2.42 g Tris
0.4 M NaCl	23.38 g NaCl (4 h bei 550°C geglüht)
	in 950 mL bidest. Wasser lösen; mit 6 M HCl
	pH auf 8.6 einstellen. Mit bidest. Wasser ad 1000 mL

Gradient

Min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5	100	0
30	85	15
32	0	100
39	100	0
43	100	0

8.1.6 Konzentrierung und Entsalzung

Konzentratoren	Ultrafree®-4 oder Ultrafree®-15,			
	Ausschlußgrenze 5 kDa, Millipore			
Zentrifuge	3 K 12, Sigma			
Bedingungen	4 °C, 5000 g (Ultrafree®-4), 2000 g (Ultrafree®-15)			
Waschen	2-faches Maximalvolumen an bidest. Wasser			

8.1.7 Atomabsorptionsspektrometrie (nach BGVV, 1989a, 1989b und 1989c)

8.1.7.1 Lösungen und Standards					
verd. HNO ₃ , 0.2%	6.2 mL konz. HNO ₃ , suprapur auf 1000 mL				
	mit bidest. Wasser auffüllen				
Cd-Standardlösung	Stammlösung (1 g/L, Merck) mit 0.2% HNO3				
5 µg/L	entsprechend verdünnen				
Zn-Standardlösungen	Stammlösung (1 g/L, Merck) mit 0.2% HNO3				
0.25 – 4.00 mg/L	entsprechend verdünnen				
	Standards: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 mg/L				
Cu-Standardlösungen	Stammlösungen (1 g/L, Merck) mit 0.2% HNO3				
0.50 – 3.00 mg/L	entsprechend verdünnen				
	Standards: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mg/L				
Cd-Standardlösungen	Stammlösungen (1 g/L, Merck) mit 0.2% HNO3				
0.25 – 4.00 mg/L	entsprechend verdünnen				
	Standards: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/L				

8.1.7.2 Druckaufschluß

Reinigungsaufschluß. Nach Zugabe von 1 mL konz. Salpetersäure (65 %, suprapur, Merck) wird das Teflongefäß in der Tölgbombe 3 h bei 150 °C im Heizblock erhitzt. Nach Erkalten in fließendem kalten Leitungswasser, wird die Tölgbombe geöffnet, die Säure verworfen und das Gefäß zweimal mit bidest. Wasser gespült. Die Trocknung erfolgt bei 105 °C im Trockenschrank.

Probenaufschluß. Etwa 100 bis 500 mg Substanz werden in die Teflongefäße eingewogen und mit 2 mL konz. Salpetersäure (s.o.) versetzt. Nach Einspannen des Teflongefäßes in der Tölgbombe wird bei 150 °C für 3 h erhitzt. 10 mL Schliffreagenzgläser (graduiert) werden mit 0.2 % HNO₃ gefüllt für mehrere Stunden stehenlassen und die verdünnte Säure anschließend verworfen. Nach Abkühlen der Tölgbomben an der Luft oder im Wasser wird das Aufschlußgefäß herausgenommen und die Aufschlußlösung in ein 10 mL-Schliffreagenzglas überführt und das Gefäß dreimal mit je 2 mL bidest. Wasser nachgespült und im Schliffreagenzglas vereinigt. Das Reagenzglas wird auf 10 mL aufgefüllt.

Proben ohne Aufschluß. Eingesetzt werden Eluate der GPC oder IEC sowie Überstand und resolvatisierte Lösung nach Fällung mit 80% Aceton Die Eluate werden mit 0.2 % HNO₃ entsprechend verdünnt. Der Überstand der Fällung wird bei 60 °C im Heizblock eingeengt und mit 0.2 % HNO₃ aufgenommen.

8.1.7.3 F-AAS					
Gerät	PU 9100 Atomicabsorptionspectrophotometer,				
	Phillips				
Brenngase	Luft/Acetylen				
Lichtquelle (Lampenstrom)	Zinkhohlkathodenlampe (10 mA)				
	Kupferhohlkathodenlampe (12 mA)				
	Cadmiumhohlkathodenlampe (7.2 mA)				
Wellenlänge	213.9 nm (Zn)				
	324.8 nm (Cu)				
	2288 nm (Cd)				
Kalibrierstandards	0.25 – 4 mg/L (Zn); vgl. Abb. A-3				
	0.50 – 3 mg/L (Cu); vgl. Abb. A-4				
	0.25 – 4 mg/L (Cd); vgl. Abb. A-5				
Nachweisgrenzen	berechnet nach Leerwertmethode (DIN 32645, 1994)				
	Zn: 0.005 mg/L				
	Cu: 0.01 mg/L				
	Cd: 0.005 mg/L				



Abb. A-3: Kalibrierfunktion der Zn-Bestimmung (F-AAS)



Abb. A-4: Kalibrierfunktion der Cu-Bestimmung (F-AAS)



Abb. A-5: Kalibrierfunktion der Cd-Bestimmung (F-AAS)

8.1.7.4 GF-AAS

Gerät	PU 9200 Atomicabsorptionspectrophotometer				
	mit PU 9380 Furnace Autosampler				
	mit PU 9390 Electrothermal Atomiser, Phillips				
Schutzgas	Argon 4.8				
Lichtquelle (Lampenstrom)	Cadmiumhohlkathodenlampe (7.2 mA)				
Untergrundkompensation	Deuteriumlampe				
Wellenlänge	228.8 nm				
Kalibrierstandards	1 – 5 μg/L (vgl. Abb A-6)				
Injektionsvolumen	20 µL, Doppelbestimmung				
Temperaturprogramm	s. Tab. A-3				
Nachweisgrenze	0.05 μg/L				
	(bestimmt nach Leerwertmethode DIN 32645, 1994)				



Abb. A-6: Kalibrierfunktion der Cd-Bestimmung (GF-AAS)

Tab.	A-3:	Temperatur	programm	für (Cd-Bestimmung	(GF-AAS	5)
		1	1 0		0	\ \	

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Aufheizrate [°C/s]
Trocknen	130	35	20
Veraschen	350	30	30
Atomisieren	1300	3	
Ausglühen	2000	3	

8.1.7.5 Qualitätskontrolle der Cd- und Zn-Bestimmung

Tab. A-4: Qualitätskontrolle der Cd- und Zn-Bestimmung (x: Mittelwert, s_r: Standardabweichung, WFR: Wiederfindungsrate, n: Anzahl der Proben)

	Cadmium [µg/kg]		Zink [mg/kg	
	lst	lst Soll		Soll
Х	292	298	135	142
Sr	28	25	7	3
WFR [%]	98		95	
n	20		28	

8.1.8 Berechnung der MT-Gehalte

$$c[mg/mg] = \frac{a \times MW(MT) \times 750 \text{ mL}}{MW(Cd) \times 500 \text{ mL} \times 7 \times \text{ r}}$$

Abb. A-7: Berechnung der MT-Gehalte. α , Cd-Konzentration in μ g/L; MW(MT), 7 kDa; 750 μ L, Volumen nach Acetonfällung; MW(Cd), 112,4 g/mol; 500 μ L, Injektionsvolumen (IEC); 7, Anzahl der gebundenen Cd-Atome; ρ , Proteingehalt [mg/L].

8.1.9 Lipidbestimmung

Lösungen und Standards:	
Schwefelsäure, 98 %	
Vanillinlösung, 1%ig	1 g Vanillin in 100 mL dest. Wasser lösen
Phosphorsäure-Vanillin- Reagenz	20 mL Vanillinlösung mit 80 mL 85 %iger Phosphor- säure versetzen
Chloroform-Methanol- Gemisch, 1:1	
Fischöl-Stammlösung	44.2 mg Fischöl mit Chloroform-Methanol-Gemisch auf 100 mL auffüllen
Kalibrierstandards (µL der Stammlösung)	17.7 μg (40 μL), 44.2 μg (100 μL), 61.9 μg (140 μL), 88.4 μg (200 μL), 114.9 μg (260 μL)

Durchführung:

Klieschenleber (10-250 mg) zusammen mit trockenem Natriumsulfat einwiegen und im Achatmörser homogenisieren. Vollständig in verschließbare Pyrexgläser überführen und mit 4 mL Chloroform-Methanol-Gemisch versetzen. Gründlich mischen und nach 2 h bei 10 – 50 μ L vom Überstand abpipettieren und in ein 10 mL Reagenzglas überführen. Bei 80 °C im Heizblock zur Trockne bringen und mit 200 μ L konz. Schwefelsäure versetzen. 10 min im siedenden Wasserbad erhitzen und anschließend abkühlen lassen. Farbreaktion durch Zugabe von 4 mL Phosphorsäure-Vanillin-Reagenz starten. Die Lösung muß gut durchmischt werden. Lösung in Kunststoffküvetten überführen und Extinktion nach 30 min bei 526 nm bestimmen. Als Blindwert 260 μ L Lösungsmittel zur Trockne bringen und weiter wie beschrieben behandeln. Die Auswertung erfolgt mittels Kalibriergerade (vgl. Abb A-8). Alle Bestimmungen werden in Doppelbestimmung durchgeführt.



Abb. A-8: Kalibrierfunktion der Lipidbestimmung

<u>Gerät:</u> Spektralphotometer

Lambda T20, Perkin Elmer

8.2 Probenahme

8.2.1 Stationsdaten zur Freilandprobenahme

Die im folgenden beschriebenen Stationsdaten werden wegen einer besseren Übersicht nach Ausfahrten mit dem BFA-Forschungsschiff "Walter Herwig III" geordnet. Die Abkürzung der Bezeichnung setzt sich aus dem Kürzel "WH" und einer fortlaufenden Nummer zusammen. Die Stationsnamen sind interne Bezeichnungen der BFA für Fischerei und sind in den nachfolgenden Tabellen als Bereiche mit geographischer Länge und Breite angegeben. Dabei steht N für "Nordsee", G für "Great Britain" und B für "Baltic". Sie werden wegen der Vergleichbarkeit beibehalten. Temperatur, Salinität und O₂-Gehalt werden mittels Multifunktionssonde am Grund gemessen bzw. Proben genommen und an Bord bestimmt. Diese Sonde kommt jeweils zwischen den Hols zum Einsatz. Dadurch ergeben sich an einem Tag mehrere zum Teil abweichende Werte. In der Regel entspricht der Tabellenwert dem Mittelwert aus zwei Messungen. Die Messungen wurden freundlicherweise von G. Nagel und A. Schulz (BFA für Fischerei) durchgeführt. Bei größeren Abweichungen wird der Bereich angegeben.

Gebiet	Hol	Breite	Länge	Temperatur	Salinität	Tiefe	O ₂
Datum	Ν			[°C]	[‰]	[m]	[mL/L]
B 01	1	54°30'N-	10°40'E-	6,8	21,8	20	7,2
08.12.96		54°35'N	10°50'E				
B 12	3	54°10'N-	11°35'E-	7,1	16,3	23	6,2
19.12.96		54°20'N	11°45'E				
N 01	1	54°15'N-	07°26'E-	2,9	33,0	34	7,6
09.01.97		54°25'N	07°39E				
N 04	1	54°25'N-	02°00'E-	6,0	34,6	32	8,8
04.01.97		54°50'N	02°31'E				
N 06	1	56°15'N-	01°50'E-	7,0	34,5	52	6,9
05.01.97		56°25'N	02°10'E				
G 08	2	50°40'N-	00°30'E-	4,4	34,9	30	7,3
07.01.97		50°50'N	00°50'E				

Tab. A-5: Stationsdaten zur Probenahme WH 179 (N: Anzahl der Hols).

Gebiet	Hol	Breite	Länge	Temperatur	Salinität	Tiefe	O ₂
Datum	Ν			[°C]	[‰]	[m]	[mL/L]
N 01	1	54°15'N-	07°26'E-	7,5	33,2	25 - 36	7,3
17.05.97		54°25'N	07°39E				
N 04	1	54°25'N-	02°00'E-	10,8	34,8	14 - 19	6,0
31.05.97		54°50'N	02°31'E				
N 06	1	56°15'N-	01°50'E-	8,0	34,5	52	5,4
02.06.97		56°25'N	02°10'E				
G 08	1	50°40'N-	00°30'E-	10,9	35,1	25 - 34	6,4
19.05.97		50°50'N	00°50'E				

Tab. A-6: Stationsdaten zur Probenahme WH 185 (N: Anzahl der Hols).

Tab. A-7: Stationsdaten zur Probenahme WH 191 (N: Anzahl der Hols).

Gebiet	Hol	Breite	Länge	Temperatur	Salinität	Tiefe	O ₂
Datum	Ν			[°C]	[‰]	[m]	[mL/L]
B 01	2	54°30'N-	10°40'E-	6,3-9,0	21,3	15 – 22	4,5
06.12.97		54°35'N	10°50'E				
B 12	2	54°10'N-	11°35'E-	6,6	18,0	20	6,8
13.12.97		54°20'N	11°45'E				
N 01	1	54°15'N-	07°26'E-	6,8	34,3	36	9,9
20.12.97		54°25'N	07°39E				
N 04	1	54°25'N-	02°00'E-	8,2	34,5	18 - 27	9,4
18.12.97		54°50'N	02°31'E				
N 06	1	56°15'N-	01°50'E-	9,0	34,8	49	9,3
19.12.97		56°25'N	02°10'E				
G 08	1	50°40'N-	00°30'E-	11,6	35,1	33	8,7
16.12.97		50°50'N	00°50'E				
8.3 Daten des Tierversuches Cd

Tab. A-8: Daten des Hälterungsexperimentes Cd. Einzelwerte jeder Behandlungsgruppe mit Median (fett dargestellt); Altersangabe in Jahren. Fortsetzung der Tabelle auf den nachfolgenden Seiten.

Behandlung	Fisch	Tag	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Alter	Länge
			[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[cm]
Kontrolle	1	1	50,7	46,5	0,231	2,895	3	23
	2	1	93,1	40,9	0,360	1,067	4	21
	3	1	252,3	43,8	0,128	1,657	4	23
	4	1	65,6	33,1	0,039	0,230	2	19
	5	1	53,5	35,3	0,384	1,166	2	19
	6	1	124,1	27,0	0,090	1,003	5	23
	7	1	66,3	24,9	0,228	1,485	4	25
			66,3	35,3	0,228	1,166		
Kontrolle	1	5	36,1	41,8	0,099	0,698	3	22
	2	5	16,2	23,5	0,156	1,879	5	26
	3	5	53,5	34,8	0,097	1,035	4	23
	4	5	18,3	27,6	0,198	2,895	2	22
	5	5	24,8	24,6	0,088	0,598	3	23
			24,8	27,6	0,099	1,035		
Kontrolle	1	10	54,3	39,0	0,174	1,075	2	20
	2	10	120,9	44,7	0,245	1,502	3	20
	3	10	47,3	26,6	0,189	1,455	4	23
	4	10	56,0	30,9	0,295	1,468	3	20
	5	10	177,9	35,2	0,108	0,864	4	25
	6	10	55,5	30,4	0,237	2,670	3	22
	7	10	25,8	28,3	0,165	1,034	2	21
			55,5	30,9	0,189	1,455		
PBS	1	1	41,9	48,1	0,187	1,320	4	23
	2	1	20,5	25,1	0,256	2,309	3	22
	3	1	124,8	39,6	0,101	0,965	3	23
	4	1	63,5	39,0	0,202	1,900	3	20
	5	1	92,8	26,8	0,204	1,151	4	21
	6	1	72,7	32,7	0,095	1,200	4	23
	7	1	96,5	32,3	0,217	1,030	3	23
			72,7	32,7	0,202	1,200		
PBS	1	2	43,9	28,2	0,053	0,218	5	22
	2	2	114,0	32,1	0,295	1,945	5	23
	3	2	46,8	39,4	0,230	2,494	3	23
	4	2	61,1	40,1	0,154	1,200	3	19
	5	2	77,1	46,5	0,100	1,980	3	23
	6	2	94,3	28,7	0,150	0,767	5	23
	7	2	31,1	35,2	0,373	1,129	3	21
550			61,1	35,2	0,154	1,200		
PBS	1	5	32,8	32,6	0,166	0,339	2	20
	2	5	50,5	41,3	0,236	1,148	3	23
	3	5	49,2	36,4	0,123	1,768	3	24
	4	5	40,6	27,2	0,254	1,964	3	20
	5	5	21,5	22,1	0,335	1,230	3	21
	6	5	106,4	29,7	0,030	0,932	3	22
	1	5	88,2	19,5	0,145	1,243	6	26
DD	4	40	49,2	29,7	0,166	1,230	4	04
rb2	1	10	116,1	39,6	0,254	1,213	4	21
	2	10	34,1	3∠,1 00.1	0,123	0,752	3	21
	3	10	98,7	28,1	0,120	0,559	5	26
	4	10	160,2	3∠,5	0,090	1,843	4	20
	5	10	97,6	18,4 26.4	0,278	0,035	3	24
	0	10	02,2	∠0,1 30.1	0,213	2,090	4	24
			, <u> </u>	55,1	0,100	0,000		

Behandlung	Fisch	Tag	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Alter	Länge
			[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[cm]
10 µg	1	1	101,0	24,4	0,050	0,978	5	23
	2	1	83,1	34,2	0,167	0,870	3	20
	3	1	108,5	30,5	0,101	1,525	2	20
	4	1	47,5	44,6	0,088	0,598	3	22
	5	1	148,6	38,3	0,454	2,625	5	26
	6	1	49,5	27,8	0,487	3,339	3	23
			92,1	32,4	0,134	1,252		
10 µg	1	2	49,8	22,9	0,159	1,905	4	23
	2	2	105,3	27,0	0,259	3,945	2	18
	3	2	43,4	32,9	0,126	1,045	4	26
	4	2	56,4	26,1	0,047	0,487	2	21
	5	2	59,4	30,0	0,065	0,598	2	22
	6	2	83,5	60,9	0,243	1,863	3	21
10			57,9	28,5	0,143	1,454		05
10 µg	1	5	179,5	27,8	0,124	1,832	5	25
	2	5	91,8	30,3	0,016	0,376	4	22
	3	5	386,3	40,2 22.0	0,120	1,660	3	20
	4	5	385,2	33,6	0,006	0,113	4	25
	5	5	294,3	23,1	0,287	2,278	3	21
	0	Э	44,7	20,0	0,302	3,135	3	23
10.00	1	10	230,9 443.4	30,7	0,122	1,740	2	20
io µg	2	10	201.5	36.0	0,092	3 587	3 1	20
	2	10	201,3	34.3	0,230	1 507	5	25
	1	10	271, 4 403.8	31 3	0,207	2 687	3	20
	5	10	-00,0 50 Q	28.9	0,204	2,007	3	20
	6	10	248.5	20,5	0,130	2,407	4	20
	0	10	260.0	30.7	0.246	2.587		
100 µg	1	1	933.7	39.8	0.354	2,262	4	22
	2	1	139.7	28.3	0.343	2.506	3	23
	3	1	70.7	26.4	0.243	2.006	4	24
	4	1	498,5	40,3	0,476	0,838	4	24
	5	1	426,0	31,3	0,160	2,971	4	24
	6	1	513,9	32,5	0,172	1,441	4	26
			462,3	31,9	0,293	2,134		
100 µg	1	2	893,0	11,7	0,178	2,957	4	21
	2	2	1432,8	37,2	0,237	1,945	3	23
	3	2	1419,2	31,4	0,098	0,934	4	23
	4	2	65,9	28,4	0,276	2,936	2	22
	5	2	939,7	31,3	0,387	3,039	4	25
	6	2	111,0	52,2	0,262	2,934	3	22
			916,4	31,4	0,249	2,935		
100 µg	1	5	59,5	26,6	0,191	3,945	3	21
	2	5	2369,9	27,8	0,276	4,784	5	25
	3	5	3586,1	24,4	0,173	1,798	4	23
	4	5	3424,4	20,7	0,427	5,982	3	21
	5	5	2995,6	40,4	0,386	5,358	3	22
	6	5	2142,5	18,5	0,063	1,312	5	24
100		40	2682,8	25,5	0,234	4,365		
100 µg	1	10	4225,4	31,0	0,191	3,945	4	23
	2	10	3056,3	30,4	0,276	4,784	3	21
	3	10	4155,5	70,8	0,173	1,798	2	20
	4	10	5114,4	23,8	0,427	5,982	4	20
	5	10	3/44,3	38,4 40.0	0,386	5,358	3	∠1 20
	6	10	2247,3	46,6	0,063	1,312	3	22
1			3949,9	34,1	U,234	4,303		

Behandlung	Fisch	Tag	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Alter	Länge
		•	[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[cm]
1 mg	1	1	4109,1	64,5	0,834	5,829	4	23
-	2	1	12932,4	29,5	0,298	4,089	3	21
	3	1	10690,0	88,6	0,372	2,176	2	18
	4	1	5821,3	8,2	0,487	1,296	3	24
	5	1	19319,9	22,8	0,584	4,765		23
	6	1	9512,6	63,0	0,621	7,402	3	20
			10101,3	46,3	0,536	4,427		
1 mg	1	2	14628,9	23,6	0,276	4,982	5	25
-	2	2	6590,4	15,5	0,294	1,846	4	21
	3	2	33206,5	23,0	0,965	6,023	4	22
	4	2	1583,4	29,5	0,587	6,983	2	22
	5	2	1819,4	9,2	0,289	5,987	3	23
	6	2	14198,9	26,3	0,739	8,320	4	23
			10394,7	23,3	0,441	6,005		
1 mg	1	5	23270,0	35,6	1,113	7,037	3	23
0	2	5	18804,2	22,5	0.346	2,852	3	23
	3	5	32817,6	22,9	0,548	7,381	4	23
	4	5	32839,1	20,6	0,874	3,262	4	23
	5	5	10351,8	27,0	0,498	2,048	4	22
			23270,0	22,9	0,548	3,262		
1 mg	1	10	7168,6	31,8	1,902	7,303	3	22
5	2	10	11631,5	34,6	1,365	4,987	4	24
	3	10	57795,9	44,4	0,937	3,908	2	20
	4	10	19829,7	30,5	2,725	5,422	4	25
	5	10	23063,5	26,6	0,923	5,923	3	23
	6	10	39436.5	31.3	1.654	2.032	3	21
			21446,6	31,6	1,510	5,205		
5 mg	1	1	23296,3	22,4	1,902	7,303	3	22
0	2	1	45952,5	14,9	1,365	4,987	4	25
	3	1	44354,8	11,7	0,937	3,908	3	24
	4	1	70302,7	13,5	2,725	5,422	3	23
	5	1	39500,9	21,1	0,923	5,923	3	23
	6	1	17516,1	31,1	1,654	2,032	4	23
			41927,9	18,0	1,510	5,205		
5 mg	1	2	44378,0	10,8	0,142	1,120	2	21
0	2	2	11573,5	31,3	0,197	3,724	3	20
	3	2	55985,0	12,5	0,159	1,649	4	25
	4	2	63733,8	10,5	0,464	2,309	3	22
	5	2	27804.5	19.2	,	5.254	4	22
	6	2	51266.1	20,4		4,920	3	21
			47822,1	15,9	0,178	3,017		
5 mg	1	5	54011,0	9,3	0,105	4,151	4	25
-	2	5	26062,9	14,7	0,199	5,413	4	21
	3	5	43413,9	21,0		1,287	4	23
	4	5	48433,9	11,9	0,341	2,720	4	24
			45923,9	13,3	0,199	3,436		

8.4 Daten des Tierversuches ST

Tab. A-9: Daten des Hälterungsexperimentes ST. Einzelwerte jeder Behandlungsgruppe mit Median (fett dargestellt); Altersangabe in Jahren.

Behandlung	Fisch	Tag	MT-1	MT-2	Länge	Alter
			[µg/mg]	[µg/mg]	[cm]	
Kontrolle	1	7	0,02	0,36	21	3
(33‰; 5°C)	2	7	0,12	1,03	18	2
	3	7	0,08	0,67	22	5
	4	7	0,04	0,64	24	5
	5	7	0,01	0,05	20	2
	6	7	0,06	1,09	27	4
	7	7	0,01	1,19	23	3
	8	7	0,03	0,48	25	6
	9	7	0,11	0,56	20	3
			0,04	0,64		
Salinität	1	7	0,56	1,76	23	4
(25‰; 5°C)	2	7	0,42	2,37	26	4
	3	7	0,51	1,58	21	4
	4	7	0,66	4,57	21	2
	5	7	0,27	0,84	23	3
	6	7			20	2
	7	7	0,18	2,72	24	2
	8	7	0,37	0,82	22	4
	9	7	0,24	1,45	20	2
	10	7	0,41	2,50	24	5
			0,41	1,76		
Temperatur	1	7	0,23	1,46	19	2
(33‰; 9°C)	2	7	0,30	2,84	23	3
	3	7	0,62	2,72	22	3
	4	7	0,45	15,60	24	4
	5	7	2,54	8,07	19	3
	6	7	0,31	2,16	21	4
	7	7	0,64	2,28	21	2
	8	7	2,88	18,30	23	2
	9	7	0,24	2,06	19	2
	10	7	1,67	8,90	26	4
			0,54	2,78		

8.5 Daten der Freilandausfahrt WH 179

Tab. A-10: Daten der Freilandprobenahme WH 179; Einzelwerte der Fische jeder Station mit Median (fett dargestellt); Fortsetzung der Tabelle auf den nachfolgenden Seiten.

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Alter	Länge
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]	[%]	[%]		[cm]
B01	1	91,2	34,5	0,03	4,27				28
	2	46,0	40,7	0,08	1,66				28
	3	117,7	42,4	0,63	2,01				27
	4	106,6	31,0	0,02	0,37				26
	5	104,1	30,8	0,01	0,20				27
	6	56,4	41,4	0,02	2,00				28
	7	160,4	29,2	0,03	1,69				25
	8	90,9	40,7	0,05	3,19				26
	9	75,5	39,1	0,11	3,08				26
	10	63,5	35,0	0,08	1,63				27
				0,04	1,85				
B01	11	56,1	27,1			1,61	34,9		25
	12	86,8	38,1			1,25	26,7		26
	13	57,5	33,7			2,41	38,3		29
	14	120,3	46,3			2,00	20,3		26
	15	60,9	39,2			3,09	36,8		30
	16	108,8	42,1			2,65	23,0		27
	17	44,4	49,9			4,88	32,6		33
	18	45,3	39,3			1,17	32,8		25
	19	123,0	30,6			1,39	20,0		25
	20	201,5	30,1			2,19	26,1		33
	21	76,2	33,2			2,71	25,0		29
	22	70,9	28,1			3,29	33,1		27
	23	81,3	41,4			1,89	26,3		26
	24	41,6	48,2			3,38	25,2		28
	25	140,9	51,2			6,03	32,3		39
		81,3	39,1			2,41	26,69		
B12	1	30,9	31,4						28
	2	28,6	36,6						27
	3	94,3	36,5	0.40	44.04				28
	4	62,3	34,3	0,49	11,61				29
	5	45.5	20.0	0,10	1,98				28
	0 7	45,5	39,8	0,12	1,70				27
	/	07,0	32,4	0,12	4,10				20
	8	44,3	60,9 45.6	0,14	1,63				32
	9	02,9 25.4	40,0	0.11	2 62				20
	10	20,4	39,0	0,11	2 80				21
B12	11	41.9	42.0	0,12	2,00	6.35	20.9		27
	12	28.1	45.2			4 21	32.7		25
	13	64.2	48.0			7.63	17.2		27
	14	63.7	43.0			3.33	28.7		26
	15	42.2	25.3			2.54	38.3		25
	16	30.5	28.9			1.79	39.7		27
	17	25.4	34.5			4.14	32.0		28
	18	104.8	51.0			7,08	16.6		25
	19	45.8	52.1			5.22	28.7		26
	20	57.7	53.1			7,45	31.3		28
	21	81.7	55.1			9,66	31.3		29
	22	40.6	32.6			6.03	25.3		30
	23	60.5	37.6			6,54	29.0		30
	24	33.5	64.0			5,30	28.4		35
	25	72.1	43.8			4,57	24.5		25
		45,6	40,9			5,30	28,74		-

No1 1 37.8 47.2 0.28 5.3 13.6 7.6 30 1 37.8 47.2 0.05 2.57 14.1 9.6 26 3 91.0 40.1 0.03 1.41 9.3 14.0 27 5 284.6 72.0 0.31 7.93 - 26 6 309.3 37.1 0.14 3.84 9.1 27 8 121.8 43.8 0.08 1.79 11.2 26 7 156.5 67.6 0.28 9.84 9.1 27 8 121.8 43.8 0.08 6.32 9.4 31 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 28 11 1 163.0 43.2 11.7 10.2 18.3 25 13 107.5 31.2 11.7 10.2 18.3 26 14 262.7 34.8 - <th>Station</th> <th>Fisch</th> <th>Cd</th> <th>Zn</th> <th>MT-1</th> <th>MT-2</th> <th>GSI</th> <th>Fettgehalt</th> <th>Alter</th> <th>Länge</th>	Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Alter	Länge
N01 1 37.8 47.2 0.28 5.33 13.6 7.6 30 2 106.1 41.5 0.05 2.5.7 14.1 9.6 26 3 91.0 40.1 0.03 1.41 9.3 14.0 27 5 284.6 72.0 0.031 7.93 27 6 309.3 37.1 0.14 3.84 26 7 156.5 67.6 0.28 9.84 9.1 27 8 121.8 43.8 0.08 6.32 9.4 31 27 9 123.4 35.8 0.08 6.32 9.4 31 25 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 28 11 163.0 43.2 11.7 10.9 29 13 107.5 31.2 7 7.6 21.7 26 14 262.7 34.8 7 7.6 21.7 <th></th> <th></th> <th>[µg/kg]</th> <th>[mg/kg]</th> <th>[µg/mg]</th> <th>[µg/mg]</th> <th>[%]</th> <th>[%]</th> <th></th> <th>[cm]</th>			[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]	[%]	[%]		[cm]
2 106.1 41.5 0.05 2.57 14.1 9.6 27 4 205.1 43.7 0.09 4.12 26 5 284.6 72.0 0.31 7.93 27 6 309.3 37.1 0.14 3.84 26 7 156.5 67.6 0.28 9.84 9.1 27 9 123.4 35.8 0.08 6.32 9.4 31 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 28 11 112 129.9 79.5 11.7 10.2 18.3 25 13 107.5 31.2 10.2 18.3 25 14.1 25 15 204.5 39.7 7 7.6 21.7 26 16 77.7 42.0 8.0 17.5 28 14.1 25 18 166.2 38.9 7 7.4 6.6 28 28	N01	1	37,8	47,2	0,28	5,33	13,6	7,6		30
3 91,0 40,1 0,03 1,41 9,3 14,0 27 5 284,6 72,0 0,31 7,93 26 6 309,3 37,1 0,14 3,84 26 7 156,5 67,6 0,28 9,84 9,1 27 8 121,8 43,8 0,08 1,79 11,12 26 9 123,4 35,8 0,08 6,32 9,4 31 10 86,5 49,7 0,18 9,36 8,9 28 11 163,0 43,2 11,2 10,2 18,3 25 14 262,7 34,8 - 2,8 14,1 25 15 204,5 39,7 - 7,6 21,7 26 16 77,7 42,0 - 14,3 10,9 25 16 77,7 42,0 - 7,3 11,9 26 20 86,8		2	106,1	41,5	0,05	2,57	14,1	9,6		26
4 205,1 43,7 0,09 4,12 226 5 284,6 72,0 0,31 7,73 277 6 309,3 37,1 0,14 3,84 26 7 156,5 67,6 0,28 9,84 9,1 27 9 123,4 43,8 0,08 6,32 9,4 31 10 86,5 49,7 0,18 9,36 8,9 28 7 163,0 43,2 11,7 10,9 29 13 107,5 31,2 11,7 10,9 29 14 262,7 34,8 14,1 25 14,3 10,9 25 14 262,7 34,8 14,1 25 26 24,5 39,7 7,6 21,7 26 15 204,5 39,7 7,4 8,0 17,5 26 21,7 26 18 186,2 38,9 7,4 8,6 21,7 28 24 14,2 10,2 28 21 12,8 38,2		3	91,0	40,1	0,03	1,41	9,3	14,0		27
b 224,6 7,20 0,31 7,93 226 7 156,5 67,6 0,28 9,84 9,1 27 8 121,8 43,8 0,08 1,79 11,2 26 9 123,4 35,8 0,08 6,52 9,4 31 10 86,5 49,7 0,18 9,36 8,7 11,3 25 11 1153,0 43,2 0,11 4,73 10,2 18,3 25 12 129,9 79,5 7,6 10,2 18,3 25 14 262,7 34,8 2,8 14,1 25 26 16 77,7 42,0 7,3 11,9 26 26 17 122,3 50,9 7,4 6,6 28 28 19 75,1 40,9 7,3 11,9 26 21 61,5 35,2 9,5 21,0 28 23 138,2 </th <th></th> <th>4</th> <th>205,1</th> <th>43,7</th> <th>0,09</th> <th>4,12</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th>26</th>		4	205,1	43,7	0,09	4,12				26
6 309,3 37,1 0,14 3,84 9,1 27 8 121,8 43,8 0,08 1,79 11,2 26 9 123,4 35,8 0,08 6,32 9,4 31 10 86,5 49,7 0,18 9,36 8,9 28 I 11 163,0 43,2 11,7 10,9 29 13 107,5 31,2 11,7 10,9 29 13 107,5 31,2 10,2 18,3 25 16 77,7 42,0 8,0 17,7 26 16 77,7 42,0 7,3 11,9 26 20 86,8 29,1 14,3 10,9 25 18 186,2 38,9 7,4 6,6 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 13,6 26 24		5	284,6	72,0	0,31	7,93				27
/ 196.5 67.6 0.28 9.84 9,1 27 9 123.4 35.8 0.08 6.32 9.4 31 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 23 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 23 11 163.0 43.2 17 11.7 10.9 29 12 129.9 79.5 10.2 18.3 25 14 262.7 34.8 2.8 11.7 10.9 29 15 204.5 39.7 76 10.2 18.3 25 16 77.7 42.0 8.0 17.5 26 28 18 186.2 39.9 74 4.6 22 28 19 75.1 40.9 73 11.9 26 20 86.8 29.1 74 8.6 210 29 21 61.5 35.2 9.1 9.1 8.3 28 21 61.2 28.9 9.1		6	309,3	37,1	0,14	3,84				26
8 121,8 43,8 0,08 1,79 11,2 28 10 96,5 49,7 0,18 9,36 8,9 28 N01 11 163,0 43,2 11 4,73		1	156,5	67,6	0,28	9,84		9,1		27
9 123.4 35.8 0.08 6.32 9.4 31 10 86.5 49.7 0.18 9.36 8.9 28 N01 11 163.0 43.2 8.7 11.3 25 13 107.5 31.2 10.2 18.3 25 14 262.7 34.8 2.8 14.1 25 5 204.5 39.7 7.6 21.7 26 16 77.7 42.0 8.0 17.5 26 17 122.3 50.9 14.3 10.9 25 18 186.2 38.9 7.4 6.6 28 19 75.1 40.9 7.3 11.9 26 20 86.8 29.1 14.2 10.2 28 21 61.5 35.2 9.5 21.0 29 22 182.8 38.4 9.1 8.3 2.8 23 138.2 28.7 </th <th></th> <th>8</th> <th>121,8</th> <th>43,8</th> <th>0,08</th> <th>1,79</th> <th></th> <th>11,2</th> <th></th> <th>26</th>		8	121,8	43,8	0,08	1,79		11,2		26
10 86,5 49,7 0,18 9,36 8,9 28 N01 11 163,0 43,2 4,73 N01 11 163,0 43,2 8,7 11,3 25 12 129,9 79,5 11,7 10,9 29 13 107,5 31,2 11,7 10,9 25 14 262,7 34,8 7,6 21,7 26 15 204,5 39,7 7,6 21,7 26 17 122,3 50,9 7,4 6,6 28 18 186,2 38,9 7,4 6,6 28 20 86,8 29,1 7,3 11,9 26 20 86,8 29,1 8,3 28 28 21 16,5 35,2 9,5 21,0 29 21 12,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 11,0 26		9	123,4	35,8	0,08	6,32		9,4		31
N01 11 163.0 43.2 8,7 11,3 25 12 129.9 79.5 11.7 10.9 29 13 107.5 31.2 10.2 18.3 25 14 262.7 34.8 28.8 14.1 25 15 204.5 39.7 7.6 21.7 26 16 77.7 42.0 8.0 17.5 26 17 122.3 50.9 7.4 6.6 28 19 75.1 40.9 7.3 11.9 26 20 86.8 29.1 14.2 10.2 28 21 18.2 38.4 9.1 8.3 28 23 138.2 28.7 13.6 25 30.2 25 24 146.5 44.4 20.2 5.2 25 23 138.2 28.7 10.3 19.5 26 25 302.2 37.8 10.3 </th <th></th> <th>10</th> <th>86,5</th> <th>49,7</th> <th>0,18</th> <th>9,36</th> <th></th> <th>8,9</th> <th></th> <th>28</th>		10	86,5	49,7	0,18	9,36		8,9		28
NOT 11 105,0 43,2 6,7 11,3 25 13 107,5 31,2 11,7 10,9 29 13 107,5 31,2 10,2 18,3 25 14 262,7 34,8 2,8 14,1 25 16 77,7 42,0 8,0 17,5 26 17 122,3 50,9 14,3 10,9 25 18 186,2 38,9 7,4 6,6 28 20 86,8 29,1 14,2 10,2 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 10,3 19,5 26 24 146,5 44,4 20,2 5,2 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 24 141,1 38,1 0,08 22<	NIGA	4.4	162.0	40.0	0,11	4,73	0.7	44.0		05
12 129,9 79,3 11,7 10,9 29 14 262,7 34,8 2,8 14,1 25 15 204,5 39,7 7,6 21,7 26 16 77,7 42,0 8,0 17,5 26 17 122,3 50,9 14,3 10,9 25 18 186,2 38,9 7,4 6,6 28 19 75,1 40,9 7,3 11,9 26 20 86,8 29,1 14,2 10,2 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 13,6 26 27 24 146,5 44,4 20,2 5,2 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 24 144,5 44,4 7,5 0,10 7,28 27 27 3 119,3 43,6 0,12 36,3	NUT	10	103,0	43,Z 70 F			0,7	11,3		20 20
13 107,3 $31,2$ 10,2 16,3 23 14 262,7 $34,8$ 28 14,1 25 16 204,5 $39,7$ 7,6 21,7 26 16 77,7 $42,0$ 8,0 17,5 26 17 122,3 $50,9$ 14,3 10,9 25 18 186,2 $38,9$ 7,4 6,6 28 20 86,8 29,1 14,2 10,2 28 21 61,5 $35,2$ 9,5 21,0 29 22 182,8 $38,4$ 9,1 $8,3$ 28 23 138,2 28,7 13,6 20,2 $5,2$ 25 25 303,2 $37,8$ 0,10 $7,28$ 20,2 $5,2$ 25 24 146,5 44,4 20,2 $5,25$ 27 3 119,3 24 121,9 $57,7$ $0,34$ $9,52$ 27 29 5 16,2 29 5 16,0 28 4 44		12	129,9	79,0			10.2	10,9		29
14 $202,7$ $34,3$ 2,3 14,1 23 15 $204,5$ $39,7$ 7,6 $21,7$ 26 16 $77,7$ $42,0$ $8,0$ $17,5$ 26 17 $122,3$ $50,9$ $14,3$ $10,9$ 25 18 $186,2$ $38,9$ $7,4$ 6.6 28 20 $86,8$ $29,1$ $14,2$ $10,2$ 28 21 $61,5$ $35,2$ $9,5$ $21,0$ 29 22 $182,8$ $38,4$ $9,1$ $8,3$ 28 23 $138,2$ $28,7$ $13,6$ $-13,3$ 212 24 $146,5$ $44,4$ $20,2$ $5,2$ 25 $25,2$ $25,2$ 25 $303,2$ $37,7$ $0,34$ $9,55$ $11,0$ $-10,3$ $19,5$ 26 2 $121,9$ $57,7$ $0,34$ $9,55$ $27,7$ 23 $119,3$ $36,6$ $0,12$ $36,3$ 28 4 $44,1,1$		13	107,5	31,Z			10,2	10,3		20
13 $204,3$ $35,7$ $42,0$ $1,0$ $21,1$ 20 16 $77,7$ $42,0$ $8,0$ $17,5$ 26 18 $186,2$ $38,9$ $7,4$ $6,6$ 28 19 $75,1$ $40,9$ $7,3$ $11,9$ 26 20 $86,8$ $29,1$ $14,2$ $10,2$ 28 21 $61,5$ $35,2$ $9,5$ $21,0$ 29 22 $182,8$ $38,4$ $9,1$ 8.3 28 21 $61,5$ $35,2$ $9,5$ $21,0$ 29 22 $182,8$ $38,4$ $9,1$ 8.3 28 24 $146,5$ $44,4$ $20,2$ $5,2$ 25 3 $119,3$ $43,6$ $0,15$ $6,06$ 28 $44,11$ $38,1$ $0,08$ $5,25$ 27 3 $119,3$ $43,6$ $0,12$ $3,63$ 28 28 6 $79,4$ $43,7$ $0,17$ $3,84$ 28 28 <		14	202,7	34,0 20.7			2,0	14,1		20
10 17,1 42,0 5,0 17,3 20 17 122,3 50,9 14,3 10,9 25 18 186,2 38,9 7,4 6,6 28 19 75,1 40,9 7,3 11,9 26 20 86,8 29,1 14,2 10,2 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 13,6 24 146,5 44,4 20,2 5,2 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 27 2 121,9 57,7 0,34 9,52 27 3 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 28 4 441,1 38,1 0,08 5,25 29 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 27 3 17,5 64,3 0,41 7,91 28 <t< th=""><th></th><th>10</th><th>204,5</th><th>39,7 42.0</th><th></th><th></th><th>7,0</th><th>21,7</th><th></th><th>20</th></t<>		10	204,5	39,7 42.0			7,0	21,7		20
17 122.3 30.9 7.4 6,6 28 19 75,1 40,9 7,3 11,9 26 20 86,8 29,1 14,2 10,2 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 13,6 25 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 2 129,9 40,9 9,5 11,0 27 3 119,3 43,6 0,15 6,6 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 28 7 75,3 67,6 0,22 7,17 28 28 7 75,3 67,6 0,22 7,17 28 25 0 82,1 <th></th> <th>10</th> <th>100.0</th> <th>42,0 50.0</th> <th></th> <th></th> <th>0,0</th> <th>17,5</th> <th></th> <th>20</th>		10	100.0	42,0 50.0			0,0	17,5		20
10 100,2 30,3 7,3 11,9 26 19 75,1 40,9 14,2 10,2 28 21 61,5 35,2 9,5 21,0 29 22 182,8 38,4 9,1 8,3 28 23 138,2 28,7 13,6 20,2 5,2 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 10,3 19,5 26 26 27 27 27 3 119,3 43,6 0,10 7,28 27 3 11 104,4 47,5 0,10 7,28 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 28 6 79,4 43,7 0,17 3,84 28 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 29 59 27,6 </th <th></th> <th>10</th> <th>122,3</th> <th>38.0</th> <th></th> <th></th> <th>74,3</th> <th>10,9</th> <th></th> <th>20</th>		10	122,3	38.0			74,3	10,9		20
19 $7.3, 1$ 40.3 $7.3, 1$ $7.3, $		10	75 1	30,9 40.0			7,4	0,0		20
20 $60,6$ $29,1$ $14,2$ $10,2$ 20 20 21 $61,5$ $35,2$ $9,1$ $8,3$ 28 23 $138,2$ $28,7$ $13,6$ 29 24 $146,5$ $44,4$ $20,2$ $5,2$ 25 25 $303,2$ $37,8$ $10,3$ $19,5$ 26 2 $121,9$ $57,7$ $0,34$ $9,52$ 27 3 $119,3$ $43,6$ $0,10$ $7,28$ 27 3 $119,3$ $43,6$ $0,12$ $3,63$ 28 28 4 $441,1$ $38,1$ $0,08$ $5,25$ 29 28 4 $441,7$ $0,17$ $3,63$ 28 28 6 $79,4$ $43,7$ $0,17$ $3,63$ 28 28 6 $79,4$ $43,7$ $0,112$ $10,99$ $27,6$ 30 7 $75,3$ $67,6$ $0,22$ $7,77$ 29 30 10 </th <th></th> <th>19</th> <th>75,1</th> <th>40,9</th> <th></th> <th></th> <th>1/3</th> <th>10.2</th> <th></th> <th>20</th>		19	75,1	40,9			1/3	10.2		20
21 $01, 3$ $50, 2$ $50, 3$ $21, 0$ 23 22 $138, 2$ $28, 7$ 13, 6 13, 6 24 $146, 5$ $44, 4$ $20, 2$ $5, 2$ 25 25 $303, 2$ $37, 8$ 10, 3 $19, 5$ 26 129,9 $40, 9$ 10, 3 $19, 5$ 26 N04 1 $104, 4$ $47, 5$ $0, 10$ $7, 28$ 27 3 $119, 3$ $43, 6$ $0, 15$ $6, 06$ 28 27 3 $119, 3$ $43, 6$ $0, 15$ $6, 06$ 28 28 4 $441, 1$ $38, 1$ $0, 08$ $5, 25$ 29 28 5 $162, 2$ $49, 8$ $0, 12$ 363 28 28 6 $79, 4$ $43, 7$ $0, 17$ $3, 84$ 28 28 7 $75, 3$ $67, 6$ $0, 22$ $7, 17$ 29 25 8 $137, 5$ $64, 3$ $0, 41$ $7, 9$ $13, 4$ 27		20	61 5	29,1			0.5	21.0		20
223 138,2 228,7 13,6 24 146,5 44,4 20,2 5,2 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 129,9 40,9 9,5 11,0 N04 1 104,4 47,5 0,10 7,28 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 28 4 441,1 38,1 0,08 5,25 27 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 28 6 79,4 43,7 0,17 3,84 28 28 7 75,3 67,6 0,22 7,17 29 8 137,5 64,3 0,41 7,91 28 9 60,0 35,6 0,09 4,31 25 30 10 82,1 40,2 0,12 10,99 30 30 11 154,5 40,8 10,9 21,1 29 30 13 57,1 <		21	182.8	30,2 38 /			9,5	21,0		29
24 146,5 26,7 10,3 19,5 25 25 303,2 37,8 10,3 19,5 26 129,9 40,9 9,5 11,0 N04 1 104,4 47,5 0,10 7,28 26 2 121,9 57,7 0,34 9,52 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 4 441,1 38,1 0,08 5,25 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 6 79,4 43,7 0,17 3,84 28 7 75,3 67,6 0,22 7,17 29 8 137,5 64,3 0,41 7,91 28 9 60,0 35,6 0,09 4,31 25 10 82,1 40,2 0,12 10,99 30 0,13 6,62 11 154,5 40,8 5,9 27,6 30 12 123,3		22	138.2	28 7			5,1	13.6		20
24 $130,3$ $14,7$ $10,3$ $19,5$ 26 $129,9$ $40,9$ $9,5$ $11,0$ N041 $104,4$ $47,5$ $0,10$ $7,28$ 26 2 $121,9$ $57,7$ $0,34$ $9,52$ 27 3 $119,3$ $43,6$ $0,15$ $6,06$ 28 4 $441,1$ $38,1$ $0,08$ $5,25$ 29 5 $162,2$ $49,8$ $0,12$ $3,63$ 28 6 $79,4$ $43,7$ $0,17$ $3,84$ 28 7 $75,3$ $67,6$ $0,22$ $7,17$ 29 8 $137,5$ $64,3$ $0,41$ $7,91$ 28 9 $60,0$ $35,6$ $0,09$ $4,31$ 25 10 $82,1$ $40,2$ $0,12$ $10,99$ 30 N0411 $154,5$ $40,8$ $9,8$ $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ $9,8$ $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ $9,8$ $13,4$ 27 14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,1$ $12,1$ $12,4$ 25 20 $66,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,$		20	1/6 5	20,7 11 1			20.2	5.2		25
100 10,5 <th< th=""><th></th><th>24 25</th><th>303.2</th><th>37.8</th><th></th><th></th><th>10.3</th><th>19.5</th><th></th><th>20</th></th<>		2 4 25	303.2	37.8			10.3	19.5		20
N04 1 104,4 47,5 0,10 7,28 24 24 26 2 121,9 57,7 0,34 9,52 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 28 6 79,4 43,7 0,17 3,84 28 7 75,3 67,6 0,22 7,7 29 8 137,5 64,3 0,41 7,91 28 9 60,0 35,6 0,09 4,31 25 30 25 10 82,1 40,2 0,12 10,99 30 30 25 10 30 25 30 31 30		20	129.9	40.9			9.5	11.0		
No. 1 121,9 57,7 0,34 9,52 27 3 119,3 43,6 0,15 6,06 28 4 441,1 38,1 0,08 5,25 29 5 162,2 49,8 0,12 3,63 28 6 79,4 43,7 0,17 3,84 28 7 75,3 67,6 0,22 7,17 29 8 137,5 64,3 0,41 7,91 28 9 60,0 35,6 0,09 4,31 25 10 82,1 40,2 0,12 10,99 30 O,13 6,62 N04 11 154,5 40,8 9,8 13,4 27 13 57,1 31,8 9,8 13,4 27 13 57,1 31,8 9,8 13,4 27 13 57,1 31,8 9,8 13,4 27 14 173,2 52,0 10,0 11,6 28 15 1	N04	1	104.4	47.5	0.10	7.28	,	,		26
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		2	121,9	57,7	0,34	9,52				27
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		3	119,3	43,6	0,15	6,06				28
5162,249,80,123,6328679,443,70,173,8428775,367,60,227,17298137,564,30,417,9128960,035,60,094,31251082,140,20,1210,99300,136,62N0411154,540,89,813,4271357,131,89,813,4271357,131,810,921,12914173,252,010,011,62815135,450,67,915,52916116,136,012,112,4251797,040,44,019,22619132,844,04,019,22619132,844,04,012,910,22722290,753,36,611,72723201,056,111,717,02924170,432,28,818,33025214,536,78,616,229		4	441,1	38,1	0,08	5,25				29
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		5	162,2	49,8	0,12	3,63				28
775,367,6 $0,22$ 7,17298137,564,3 $0,41$ 7,9128960,035,6 $0,09$ 4,312510 $82,1$ $40,2$ $0,12$ $10,99$ 30 0,136,62N04 11154,5 $40,8$ 5,9 $27,6$ 30 12123,351,89,813,4271357,131,89,813,4271357,131,810,921,12914173,252,010,011,62815135,450,67,915,52916116,136,012,112,4251797,040,44,019,22619132,844,08,225,0252060,640,215,813,62621135,540,312,910,22722290,753,36,611,72723201,056,111,717,02924170,432,28,818,33025214,536,78,616,229		6	79,4	43,7	0,17	3,84				28
8137,5 $64,3$ $0,41$ $7,91$ 289 $60,0$ $35,6$ $0,09$ $4,31$ 2510 $82,1$ $40,2$ $0,12$ $10,99$ 30 0,13 $6,62$ N0411 $154,5$ $40,8$ 5,9 $27,6$ 30 12 $123,3$ $51,8$ 9,8 $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ $10,9$ $21,1$ 29 14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ $27,7$ 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,70$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $8,8,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29		7	75,3	67,6	0,22	7,17				29
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		8	137,5	64,3	0,41	7,91				28
10 $82,1$ $40,2$ $0,12$ $10,99$ 30N0411154,5 $40,8$ $5,9$ $27,6$ 30 12123,3 $51,8$ 9,8 $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ 10,9 $21,1$ 29 14 $173,2$ $52,0$ 10,0 $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ 12,1 $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ 14,4 $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ 4,0 $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ 15,8 $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ 12,9 $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ 6,6 $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ 11,7 $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $9,76$ $15,46$ $15,46$		9	60,0	35,6	0,09	4,31				25
N0411154,540,8 $5,9$ 27,63012123,351,89,813,4271357,131,810,921,12914173,252,010,011,62815135,450,67,915,52916116,136,012,112,4251797,040,414,411,63118178,450,14,019,22619132,844,08,225,0252060,640,215,813,62621135,540,312,910,22722290,753,36,611,72723201,056,111,717,02924170,432,28,818,33025214,536,79,7615,4645,46		10	82,1	40,2	0,12	10,99				30
N0411154,5 $40,8$ $5,9$ $27,6$ 30 12123,3 $51,8$ $9,8$ $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ $10,9$ $21,1$ 29 14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29					0,13	6,62				
12 $123,3$ $51,8$ $9,8$ $13,4$ 27 13 $57,1$ $31,8$ $10,9$ $21,1$ 29 14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29	N04	11	154,5	40,8			5,9	27,6		30
13 $57,1$ $31,8$ $10,9$ $21,1$ 29 14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29		12	123,3	51,8			9,8	13,4		27
14 $173,2$ $52,0$ $10,0$ $11,6$ 28 15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29		13	57,1	31,8			10,9	21,1		29
15 $135,4$ $50,6$ $7,9$ $15,5$ 29 16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29		14	173,2	52,0			10,0	11,6		28
16 $116,1$ $36,0$ $12,1$ $12,4$ 25 17 $97,0$ $40,4$ $14,4$ $11,6$ 31 18 $178,4$ $50,1$ $4,0$ $19,2$ 26 19 $132,8$ $44,0$ $8,2$ $25,0$ 25 20 $60,6$ $40,2$ $15,8$ $13,6$ 26 21 $135,5$ $40,3$ $12,9$ $10,2$ 27 22 $290,7$ $53,3$ $6,6$ $11,7$ 27 23 $201,0$ $56,1$ $11,7$ $17,0$ 29 24 $170,4$ $32,2$ $8,8$ $18,3$ 30 25 $214,5$ $36,7$ $8,6$ $16,2$ 29		15	135,4	50,6			7,9	15,5		29
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		16	116,1	36,0			12,1	12,4		25
18 178,4 50,1 4,0 19,2 26 19 132,8 44,0 8,2 25,0 25 20 60,6 40,2 15,8 13,6 26 21 135,5 40,3 12,9 10,2 27 22 290,7 53,3 6,6 11,7 27 23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29		17	97,0	40,4			14,4	11,6		31
19 132,8 44,0 8,2 25,0 25 20 60,6 40,2 15,8 13,6 26 21 135,5 40,3 12,9 10,2 27 22 290,7 53,3 6,6 11,7 27 23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132.8 43.7 9.76 15.46		18	178,4	50,1			4,0	19,2		26
20 60,6 40,2 15,8 13,6 26 21 135,5 40,3 12,9 10,2 27 22 290,7 53,3 6,6 11,7 27 23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132,8 43,7 9,76 15,46 15,46		19	132,8	44,0			8,2	25,0		25
21 135,5 40,3 12,9 10,2 27 22 290,7 53,3 6,6 11,7 27 23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132,8 43,7 9,76 15,46 46		20	60,6	40,2			15,8	13,6		26
22 290,7 53,3 6,6 11,7 27 23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132.8 43.7 9.76 15.46		21	135,5	40,3			12,9	10,2		21
23 201,0 56,1 11,7 17,0 29 24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132.8 43.7 9.76 15.46		22	290,7	53,3			6,6	11,7		27
24 170,4 32,2 8,8 18,3 30 25 214,5 36,7 8,6 16,2 29 132.8 43.7 9.76 15.46		23	201,0	56,1				17,0		29
20 214,0 30,7 8,0 10,2 29 132.8 43.7 9.76 15.46		∠4 25	170,4	32,2 26 7			0,0 0,0	10,3		3U 20
		20	132.8	43.7			9.76	<u>15,2</u>		23

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Alter	Länge
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]	[%]	[%]		[cm]
N06	1	309,5	33,2	0,16	11,08				26
	2	727,7	23,3	0,02	1,24				29
	3	161,0	72,2	0,22	14,03				30
	4	312,2	41,7	0,09	8,53				27
	5	485,3	23,0	0,46	12,41				27
	6	203,1	54,5	0,34	16,42				27
	7	336,0	46,3	0,22	19,78				27
	8	222,4	50,9	0,20	5,56				26
	9	193,5	44,5	0,15	8,07				25
	10	193,3	59,3	0,10					26
				0,18	11,08				
N06	11	462,5	38,2			4,7	27,8		26
	12	493,6	48,9				23,9		
	13	159,9	42,3				36,7		
	14	176,6	54,8				36,8		
	15	370,3	42,3				29,8		
	16	805,9	56,5			4,2	25,4		25
	17	219,6	45,0			5,5	32,1		25
	18	141,5	45,5				38,4		
	19	395,2	51,5			5,9	25,7		26
	20	351,4	24,2			3,0	17,0		25
	21	190,5	60,9			8,2	34,0		25
	22	164,4	53,0			5,3	30,9		25
	23	346,3	30,7			3,7	34,4		25
	24	351,3	40,4			5,3	35,4		25
	25	293,7	47,4			4,7	47,6		27
		309,5	45,5			5,00	32,10		
G08	1	114,4	66,9	0,49	10,34				31
	2	119,3	73,7	0,46	9,22				29
	3	121,0	42,9	0,32	8,29				30
	4	167,4	69,4	0,27	8,10				27
	5	459,1	43,9						28
	6	316,1	30,9	0,63	6,69				26
	7	436,4	70,1	1,30	27,09				25
	8	182,0	74,9	0,76	8,30				25
	9	413,6	62,4	0,84	6,95				32
	10	166,9	52,5	0,31	3,98				26
		1017		0,49	8,29				
G08	11	194,7	56,3			0.7	22,9		00
	12	187,7	48,0			3,7	23,3		29
	13	161,2	42,3			9,0	21,3		28
	14	62,8	50,8			6,0	27,5		29
	15	245,7	6U,Z			6,6	13,3		20
	16	109,2	67,3			4,0	37,1		27
	17	218,7	49,6			6,3	10,2		28
	18	119,0	53,2			3,9	24,1 45 C		20 07
	19	221,4	41,9 27 7			4,4	0,01		21
	20	∠40,3	31,1			4,ð	∠ŏ,4		20 07
	21	09,1	20,5 40 0			3,9	∠y,/ 22.0		21
	22	90,3 250.0	40,3 65 0			0,0	∠∠,U 22.2		21 25
	∠3 24	200,2	00,0 51 /			2,0 6.0	22,2 16 2		20 20
	24 25	390,9 220 1	04,4 52 6			0,9	10,3		∠0 25
	20	220,4 187.7	53.6			5,0 5.00	22.22		20

Variablenpaar	r _s	р
MT-1-Gehalte – Zn-Gehalte	0.565	<0.001
MT-1-Gehalte – Cd-Gehalte	0.317	0.017
MT-1-Gehalte – MT-2-Gehalte	0.703	<0.001
MT-2-Gehalte – Zn-Gehalte	0.477	<0.001
MT-2-Gehalte – Cd-Gehalte	0.437	0.001
GSI - Temperatur	-0.517	<0.001
Lipidgehalt - Temperatur	0.718	<0.001
GSI - Lipidgehalt	-0.693	<0.001

Tab. A-11: Spearman-Korrelation für Variablen der Freilandprobenahme WH 179. r_s : Spearman-
Rangkorrelationskoeffizient; p: Signifikanzniveau.

8.6 Daten der Freilandausfahrt WH 185

Tab. A-12: Daten der Freilandprobenahme WH 185. Einzelwerte der Fische jeder Station mit Median (fett dargestellt); Fortsetzung der Tabelle auf den nachfolgenden Seiten.

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Alter	Länge
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[%]		[cm]
N01	1	115,2	27,2	0,03	2,66				27
	2	134,5	29,4	0,11	1,34				27
	3	274,6	34,2	0,08	2,55				26
	4	138,1	27,1	0,02	1,07				27
	5	67,7	26,8	0,10	1,48				25
	6	165,4	31,3	0,23	2,05				27
	7	273,6	24,5	0,09	0,81				25
	8	189,2	33,2	0,41	4,78				26
	9	115,7	37,1	0,29	3,36				25
	10	107,3	32	0,17	2,22				26
				0,10	2,13				
N01	11	269,1	37,0			1,20	7,2		27
	12	93,1	33,9			1,23	8		25
	13	178,7	32,4			8,80	8		26
	14	73,6	31,7			5,66	8,4		28
	15	55,0	24,3			1,11	8,7		28
	16	91,7	30,4			0,98	19,9		27
	17	111,0	33,4			9,73	3,7		25
	18	128,9	27,8			5,97	4,3		32
	19	56,6	24,4			8,12	6,3		25
	20	316,3	41,9			1,85	4,3		27
	21	331,5	25,4			6,07	7,1		25
	22	151,9	28,6			1,94	15		26
	23	330,9	31,6			1,90	8,8		26
	24	75,1	33,3			3,28	6,5		26
	25	147,1	31,8			7,02	6,3		26
		134,5	31,6			3,28	7,2		
N04	16	115,7	35,7	0,08	1,75				25
	17	254,6	48,2	0,01	1,03				27
	18	272,5	35,6	0,02	1,37				28
	19	432,9	28,5	0,10	0,65				25
	20	79,6	22,3	0,01	0,28				25
	21	188,7	24,6	0,01	0,28				28
	22	657,7	30,6	0,02	0,65				28
	23	128,9		0,03	1,46				25
	24	415,0		0,14	3,98				27
	25	369,2		0,03	0,98				32
				0,03	1,00				
N04	1	91,6	35,7			1,14	16,1		26
	2	147,7	49,4			2,32	4,8		28
	3	103,1	23,1			4,58	2,7		30
	4	43,8	46,7			1,79	2,8		28
	5	244,3	29,2			5,46	3,3		27
	6	81,6	51,3			1,79	5,8		28
	7	356,5	37,9			4,60	8,4		26
	8	275,7	32,4			6,71	3,8		28
	9	134,7	40,5			1,71	8,3		27
	10	330,8	43,0			1,41	6,2		28
	11	84,6	31,2			4,70	3,3		30
	12	167,3	25,9			1,08	18,3		26
	13	336,3	26,0			3,08	4,7		26
	14	469,2	61,9			1,00	20,2		26
	15	217.3	29.3			2,13	4,2		28
	-	217,3	34,0			2,13	4,8		-

Station	Fisch	Cd [µa/ka]	Zn [ma/ka]	MT-1 [µa/ma]	MT-2 [µa/ma]	GSI	Fettgehalt [%]	Alter	Länge [cm]
N06	1	157.6	26.1	0.04	1.25				25
	2	416,4	41,3	0,10	7,27				25
	3	469,8	29,9	0,02	1,31				25
	4	345,9	45,4	0,19	2,45				26
	5	1179,9	35,7	0,22	3,28				27
	6	389,2	18,9	0,08	0,58				30
	7	1318,9	35,1	0,25	3,25				29
	8	1174,1	42,6	0,29	6,18				27
	9	355,1	23,4	0,11	0,97				27
	10	1451,5	30	0,07	1,40				25
				0,10	1,92				
N06	11	525,8	28,4			5,95	4,4		27
	12	446,0	43,7			5,95	3,1		28
	13	282,9	37,9			2,61	6,7		31
	14	472,1	34,1			5,88	9,6		27
	15	6/1,8	41,8			4,84	6,6		25
	16	372,3	38,3			6,05	8,3		26
	17	301,5	34,0			2,06	3,2		21
	10	430,5	52,2			7,00	5,4 10.4		20 25
	19	103,Z	31,1 20.1			5,33	10,4		20 25
	20	730,5 925 A	39,1 20 7			5,00	4,0		20
	21	020,4 462.0	30,7 47 5			3,09	4,7		20
	22	402,0	47,5 38.0			5,07	1		20 25
	23	375.0	30,0 37 0			7 28	- 3 0		20
	25	322.7	29.9			4 23	4.6		25
	-	446,0	37,0			5,33	4,7		-
G08	1	460,4	44,9	0,13	0,45				25
	2	192,7	55,8	0,62	5,72				29
	3	152,9	45,2	0,05	0,66				24
	4	104,1	39	0,30	5,71				25
	5	124,1	42,2	0,45	4,51				24
	6	144,2	33,5	0,09	2,69				26
	7	519,2	37,9	0,09	1,22				25
	8	390,8	39,9	0,48	3,60				25
	9	364,4	56,8	0,10	1,54				23
	10	310,4	37,7	0,17	3,03				23
C09	11	802.0	01.8	0,15	2,80	1 1 2	16.1		23
600	12	520.7	57.4			4 48	67		23
	13	50.3	61.3			1 04	94		23
	14	163.6	87.0			1.00	21.7		28
	15	611.1	82.9			1.04	9.4		24
	16	493,8	51,7			0,87	28,8		26
	17	236,8	40,1			1,14	6,7		28
	18	262,4	40,2			0,82	13		25
	19	423,4	45,3			3,08	8,8		26
	20	250,8	28,6			0,96	25,7		27
	21	61,5	27,1			0,57	43,1		28
	22	370,4	37,0			2,81	5,5		25
	23	129,4	38,5			0,88			25
	24	319,2	32,4			1,22	16		28
	25	619,4	36,9			1,00	2,5		25
		310,4	40,2			1,04	11,2		

Variablenpaar	r _s	р
MT-1-Gehalte – Zn-Gehalte	0.444	0.006
MT-1-Gehalte – MT-2-Gehalte	0.715	<0.001
MT-2-Gehalte – Zn-Gehalte	0.506	0.001
Zn-Gehalte - Temperatur	0.271	0.008
GSI - Lipidgehalt	-0.547	<0.001
GSI - Temperatur	-0.345	0.007

Tab. A-13: Spearman-Korrelation für Variablen der Freilandprobenahme WH 185. r_s: Spearman-Rangkorrelationskoeffizient; p: Signifikanzniveau.

Anhang

8.7 Daten der Freilandausfahrt WH 191

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Länge	Alter
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[%]	[cm]	
B01	1	143,3	43,1	0,03	1,38			28	4
	2	91,3	63,9	0,09	0,72		24,2	36	6
	3	94,0	35,7	0,03	1,95		19,8	29	5
	4	263,0	35,4	0,02	0,97		29,8	31	5
	5	155,1	59,4	0,06	2,05		24,3	33	5
	6	54,4	33,4	0,03	0,82		25,9	28	4
	1	43,0	32,6	0,10	2,23		30,1	32	5
	8	64,2	34,5	0,03	2,59		21,3	31	5
	9	388,1	31,1	0,01	1,33		21,5	28	4
	10	38,3	39,7	0,03	1,14		35,8	34	5
B01	11	62.2	22.1	0,03	1,35	2.01	32.8	27	<u>3</u>
501	12	60.6	28.1			2,01	28.9	25	4
	13	178.3	37.9			2,00	16.0	28	2
	14	107.8	32.2			3.92	24.0	25	2
	15	179.6	35.0			0.92	18.8	25	2
	16	217.6	36.8			1.8	24.4	25	7
	17	385.4	56.8			5.59	22.9	37	4
	18	73.9	55.9			1.11	29.0	28	3
	19	35.7	20.9			4.58	17.1	26	3
	20	74.4	38.5			1.67	19.5	27	4
	21	30,0	27,5			3,47	36.3	31	5
	22	28,4	13,0			2,84	30,1	31	5
	23	80,1	27,2			3,77	30,6	34	6
	24	236,1	43,4			7,45	25,3	34	5
	25	22,6	23,9			3,57	16,7	31	
		80,1	35,0			2,9	24,3		
B12	1	60,9	44,8	0,14	3,75		40,9	25	3
	2	45,9	60,4	0,05	2,22			23	3
	3	84,0	37,1	0,01	0,20			23	3
	4	40,6	31,3	0,12	0,69		41,9	24	3
	5	92,1	22,0	0,30	0,49			23	3
	6	84,6	69,7	0,06	0,83			22	3
	7	42,5	33,3	0,01	0,06			22	2
	8	124,2	83,2	0,13	0,29		29,3	24	4
	9	62,3	38,2	0,05	0,36		34,7	24	4
	10	70,7	50,1	0,03	0,10		21,9	24	4
B12	11	53.5	21.9	0,05	0,42	1 15	24.3	23	4
	12	76.7	30.5			0.78	22,6	23	4
	13	81.0	50 4			2.92	35.6	26	4
	14	40.1	30.9			1.86	42.0	23	•
	15	79.4	27.8			1.93	28.7	22	2
	16	37,3	27,1			3,28	19,9	22	3
	17	61,4	34,8			0,88	24,9	22	2
	18	72,2	39,5			4,58	17,1	22	2
	19	85,5	38,1			1,32	31,2	22	3
	20	91,1	19,0			1,14	31,5	22	2
	21	86,3	21,7			1,01	15,6	22	2
	22	71,0	28,9			1,32	26,5	22	2
	23	45,1	46,8			5,81	26,2	26	4
	24	51,1	37,3			4,46	14,1	26	4
	25	44,5	36,9			1,67	39	26	4
1		710	36.9			17	27.6		

Tab. A-14: Daten der Freilandprobenahme WH 191. Einzelwerte der Fische jeder Station mit Median (fett dargestellt); Altersangabe in Jahren. Fortsetzung der Tabelle auf den folgenden Seiten.

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Länge	Alter
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[%]	[cm]	
N01	1	292,6	60,3	0,05	3,00			27	6
	2	115,0	41,9		0,57			25	6
	3	114,6	58,4	0,04	1,22			27	6
	4	87,9	37,3	0,02	1,78		27,1	26	4
	5	56,3	42,8	0,13	3,16		13,1	26	4
	6	181,2	44,1	0,04	2,44		27,3	27	6
	7	97,6	43,7	0,09	2,05			25	
	8	98,9	82,8	0,34	7,10			25	6
	9	204,4	54,0	0,14	2,47			26	6
	10	108,4	43,2	0,32	2,63			25	5
				0,09	2,45				
N01	11	51,2	56,0			10,8		25	5
	12	130,1	45,3			5,22	18,3	25	4
	13	68,5	40,9			13,4	14,3	27	6
	14	189,9	55,4			3,2	25,6	25	5
	15	94,1	54,7			8,66	22,5	25	4
	16	186,7	68,3			7,58	22,5	25	5
	17	60,1	54,9			6,94	22,2	25	4
	18	78,8	55,7			5,31	38,8	29	6
	19	137,3	34,5			5,57	25,5	25	5
	20	144,0	49,0			4,55	27,2	26	4
	21	172,9	38,4			7,81	25,6	26	5
	22	294,5	47,3			4,34	22,8	25	6
	23	55,5	55,2			7,82	35,2	26	4
	24	90,1	49,3			7,35	20,8	26	5
	25	163,2	36,1			2,6	24,4	25	5
		114,6	49,0			6,9	24,4		
N04	1	23,1	54,8	0,05	0,59		24,8	30	6
	2	80,5	45,8	0,04	0,49		34,4	25	4
	3	69,9	58,0	0,23	0,53		18,8	32	7
	4	72,3		0,12	0,93		27,5	26	5
	5	174,8		0,15	3,32		30,8	26	5
	6	161,7					21,0	26	5
	7	83,0					28,3	30	6
	8	63,0		0,02	0,62		19,8	27	5
	9	21,9		0,03	3,10		27,6	29	5
	10	114,9		0,08	3,91		28,5	31	6
				0,07	0,77				
N04	11	100,8				13,78	10,7	29	5
	12	113,2				7,45	22,3	27	5
	13	58,8				11,49	13,9	27	5
	14	135,0				5,76	24,8	26	4
	15	72,7				7,76	24,5	31	7
	16	145,3	48,4			4,19	28,7	29	6
	17	171,9	57,0			6,08	22,2	26	5
	18	135,4	60,4			6,25	22,3	29	8
	19	157,9	67,7			5,65	19,3	28	6
	20	61,2	41,5			3,6	44,4	26	5
	21	494,0	45,0			2,71	29,2	29	8
	22	89,7	56,6			4	22,7	25	4
	23	125,8	28,0			3,72	30,6	25	5
	24	404,5	87,6			5,03	22,2	25	5
	25	111,0	52,9			8,71	18,9	28	5
		111,0	54,8			5,8	24,5		

Station	Fisch	Cd	Zn	MT-1	MT-2	GSI	Fettgehalt	Länge	Alter
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]		[%]	[cm]	
N06	1	71,6	53,0	0,01	5,42			25	6
	2	139,8	61,0	0,09	4,55			25	5
	3	287,2	40,6	0,01	2,39			27	5
	4	588,7	43,0	0,27	4,60			26	6
	5	90,2	28,6	0,48	4,69		39,3	27	6
	6	105,5	53,3	0,10	5,57			25	5
	7	107,3	37,6	0,14	4,15			26	5
	8	323,1	47,7	0,18	4,01			27	6
	9	38,1	36,5	0,42	9,56		48,4	26	5
	10	453,6	75,7	0,17	9,76		18,2	29	7
				0,16	4,64				
N06	11	249,9	40,4			6,05	26,9	27	6
	12	312,1	44,4			3,95	21,2	26	5
	13	71,5	37,9			3,11	40,7	27	6
	14	161,2	64,2			4,87	36,6	26	5
	15	277,5	46,9			2,88	32,7	28	7
	16	67,8	45,2			3,31	46,3	28	6
	17	701,6	43,0			5,84	29,3	27	6
	18	162,4	42,4			4,9	32,1	25	5
	19	1050,0	56,5			5,88	27,8	25	5
	20	77,0	42,2			5,22	48,9	28	6
	21	230,2	45,6			3,72	31,2	25	
	22	75,0	35,6			4,04	43,4	30	6
	23	114,2	55,1			5,88	32,3	26	4
	24	166,3	41,7			6,77	36,8	26	6
	25	90,1	52,9			5,23	34,3	26	5
		161,2	44,4			4,9	33,5		
G08	1	734,4	56,3	0,26	4,80			29	6
	2	1693.8	43,7	0,38	4,07			29	5
	3	484,2	58,2	0,85	13,17			26	4
	4	252,3	68,3	0,26	5,90		7,6	30	5
	5	869,3	77,7	0,63	9,60			27	5
	6	482,6	36,7	0,07	1,03			26	5
	7	174,0	52,8	0,41	8,53			25	5
	8	542,6	60,3	0,43	6,39			28	5
	9	170,8	62,2	0,31	6,59		22,1	28	6
	10	81,1	76,0	0,92	8,25			24	3
				0,39	6,49				
G08	11	523,8	63,4			4,61	15,5	31	7
	12	457,8	72,4			4,96	38,0	27	6
	13	371,0	54,8			1,45	32,0	30	6
	14	489,8	77,2			3,74	36,4	27	5
	15	384,5	35,7			2,6	34,7	29	6
	16	870,8	79,8			2,15	24,3	27	5
	17	632,8	76,0			5,79	27,9	25	4
	18	348,2	49,3			3,27	23,9	29	4
	19	88,9	70,1			3,14	28,2	26	4
	20	736,6	33,6				15,7		6
	21	110,9	59,3			3,42	32,1	25	4
	22	624,6	87,1			5,66	30,6	25	5
	23	580,1	45,5			2,3	25,5	33	8
	24	155,1	54,3			6,16	39,3	33	
	25	269,3	42,3			3,25	16,1	29	
		482,6	59,3			3,3	27,9		

Variablenpaar	r _s	р
MT-1-Gehalt – Cd-Gehalt	0.342	0.009
MT-1-Gehalt – Zn-Gehalt	0.357	0.009
MT-1-Gehalt - Temperatur	0.590	<0.001
MT-1-Gehalt – MT-2-Gehalt	0.632	<0.001
MT-2-Gehalt – Cd-Gehalt	0.423	0.001
MT-2-Gehalt – Zn-Gehalt	0.371	0.006
MT-2-Gehalt - Alter	0.342	0.01
MT-2-Gehalt - Temperatur	0.663	<0.001
Cd-Gehalt - Alter	0.377	<0.001
Cd-Gehalt - Temperatur	0.528	<0.001
Zn-Gehalt - Alter	0.318	<0.001
Zn-Gehalt - Temperatur	0.499	<0.001
Zn-Gehalte - GSI	0.488	<0.001
Temperatur - GSI	0.244	0.02

Tab. A-1	5: Spearman-Korrelation	für	Variablen	der	Freiland probenahme	WH	191.	r _s :	Spearman-
Rangkorre	lationskoeffizient; p: Sig	nifik	anzniveau.						

8.8 Daten des Jahresganges

Monat	Probe	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Lipidgehalt	Temp.	$\Delta T emp.$
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]	[%]	[°C]	[°C/Monat]
Feb	1	40,1	35,5	0,260	5,550		5,61	0
Feb	2						5,61	0
Feb	3	83,6	29,3	0,480	2,400		5,61	0
Feb	4						5,61	0
Feb	5	349,8	25,8	0,780	1,650		5,61	0
Feb	6	120,9	23,2	0,180	2,550		5,61	0
Feb	7	105,0	29,6	0,230	1,300		5,61	0
Feb	8	86,9	27,6	0,350	1,940		5,61	0
Feb	9						5,61	0
Feb	10	90,6	28,3	0,450	2,440		5,61	0
		90,6	28,3	0,350	2,400		5,61	0,00
Mrz	1	68,4	23,3	0,240	1,070	6,6	5,73	0,17
Mrz	2	70,2	24,3	0,330	2,160	7,6	5,73	0,17
Mrz	3			0,320	0,780	4,5	5,73	0,17
Mrz	4	110,7	37,2			6,0	5,73	0,17
Mrz	5	98,2	26,7	0,360	1,410	6,3	5,73	0,17
Mrz	6	92,4	33,3	,	0,450	6,5	5,73	0,17
Mrz	7					12,7	5,73	0,17
Mrz	8	58,9	19,0	0,260	1,670	12,4	5,73	0,17
Mrz	9			0,530	0,810	9,0	5,73	0,17
Mrz	10			0,860	1,820	8,2	5,73	0,17
		81,3	25,5	0,330	1,240	7,1	5,73	0,17
Apr	1	48,7	12,4	0,180	0,310		7,45	1,65
Apr	2	157,6	26,9	0,450	1,850		7,45	1,65
Apr	3			0,430	1,590		7,45	1,65
Apr	4	166,0	22,9	0,790	1,630		7,45	1,65
Apr	5		14,2	0,340	0,340		7,45	1,65
Apr	6	97,7	28,2	0,520	3,090		7,45	1,65
Apr	7	171,6	19,5	0,380	2,980		7,45	1,65
Apr	8	76,3	18,0				7,45	1,65
Apr	9			0,230	1,250		7,45	1,65
Apr	10	98,8	22,0				7,45	1,65
		98,8	20,8	0,405	1,610		7,45	1,65
Mai	1	37,9	15,6	0,130	1,400	23,3	9,94	2,27
Mai	2	83,5	19,3	0,130	1,740	16,0	9,94	2,27
Mai	3	79,4	15,0	0,100	0,880	6,4	9,94	2,27
Mai	4	41,7	17,2	0,240	2,630	9,1	9,94	2,27
Mai	5	65,9	27,8	0,140	1,710	9,1	9,94	2,27
Mai	6	193,8	26,4	0,330	5,840		9,94	2,27
Mai	7	60,2	27,3	0,260	2,740		9,94	2,27
Mai	8	113,5	26,3	0,140	2,000	8,4	9,94	2,27
Mai	9	41,2	33,7	0,090	1,710		9,94	2,27
Mai	10	103,7	28,4	0,410	2,800	9,1	9,94	2,27
		72.7	26.4	0.140	1.870	9.1	9.94	2.27

Tab. A-16: Daten der saisonalen Untersuchungen von Februar 1998 bis Januar 1999; Einzeldaten der Fische eines Monats mit Median (fett dargestellt); Δ Temp.: Temperaturdifferenz zum vorherigen Monat (im ersten Monat gleich null gesetzt); Fortsetzung der Tabelle auf den nachfolgenden Seiten.

Monat	Probe	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Lipidgehalt	Temp.	ΔT emp.
		[µg/kg]	[mg/kg]	[µg/mg]	[µg/mg]	[%]	[°C]	[°C/Monat]
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
Jun							11,52	1,82
							11,52	1,82
Jul	1	68,9	23,0	0,350	2,800	32,4	14,7	3,16
Jul	2	50,9	23,7	1,220	3,910		14,7	3,16
Jul	3	103,8	36,3	0,810	4,270		14,7	3,16
Jul	4	82,1	32,0	1,310	4,730		14,7	3,16
Jul	5	112,3	28,4	0,230	4,020		14,7	3,16
Jul	6	57,4	27,0	0,360	3,290	34,6	14,7	3,16
Jul	7	53,3	35,0	0,090	6,460	35,0	14,7	3,16
Jul	8	37,8	35,2	0,260	5,890	28,4	14,7	3,16
Jul	9	307,2	24,7	0,250	5,890	22,7	14,7	3,16
Jul	10	98,1	34,7				14,7	3,16
		75,5	30,2	0,350	4,270	32,4	14,70	3,16
Aug	1	174,0		1,870	4,880		17,4	2,48
Aug	2	24,0	37,8	0,250	8,870	28,9	17,4	2,48
Aug	3	118,3	23,9				17,4	2,48
Aug	4			0,530	6,250		17,4	2,48
Aug	5	52,7	18,8				17,4	2,48
Aug	6			0,500	1,220		17,4	2,48
Aug	7	111,7	29,5	0,590	4,450		17,4	2,48
Aug	8	106,2	28,6	0,430	3,120		17,4	2,48
Aug	9	22,8	32,0	0,280	7,450		17,4	2,48
Aug	10	161,3	29,3				17,4	2,48
		109,0	29,3	0,500	4,880	28,9	17,40	2,48
Sep	1	106,3	25,1	0,250	1,760	27,8	16,11	-0,94
Sep	2	124,9	60,4	0,480	6,340	26,1	16,11	-0,94
Sep	3			0,870	8,490	45,5	16,11	-0,94
Sep	4	119,1	18,8		1,340	39,0	16,11	-0,94
Sep	5	105,2	27,5	1,730	1,880	39,3	16,11	-0,94
Sep	6					36,2	16,11	-0,94
Sep	7	35,2	30,6	0,420	3,580	39,5	16,11	-0,94
Sep	8	56,5	24,6	0,380	2,770	26,8	16,11	-0,94
Sep	9			0,540	3,670	21,3	16,11	-0,94
Sep	10			0,900	11,310		16,11	-0,94
		105,8	26,3	0,510	3,580	36,2	16,11	-0,94

Monat	Probe	Cd	Zn	MT-1	MT-2	Linidgehalt	Temn	ATemp
Monat	TTODE	[ua/ka]	[ma/ka]	[ua/ma]	[ua/ma]	[%]	[°C]	[°C/Monat]
Okt	1	67.8	42.5	0 190	<u>4 110</u>	28.6	13.66	-2.58
Okt	2	38.8	49.2	0,130	5 510	26,0	13,66	-2,50
Okt	2	24.9	63.4	, 1 110	11 670	27.5	13 66	-2.58
Okt	4	54.4	57 0	0.450	8 980	26.0	13 66	-2.58
	т 5	58.0	28.4	0,400	5 890	20,0	13,66	-2,50
	5	30,9 72 7	20,4	0,370	3,890	20,5	12,00	-2,30
	7	73,7	29,2 45 5	0,000	4,020	37,0	13,00	-2,50
	7	02,1	45,5	0.110	8,930 5,930	30,0	13,00	-2,56
	8	135,6	33,4	0,110	5,020	25,5	13,66	-2,58
	9	136,7	35,8	0,300	6,330	25,5	13,66	-2,58
Okt	10	88,4	35,0		8,860	31,4	13,66	-2,58
		70,7	39,1	0,370	6,110	28,0	13,66	-2,58
Nov	1	97,7	40,6	0,460	2,510	41,5	10,54	-3,44
Nov	2	43,5	44,0	0,560	4,780	29,1	10,54	-3,44
Nov	3	128,4	53,1	0,470	7,210	27,2	10,54	-3,44
Nov	4	41,1	27,9	0,190	6,920	34,3	10,54	-3,44
Nov	5	99,4	49,7	0,100	2,600	14,6	10,54	-3,44
Nov	6	95,0	53,2	0,720	6,120	30,7	10,54	-3,44
Nov	7	24,8	35,9			24,2	10,54	-3,44
Nov	8						10,54	-3,44
Nov	9	75,3	34,1	1,250	10,990	37,6	10,54	-3,44
Nov	10	165,5	59,7	0,160	6,640	21,8	10,54	-3,44
		95,0	44,0	0,465	6,380	29,1	10,54	-3,44
Dez	1	113,3	62,8	0,400	7,230	17,9	6,97	-3,07
Dez	2	132,8	69,0	0,020	28,040	18,0	6,97	-3,07
Dez	3	177,2	53,1	0,090	6,870	11,9	6,97	-3,07
Dez	4					26,9	6,97	-3,07
Dez	5	71,3	38,2	0,260	2,720		6,97	-3,07
Dez	6	70,4	28,6	2,000	3,000		6,97	-3,07
Dez	7	188,3		0,820	5,900		6,97	-3,07
Dez	8	97,9	38,5	0,040	3,260	15,2	6,97	-3,07
Dez	9	329,8	52,7		5,160	23,3	6,97	-3,07
Dez	10	135,1	36,3	0,170	2,330	16,2	6,97	-3,07
		132,8	45,6	0,215	5,160	17,9	6,97	-3,07
Jan	1	57,9	30,4			5,3	5,67	-1,33
Jan	2	94,8	45,9	0,150	6,450	9,9	5,67	-1,33
Jan	3	208.6	35.2	0.070	3.670	10.9	5.67	-1.33
Jan	4	96.1	43.8	0.080	2.430	11.0	5.67	-1.33
Jan	5	255.4	45.8	0.600	,	, -	5.67	-1.33
Jan	6	56.3	52.9	0.040	5.320	13.0	5.67	-1.33
Jan	7	168.5	34.8	0.060	2,750	4.3	5.67	-1.33
Jan	8	114.2	52.4	1.060	7.370	19.9	5.67	-1.33
Jan	q	118.8	38.3	0,330	3,330	43	5 67	-1 33
Jan	10	43.8	48.2	0.180	0,000	14.6	5 67	-1.33
	10	105.2	44.8	0.150	3.670	10.9	5.67	-1.33

Variablenpaar	r _s	р
Lipidgehalt - Temperatur	0.762	< 0.001
Lipidgehalt - Temperaturdifferenz	-0.300	0.012
Lipidgehalt – Temperaturdiff.(abs.)	0.465	< 0.001
Zn-Gehalt - Temperaturdifferenz	-0.596	< 0.001
Zn-Gehalt – Temperaturdiff.(abs.)	0.335	0.001
Zn-Gehalt – MT-2-Gehalt	0.684	< 0.001
Cd-Gehalt - Lipidgehalt	-0.255	0.05
MT-1-Gehalt - Temperatur	0.273	0.01
MT-1-Gehalt - Lipidgehalt	0.357	0.006
MT-2-Gehalt - Temperatur	0.359	< 0.001
MT-2-Gehalt - Temperaturdifferenz	-0.324	0.002
MT-2-Gehalt – Temperaturdiff.(abs.)	0.504	< 0.001
MT-2-Gehalt - Lipidgehalt	0.507	< 0.001

Tab. A-17: Spearman-Korrelation für Variablen des Jahresganges. r_s: Spearman-Rangkorrelationskoeffizient; p: Signifikanzniveau.

8.9 Chemikalien und Geräte

8.9.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	MAK-Werte
		R- und S-Sätze	
Aceton, suprasolv	Merck	F	500 mL/m ³
		R 11	
		S9-16-23.2-33	
Aprotinin	Sigma		
Blue Dextran 2000	Pharmacia		
Cadmiumchlorid	Merck	Т	
		R 45-48/23/25	
		S 54-45	
Cadmium-Standardlösung	Merck	Xi	
		R 20/21/22-34	
		S 26-36/37/39-45	
Chloroform	Merck	Xn	10 mL/m ³
		R 47-20/22-38-40-48	
		S 35-36/37	
Chymotrypsinogen A	Pharmacia		
Coomassie Brilliant	Serva		
Blue G 250			
Ethanol	Merck	F	1000 mL/m ³
		R 11	
		S 7-16	
Insulin-B-Kette	Sigma		
Kaninchen-MT-1	Sigma	Т	
		R 45-23-2	
		S 45-36/37/39-22	
Kupfer-Standardlösung	Merck	Xi	
		R 36/38	
		S 26	
α -Lactalbumin	Sigma		
2-Mercaptoethanol	Merck	Т	
		R 22-24-36/37/38	
		S 23.2-26-36/37-45	
Methanol	Merck	T, F	200 mL/m ³
		R 1-23/25	
		S 2-7-16-24	
Natriumazid, reinst	Merck	T+	
		R 28-32	
		S 28.1	
Natriumchlorid, p.A.	Merck		

di-Natriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Merck		
Natriumhydroxid	Merck	С	
		R 35	
		S 2-26-37/39	
Ovalbumin	Sigma		
o-Phosphorsäure, 85 %ig	Merck	С	
		R 34	
		S 26-36/37/39-45	
Rinderserumalbumin	Serva		
Salpetersäure, 65%ig,	Merck	С	2 mL/m ³
suprasolv		R 35	
		S 23.2-26-36/37/39-45	
Salzsäure, 37%ig	Merck	С	5 mL/m ³
		R 34-37	
		S 26-36/37/39-45	
Schwefelsäure, 98%ig	Merck	С	1 mg/m ³
		R 35	
		S 2-26-30	
Tris-hydroxy-methyl-	Merck	Xi	
Aminomethan		R 36/38	
Vanillin	Merck		
Zink-Standardlösung	Merck	Xi	
		R 36/38	

8.9.2 Geräte und Zubehör

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aufschlußgefäße	Teflongefäße	Maasen
Auswertesoftware	Chromstar, Version 4.03	Bruker
	Dynex Revelation G 3.04	Dynex
Cryostat	Haake D 8	Omnilab
Mikrotiterplatten- reader	Dynex MRX	Dynex
Flammen-AAS	PU 9100 Atomicabsorptionspectrophotometer	Phillips
Fraktionensammler	L-5200 Fraction Collector	Merck-Hitachi
GF-AAS-Einheit	PU 9200 Atomicabsorptionspectrophotometer	Phillips
	PU 9380 Furnace Autosampler	Phillips
	PU 9390 Electrothermal Atomiser	Phillips
GPC-Säule	Sephacryl S-100 HR, 850*26 mm	Pharmacia
Heizblock	THERMOchem	Gebr. Liebisch
Homogenisator	Potter-Elvehjem-Glas-Teflon-Homogenisator	Thomas
HPLC-Pumpe	L-6220 Intelligent Pump	Merck-Hitachi
IEC-Säule	Resource Q, 6 mL	Pharmacia
Konzentratoren	Ultrafree®-4, -15; Ausschlußgrenze 5 kDa	Millipore
Mikrotiterplatten	Nunc Micro Plate	Nalge
Photometer	Lambda 7; UV-VIS Spectralphotometer	Perkin Elmer
Schlauchpumpe	LKB-Pump P-1	Pharmacia
Statistikprogramm	SPSS, Version 6.1.3	Thomson
Ultrazentrifuge	Centrikon T-2060	Kontron
UV-Detektor	L-4250 UV-VIS Detector	Merck-Hitachi
	L-4000 UV-VIS Detector	Merck-Hitachi
Zentrifuge	3 K 12	Sigma

9 Literaturverzeichnis

- Ang, S.G.; Wong, V.W.T.: Chromatographic analysis of metallothionein proteins from the crab species Scylla serrata and Portunus pelagicus. J. Liq. Chromatogr. 14, 2647-2663 (1991).
- Atrian, S.; Capdevila, M.; Cols, N.; Gonzales-Duate, R.; Gonzales-Duarte, P.; Romero, N.; Stillman, M.J.: Metal binding properties of recombinant metallothionein and related peptides. J. Inorg. Biochem. 59, 103 (1995).
- Baer, K.N.; Thomas, P.: Influence of capture stress, salinity and reproductive status on Zinc associated with metallothionein-like Proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar. Environ. Res.* 29, 277-287 (1990).
- Benson, W.H.; Baer, K.N.; Watson, C.F.: Metallothionein as a Biomarker of environmental metal contamination: Species-dependent effects. In: Mc Carthy, J.F.; Shugart, L.R. (ed.): Biomarkers of Environmental contamination. 255-265, Lewis Publishers, Boca Raton (1990).
- Berger, B.; Dallinger, R.; Thomaser, A.: Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 781-791 (1995).
- **BgVV:** L 00.00.19/1: Bestimmung von Spurenelementen in Lebensmitteln; Teil 1: Druckaufschluß. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1989a).
- **BgVV:** L 00.00.19/2: Bestimmung von Spurenelementen in Lebensmitteln; Teil 2: Bestimmung von Eisen, Kupfer, Mangan und Zink mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) in der Flamme. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1989b).
- **BgVV:** L 00.00.19/3: Bestimmung von Spurenelementen in Lebensmitteln; Teil 3: Bestimmung von Blei, Cadmium, Chrom und Molybdän mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) im Graphitrohr. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1989c).
- Bohl, H.: Die Biologie der Kliesche (Limanda Limanda L.) in der Nordsee. Ber. Dtsch. Wiss. Komm. Meeresforsch. 15, 1-57 (1957).
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- Bremner, I.; Beattie, J.H.: Metallothionein and the trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.* **10**, 63-83 (1990).
- Brouwer, M.; Winge, D.R.; Gray, W.R.: Structural and functional diversity of coppermetallothioneins from the American lobster Homarus americanus. *J. Inorg. Biochem.* **35**, 289-303 (1989).
- Carpene, E.; Camatti, A.; Isani, G.; Cattani, O.; Cortesi, P.: Cd-metallothionein in liver and kidney of goldfish (Carassius auratus): Effects of temperature and salinity. *Ital. J. Biochem* 41, 273-282 (1992).

- Cartel, N.J.: Purification of human brain metallothionein by organic and reversed-phase high-performance liquid chromatograpy under acidic conditions. *J. Chromatogr.* 676 B, 159-164 (1996).
- **Claußen, T.**: Vergleich der Konzentrationen und regionalen Verteilungen von Schwermetallen in Klieschen (Limanda limanda) aus der südlichen Nordsee unter besonderer Berücksichtigung biologischer Einflußgrößen. Universität Hamburg: Dissertation; 1990.
- Cossa, D.; Auger, D.; Averty, B.; Lucon, M.; Masselin, P.; Noël, J.: Flounder (Platichthys flesus) muscle as an indicator of metal and organochlorine contamination of French atlantic coastal waters. *Ambio* 21, 176-182 (1992).
- Cosson, R.P.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.: Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxication protein for MTs a language abuse. *Water Air Soil Poll.* **57-58**, 555-567 (1991).
- Cosson, R.: Les metallothioneines. Poll. Mar. 20, 50-53 (1992).
- Couillard, Y.; Campbell, P.G.C.; Pellegrin-Massicotte, J.; Auclair, J.C.: Field transplantation of a freshwater bivalve, Pyganodon grandis, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**, 703-715 (1995).
- Dallinger, R.: Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* **113 C**, 125-133 (1996).
- **DeClerck, R.:** Tagging results of mature dab in the southern Bight. *Coun. Meet. ICES* **G 11**, (1984).
- Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Martinez, M.; Pastor, A.; Diaz-Mayans, J.: Quantification of Cadmium-induced metallothionein in Crustaceans by the Silver-Saturation method. *Mar. Environ. Res.* **39**, 121-125 (1995).
- Dethlefsen, V.: Bericht über einen Workshop "Die Kliesche als Umweltindikator" vom 14. 16.06.1988 in Hamburg. *Inf. Fischw.* **35**, 108-110 (1988).
- Dunn, M.A.; Blalock, T.L.; Cousins, R.J.: Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185, 107-119 (1987).
- **Duquesne, S.; Richard, A.:** Isolation and characterization of naturally and artifically induced hepatic metallothioneins from two species of flatfish: Limanda limanda and Microstomus kitt. *Mar. Biol.* **119**, 461-470 (1994).
- **Duquesne, S.; Janquin, M.A.; Hogstrand, C.:** Quantification of fish hepatic metallothioneins, naturally or artifically induced, by ELISA: a comparison with radioimmunoassay and differential pulse polarography. *Fres. J. Anal. Chem.* **352**, 589-595 (1995).
- Duquesne, S.; Richard, A.: The presence of metallothionein-like proteins in the liver of the two species of flatfish: Limanda limanda and Microstomus kitt. *Oceanol. Acta* 18, 129-133 (1995).
- Dutton, M.D.; Stephenson, M.; Klaverkamp, J.F.: A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1193-1202 (1993).

- Everaarts, J.M.: DNA integrity as a Biomarker of marine pollution: Strand breaks in Seastar (Asterias rubens) and Dab (Limanda limanda). *Mar. Poll. Bull.* **31**, 431-438 (1995).
- Faaborg Povlsen, A.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P.: The effect of cadmium on vitellogenin metabolism in estradiol-induced flounder (Platichthys flesus (L.)) males and females. *Aquat. Toxicol.* **17**, 253-262 (1990).
- **Fletcher, G.L.; King, M.J.:** Seasonal dynamics of Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ in gonads and liver of winterflounder (Pseudopleuronectes americanicus): evidence for summer storage of Zn²⁺ for winter gonad development in females. *Can. J. Zool.* **56**, 284-290 (1978).
- French, B.L.; Reichert, W.L.; Hom, T.; Nishimoto, M.; Sanborn, H.R.; Stein, J.E.: Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (Pleuronectes vetulus) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.* **36**, 1-16 (1996).
- Friedberg, F.: Effects of metal binding on protein structure. *Quartely Rev. Biophys.* 7, 1-33 (1974).
- Galgani, F.; Bocquene, G.; Truquet, P.; Burgeot, T.; Chiffoleau, J.F.; Claisse, D.: Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts. *Oceanol. Acta* **15**, 355-364 (1992).
- George, S. G.: Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxification system: dose-response. *Aquat. Toxicol.* **15**, 303-310 (1989).
- **George, S.G.:** Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: Furness, R.W.; Rainbow, P.S.: Heavy metals in the marine environment, 123-142, CRC Press, Boca Raton (1990).
- George, S.G.; Langston, W.J.: Metallothionein as an indicator of water quality assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: Sutcliffe, D.W.: Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems. 138-153, Freshwater Biological Association, Ambleside (1994).
- George, S.G.; Olsson, P.E.: Metallothionein assay methods. In: Kramer, K.J.M.: Biomonitoring of coastal waters and estuaries, 173-178, CRC Press, Boca Raton (1994).
- Giralt, M.; Armario, A.; Hidalgo, J.: Chronic stress reduces serum but not liver metallothionein response to acute stress. *Chem. Biol. Interact.* 88, 1-5 (1993).
- Goksøyr, A.; Beyer, J.; Egaas, E.; Grøsvik, B.E.; Hylland, K.; Sandvik, M.; Skaare, J.U.: Biomarker responses in flounder (Platichthys flesus) and their use in pollution monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* **33**, 36-45 (1996).
- Haarich, M.; Harms, U.: Die Neustrukturierung der Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt des Nordostatlantiks und der Ostsee. *Infn. Fischw.* 44, 17-22 (1997).
- Hamilton, S.J.; Mehrle, P.M.; Jones, J.R.: Cadmium-saturation technique for measuring metallothioneine in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* **116**, 541-550 (1987).
- Hamza-Chaffai, A.; Cosson, R. P.; Amiard-Triquet, C.; El Abed, A.: Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunesian coast: ecotoxicological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* **111 C**, 329-341 (1995).

- Hamza-Chaffai, A.; Amiard-Triquet, C.; El Abed, A.: Metallothionein-like protein: Is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study on fish from the Tunisian coast. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 53-62 (1997).
- Hinton, D.E.: Environmental contamination and cancer in fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 411-416 (1989).
- Hogstrand, C.; Haux, C.: Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp.Biochem.Physiol.* **100** C, 137-141 (1991).
- Hogstrand, C.; Lithner, G.; Haux, C.: The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, Perca fluviatilis. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 492-501 (1991).
- Hunziker, P.E.; Kägi, J.H.R.: Metallothionein. In: Harrison, P.: Metalloproteins, part 2, 149-181, Verlag Chemie, Weinheim (1985).
- Hylland, K.; Haux, C.; Hogstrand, C.: Hepatic metallothionein and heavy metals in dab Limanda limanda from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **91**, 89-96 (1992).
- Hylland, K.; Nissen-Lie, T.; Christensen, P.G.; Sandvik, M.: Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, Platichthys flesus L.. *Mar. Environ. Res.* 46, 51-55 (1998).
- Hyllner, S.J.; Andersson, T.; Haux, C.; Olsson, P.E.: Cortisol induction of metallothionein in primary culture of Rainbow trout hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* **139**, 24-28 (1989).
- **ICES:** Results of 1985 baseline study of contaminats in fish and shellfish. *Coop. Res. Rep.* **151**, (1988).
- Kägi, J.H.R.; Schäffer, A.: Biochemistry of Metallothioneins. *Biochemistry* 27, 8509-8515 (1988).
- Kägi, J.H.R.: Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 613-626 (1991).
- Kammann, U.: Metallothioneine und polychlorierte Biphenyle in Fischen aus Elbe und Nordsee. Schriften der Bundesforschungsanstalt für Fischerei 22, (1995).
- Kammann, U.; Friedrich, M.; Steinhart, H.: Isolation of a Metal-binding Protein from Ovaries of Dab (Limanda limanda L.) distinct from Metallothionein: Effect of Cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* **33**, 281-286 (1996).
- Kammann, U; Grymlas, J.; Hein, W.; Steinhart, H.: Metal-binding proteins in bream (Abramis brama L.) caught in the river Elbe, *Biomarkers* 2, 125-129 (1997).
- Karbe, L.; Dembinski, M.; Gonzales-Valeron, J.; Mueller, M.; Zeitner, R.: Regionale Verteilungsmuster von Schwermetallen in Benthosorganismen der Nordsee und angrenzender Seegebiete. Arb. Dt. Fischereiverbandes 48, 95-105 (1989).
- Karin, M.: Metallothioneins: proteins in search of function. Cell 41, 9-10 (1985).
- Kay, J.; Thomas, D.G.; Brown, M.W.; Cryer, A.; Shurben, D.; Solbe, J.F.; Garvey, J.S.: Cadmium accumulation and protein binding patterns in tissues of the rainbow trout, Salmo gairdneri. *Environ. Health Perspect.* 65, 133-139 (1986).

- Klauser, S.; Kägi, J.H.R.; Wilson, K.J.: Characterization of isoprotein patterns in tissue extracts and isolated samples of metallothioneins by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Biochem. J.* 209, 71-80 (1983).
- Klein, D.; Sato, S.; Summer, K.H.: Quantification of oxidized metallothionein in biological material by a Cd saturation method. *Anal. Biochem.* **221**, 405-409 (1994).
- Knust, R.: Ernährung der Kliesche (Limanda Limanda L.) in der zentralen und südlichen Nordsee und die Bedeutung des Ernährungszustandes für Erkrankungen dieses Fisches. Bundesforschungsanstalt für Fischerei Veröffentlichungen des Institutes für Küsten- und Binnenfischerei Hamburg 102 (1990).
- Kuroshima, R.: Hepatic metallothionein and glutathione levels in Red Sea bream. *Comp. Biochem. Physiol.* **110 C**, 95-100 (1995).
- Landgraff, O. Koplanare polychlorierte Biphenyle und weitere Organochlorverbindungen in Sedimenten und Organismen aus der inneren deutschen Bucht. Universität Hamburg: Dissertation, 1995.
- Lang, T.; Dethlefsen, V.: Fish disease monitoring a valuable tool for pollution assessment?. *Coun. Meet. ICES* E 17, 18 pp (1996).
- Lange, C.R.; Lambert, K.E.: Biomonitoring. Water Environ. Res. 67, 738-749 (1995).
- Langston, W. J.; Spence, S. K.: Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. In: Tessier, A.; Turner, D.R.: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. 407-478, John Wiley & Sons (1995).
- **Lee, C.K.C.** The biology and population dynamics of the common dab Limanda limanda (L.) in the North Sea. University of East Anglia: Dissertation, 1972.
- Lehman, L.D.; Klaasen, C.D.: Separation and quantitation of metallothioneins by highperformance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.* **153**, 305-314 (1986).
- Luoma, S.N.: Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs. In: Tessier, A.; Turner, D.R.: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems, 609-659, John Wiley & Sons (1995).
- Maier, H.N.: Beiträge zur Altersbestimmung der Fische. Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, Neue Folge, Abteilung Helgoland 8, 60-115 (1908).
- **McCarthy, J.F.; Shugart, L.R.:** Biomarkers of Environmental contamination, Lewis Publishers, Boca Raton (1990).
- Meier-Reimer, H.: Dt. Hydrogr. Z. 32, 126-130 (1979).
- **Möller, M.** Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. Universität Hamburg: Dissertation, 1997.
- Mommsen, T.P.; Walsh, P.J.: Fish Physiol. 11 A, 347-405 (1988).
- Olsson, P.E.; Haux, C.: Rainbow trout metallothionein. *Inorg. Chim. Acta* **107**, 67-71 (1985).

- **Olsson, P.E.** Metallothionein in fish: Aspects of biochemistry and function. Universität Göteborg: Dissertation, 1987.
- Olsson, P.E.; Haux, C.; Förlin, L.: Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, Salmo gairdneri. *Fish Physiol. Biochem.* **3**, 39-47 (1987).
- Olsson, P.E.; Kling, P.; Petterson, C.; Silversand, C.: Interaction of cadmium and oestradiol-17ß on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Biochem. J.* **307**, 197-203 (1995).
- Olsson, P.E.; Larsson, A.; Haux, C.: Influence of seasonal changes in water tempearture on Cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in Rainbow Trout. *Mar. Environ. Res.* **42**, 41-44 (1996).
- Overnell, J.; Coombs, T.L.: Purification and properties of Plaice metallothionein, a Cadmium-binding protein from the liver of the plaice (Pleuronectes platessa). *Biochem. J* 183, 277-283 (1979).
- **Overnell, J.; Mc Intosh, R.; Fletcher, T.C.:** The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, Pleuronectes platessa L., during the breeding season, and the effect of oestradiol injection. *J. Fish Biol.* **30**, 539-546 (1987a).
- **Overnell, J.; McIntosh, R.; Fletcher, T.C.:** The enhanced induction of metallothionein by zinc, its half-life in the marine fish Pleuronectes platessa, and the influence of stress factors on metallothionein levels. *Experientia* **43**, 178-181 (1987b).
- Overnell, J.; Abdullah, M.I.: Metallthionein and metal levels in flounder Platichthys flesus from four field sites and in flounder dosed with water-borne copper. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 71-74 (1988).
- Overnell, J.; Fletcher, T. C.; McIntosh, R.: Factors affecting hepatic metallothionein levels in marine flatfish. *Mar. Environ. Res.* 24, 155-158 (1988).
- Pan, A.; Wang, Z.; Ru, B.: Determination and Purification of Metallothioneins by High performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 5, 193-197 (1991).
- Pan, A.; Ti, F.; Ru, B.; Li, L.; Shen, T.: An improved method for isolation and identification of Zn-Metallothionein from Cadmium-induced rat-liver. *Biomed. Chromatogr.* 6, 205-211 (1992).
- **Peakall, D.:** Animal Biomarkers as pollution indicators. Verlag Chapman and Hall, London (1992).
- **Peakall, D.B.; Walker, C.H.:** The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* **3**, 173-179 (1994).
- Pedersen, S.N.; Lundebye, A.K.: Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (Carcinus maenas) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Mar. Environ. Res.* **42**, 241-246 (1996).
- Pedersen, S. N.; Lundebye, A. K.; Depledge, M. H.: Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (Carcinus maenas) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183-200 (1997).

- Peng, S.; Xian-Quan, S.; Yan, Z.; Long-Zhu, J.; Wei-Bing, X.: Determination of dietary cadmium-induced metallothioneins in rabbit kidneys and cadmium in metallothionein by anion-exchange high-performance liquid chromatography coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry. J. Chromatogr. 572 B, 73-84 (1991).
- Piechotta, G.; Lacorn, M.; Lang, T.; Kammann, U.; Simat, T.; Jenke, H.-St.; Steinhart, H.: Apoptosis in dab (Limanda limanda) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotox. Environ. Saf.* 42, 50-56 (1999).

Richards, M.; Simons, P.; Klaasen, M.: Cell 37, 263-272 (1984).

- Richards, M. P.; Steele, N. C.: Isolation and quantitation of metallothionein isoforms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **403**, 243-256 (1987).
- Richards, M.P.; Beattie, J.H.: Comparison of different techniques for the analysis of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 669, 27-37 (1995).
- Rick, H.J; Aletsee, L.; Schmidt, D.: Wechselbeziehungen zwischen Phytoplankton und Schwermetallen. In: Lozan, J. L.; Lenz, W.; Rachor, E.; Westernhagen, H. von; Waterman, B. T.: Warnsignale in der Nordsee. 138-147, Paul Parey Verlagsbuchhandlung, Berlin (1990).
- Roesijadi, G.: Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81-114 (1992).
- Roesijadi, G.: Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* **113 C**, 117-123 (1996).
- **Saborowski, R.** Zur Ökophysiologie der Kliesche, Limanda limanda (L.) Einfluß saisonaler Zyklen auf das hepatische Entgiftungssystem. Universität Hamburg: Dissertation, 1996.
- Saborowski, R.; Buchholz, F.: Annual changes in the nutritive state of North Sea dab. *J. Fish Biol.* **49**, 173-194 (1996).
- Saito, S.; Kojima, Y.: Differential role of metallothionein on Zn, Cd and Cu accumulation in hepatic cytosol of rats. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 267-270 (1997).
- Sanders, B.: Stress proteins: Potential as multitiered biomarkers. In: Mc Carthy, J. F.; Shugart, L. R.: Biomarkers of environmental contamination. 165-191, Lewis Publishers, Boca Raton (1990).
- Sanders, B.M.: Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49-75 (1993).
- Scudiero, R.; Capasso, C.; del Vecchio-Blanco, F.; Savino, G.; Capasso, A.; Parente, A.; Parisi, E.: Isolation and primary structure determination of a metallothionein from Paracentrotus lividus (Echinodermata, Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol.* **111 B**, 329-336 (1995).
- Stagg, R.; Goksøyr, A.; Rodger, G.: Changes in branchial Na+,K+-ATPase, metallothionein and P450 1A1 in dab Limanda limanda in the German Bight: indicators of sediment contamination. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **91**, 105-115 (1992).

- Stebbing, A.R.D.; Dethlefsen, V.; Addison, R.F.; Carr, M.; Chapman, P.M.; Cofino, W.P.; Heip, C.; Karbe, L.; Moore, M.N.; Vethaak, A.D.: Overall summary and some conclusions from the Bremerhaven Workshop. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **91**, 323-329 (1992).
- Stillman, M.J.: Optical spectroscopy of metallothioniens: Metal-thiolate clusters in metallothioneins: Absorption, circular dichroism, magnetic circular dichroism, and emission spectra. In: Stillman, M.J.; Shaw III, C.F.; Suzuki, K.T.: Metallothioneins: synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins, and metal-thiolate complexes, 55-127, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991).
- **Stoeppler, M.:** Cadmium. In: Merian, E.: Metalle in der Umwelt, 376-408, Verlag Chemie, Weinhein (1984).
- Stone, H.; Overnell, J.: Non-metallothionein cadmium binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **80 C**, 9-14 (1985).
- **Sturm, R.:** Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitäztskontrolle, 8.Aufl., VEB Fachbuchverlag, Leipzig (1986).
- Sündermann, J.; Degens, E.T.: Die Nordsee, Wasseraustausch und Schadstoffbelastung, Hamburg (1989).
- Sulaiman, N.; George, S.; Burke, M.D.: Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialised estuary using hepatic biochemical indices. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 68, 207-212 (1991).
- **Tessier, C.; Blais, J.S.:** Determination of Cadmium-Metallothioneins in Zebra Mussels exposed to subchronic concentrations of Cd²⁺. *Ecotox. Environ. Saf.* **33**, 246-252 (1996).
- Thompson, J.A.J.; Sutherland, A.E.: A comparison of methods for sample clean-up prior to quantification of metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **102 B**, 769-772 (1992).
- Vallee, B.L.; Falchuk, K.H.: The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118 (1993).
- Vallee, B.L.: The function of metallothionein. Neurochem. Internat. 22, 23-33 (1995).
- Vethaak, A.D.; Rheinallt, T.: Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Rev. Fish Biol. Fish.* **2**, 1-32 (1992).
- Wagner, C.; Steffen, R.; Koziol, C.; Batel, R.; Lacorn, M.; Steinhart, H.; Simat, T.; Müller, W. E. G.: Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Mar. Biol.* 131, 411-421 (1998).
- Wahl, E.; Cameron, P.; Köhler-Günther, A.; von Westernhagen, H.; Anders, K.; Möller, H.; Büther, H.; Dethlefsen, V.; Söffker, K.; Hansen, P.D.; Pluta, H.J.; Harms, U.: Fischkrankheiten im Wattenmeer, Umweltbundesamt, Berlin (1995).
- Winge, D. H.; Miklossy, M.: Structure of metallothioneins. J. Biol. Chem. 257, 3471-3473 (1982)
- Zöllner, N.; Kirsch, K.: Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. Z. Ges. Exp. Med. 135, 545-561 (1962).

Eigene Publikationen und Vorträge

Publikationen in Zeitschriften und Büchern

- S. Hartmann, M. Lacorn, H. Steinhart: Natural occurrence of steroid hormones in food, *Food Chem.* 62, 7-20 (1998).
- C. Wagner, R. Steffen, C. Koziol, R. Batel, M. Lacorn, H. Steinhart, T. Simat, W. E. G. Müller: Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria), *Mar. Biol.* 131, 411-421 (1998).
- W. E. G. Müller, R. Batel, M. Lacorn, H. Steinhart, T. Simat, S. Lauenroth, H. Hassanein,
 H. C. Schröder: Accumulation of cadmium and zinc in the marine sponge *Suberites* domuncula and its potential consequences on single-strand breaks and on expression of heat-shock protein: a natural field study, *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 167, 127-135 (1998).
- H. C. Schröder, R. Batel, S. Lauenroth, H. Hassanein, M. Lacorn, T. Simat, H. Steinhart,
 W. E. G. Müller: Induction of DNA damage and expression of heat-shock protein HSP
 70 by Polychlorinated Biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula* Olivi, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233, 285-300 (1999).
- H. C. Schröder, H. M. A. Haasanein, S. Lauenroth, C. Koziol, T. A. A. A. Mohamed, M. Lacorn, H. Steinhart, R. Batel, W. E. G. Müller: Induction of DNA strand breaks and expression of HSP 70 and GRP 78 homolog by cadmium in the marine sponge Suberites domuncula, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 47-55 (1999).
- G. Piechotta, M. Lacorn, T. Lang, U. Kammann, T, Simat, H. St. Jenke, H. Steinhart: Apoptosis in dab (Limanda limanda) as possible mew biomarker for anthropogenis stress, *Ecotox. Environ. Saf.* 42, 50-56 (1999).
- M. Lacorn, A. Lahrssen, H. Steinhart, T. Simat: Modified isolation procedure of metallothionein isoforms from the marine flatfish dab (Limanda limanda). In: W. E. G. Müller (ed.) Modern aspects in monitoring of environmental pollution in the sea, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klassse Sitzungsberichte 8, Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Erfurt (1997).

Vorträge

- **M. Lacorn:** Cadmium saturation assay: application to isoform specific metallothionein determination, Symposium: Modern aspects in monitoring of environmental pollution in the sea, Mainz, 8. November (1997).
- **M. Lacorn:** Biomarker-Ein neues Konzept als Ersatz für chemische Spurenanalytik?, Lebensmittelchemisches Seminar der Universität Hamburg, 20. Juni (1997).

Poster

- M. Lacorn, N. Rotzoll, A. Lahrssen, H. Steinhart, T. J. Simat: Metallothioneine der Kliesche (*Limanda limanda*) als potentieller Biomarker einer Schwermetallexposition. Deutscher Lebensmittelchemiker-Tag; München, 14.-16.09.1998.
- G. Piechotta, M. Lacorn, U. Kammann, T. Lang, H.-St. Jenke, H. Steinhart: Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) liver in the field and after PCB 118 exposure – a possible new biomarker? Weltausstellung, Lissabon, 1998.