

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Biological effects monitoring in marine research

Biologisches Effektmonitoring in der Meeresforschung

Ulrike Kammann^{*1}, Thomas Lang² and Werner Wosniok³

Abstract

The biological effects monitoring plays an important role in marine monitoring. Contaminants and their effects on fish as well as on other marine organisms belong to the main topics of international monitoring schemes. Biomarkers, as the measures of biological effects, have to meet essential requirements to be recommended on an international level. Among the prerequisites are assessment criteria to describe the main thresholds: to background contamination on one hand and to unacceptable effects and harm to the organism on the other hand. This article describes strategies and drawbacks of choosing and applying marker of contaminant effects to marine field samples. It reflects the actual stage of international guidelines for biological effects monitoring in marine fish and provides an outlook on future use of biomarker as part of an integrated assessments of the marine ecosystem. This goal is addressed in the EU marine strategy framework directive and other international programs. With this article we want to point out that the future of marine environmental assessment of contaminants will be closely linked to integrated monitoring - the combination of chemical monitoring and biological effects monitoring. Biological effects techniques are ready for this challenge.

Zusammenfassung

Das biologische Effektmonitoring ist ein wichtiges Standbein des Meeresmonitorings. Schadstoffe und ihre Effekte auf Fische und andere Meeresorganismen stehen im Fokus internationaler Überwachungsprogramme. Biomarker, die Messgrößen im biologischen Effektmonitoring, müssen grundlegende Anforderungen erfüllen, um in internationale Empfehlungslisten aufgenommen zu werden. Dazu gehören Bewertungskriterien zur Abgrenzung von der Situation in anthropogen unbelasteten Vergleichsgebieten und Schwellen oberhalb derer ein unakzeptabler Effekt für den Organismus zu erwarten ist. In diesem Beitrag sind Strategien und Probleme beschrieben, die bei Auswahl und Anwendung von Biomarkern an Feldproben auftreten können. Neben dem aktuellen Stand internationaler Programmen zum Thema biologisches Effektmonitoring wird ein Ausblick auf zukünftige Anwendung als Baustein für eine Gesamtbewertung des Ökosystems Meer gegeben. Diese Gesamtgebewertung gehört zu den Zielen der EU-Meeressstrategie-Rahmenrichtlinie und anderer internationaler Programme. Mit diesem Beitrag wollen wir die Wichtigkeit von Biomarkern in der Meeresüberwachung unterstreichen und zeigen, dass die Zukunft der marinen Umweltbewertung von Schadstoffen im integrierten Monitoring liegen wird. Das ist die Kombination aus chemischem Monitoring und biologischem Effektmonitoring.

*Correspondence: ulrike.kammann@vti.bund.de

¹Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Palmstraße 9, 22767 Hamburg, Deutschland

Full list of author information is available at the end of the article

Einleitung

Eine ständig steigende Zahl von Chemikalien wird in die Meeresumwelt entlassen. Allein unter den lipophilen organischen Spurenstoffen finden sich Tausende von Einzelsubstanzen, zum Beispiel aus den Gruppen der polychlorierten Biphenyle (PCB), polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), polychlorierte Dibenzodioxine und -furane (PCDF und PCDD) sowie polybromierte Diphenylether (PBDE). Dass einige dieser Substanzen zu schwerwiegenden Umweltproblemen führen können ist seit den 1960er Jahren bekannt [1]. Das Meer ist für viele Chemikalien eine Senke: Durch ihre Persistenz und ihre physikochemischen Eigenschaften werden die genannten Substanzen an Schwebstoff gebunden und über die Flüsse und Atmosphäre ins Meer transportiert. Dort bleiben sie unter Umständen über Jahrzehnte in marinen Sedimenten gespeichert bevor sie resuspendiert werden und das marine Nahrungsnetz erreichen. Im Organismus entfalten Substanzen wie PAK ihre toxische Wirkung indem sie zum Beispiel an DNA binden und kanzerogen wirken können. In den letzten Jahrzehnten ist man zusätzlich auf polare Substanzen aufmerksam geworden, die besonders in der Nähe der Einleiter in Flüssen und Ästuarien nachweisbar sind. Prominente Vertreter dieser Gruppen sind Tributylzinn (TBT) [2] und Pharmazeutika, die zum Teil über endokrine Wirksamkeit verfügen [3] und ebenfalls zu gravierenden Schäden in der Umwelt führen können.

Mit der verbesserten Leistungsfähigkeit der Analytik können immer mehr Substanzen in immer kleineren Konzentrationen in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden. Der Nachweis allein zeigt aber noch keine negativen Auswirkungen auf den Organismus oder das Ökosystem an. Die Brücke zwischen dem Nachweis und dem Effekt schlagen die organismischen Biotests [4] und die Biomarker. Unter Biomarkern werden biologische und biochemische Messgrößen verstanden, die eine Reaktion des Organismus auf den Schadstoff anzeigen und so als Indikatoren für eine Schadstoffexposition und/oder für biologische Effekte in der Überwachung Anwendung finden: Neben einem Enzym wie EROD (Ethoxyresorufin(O)deethylase), das auf Molekül-Niveau schnell reagiert, beinhaltet die Palette des biologischen Effektmonitorings auch Indikatoren auf höherem Organisationsniveau, wie Fischkrankheiten und Störungen der Reproduktion. Diese Parameter brauchen Monate oder Jahre bis zur Manifestation, haben aber eine höhere ökologische Relevanz, da sie sich auf der Individuen- bzw. Populationsebene auswirken. (Abb. 1).

Aus der Fülle der Biomarker und biologischen Messgrößen, die erfolgreich in der Meeresforschung eingesetzt wurden [5,6], haben bislang nur wenige den Weg in die internationalen Überwachungsprogramme gefunden. Diese Überwachungsprogramme bilden die

Grundlage für das deutsche Meeresmonitoring auf der Hohen See.

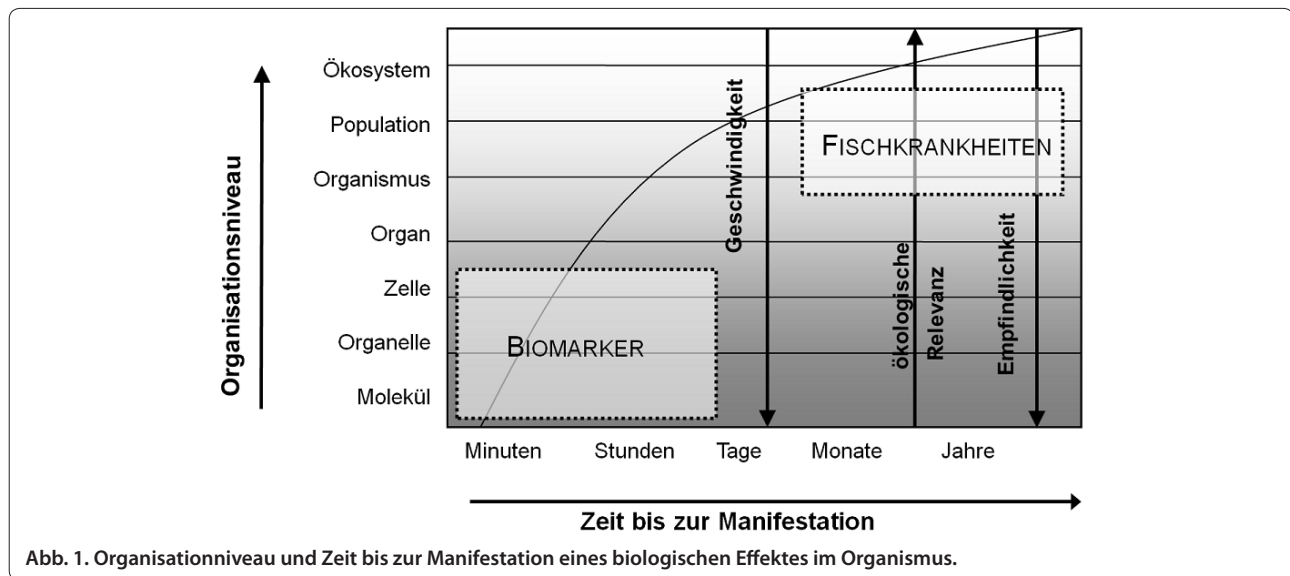
Dieser Beitrag gibt einen Überblick über die Techniken des biologischen Effektmonitorings, die heute in internationalen Programmen für die Anwendung an Meeresfischen empfohlen werden, beschreibt typische Probleme bei ihrer Anwendung und erläutert die Problematik von Grenzwerten. Zukünftig soll biologisches Effektmonitoring ein fester Baustein für eine integrierte Gesamtbewertung des Ökosystems Meer werden.

Biologische Effekte in internationalen Programmen

Mit der neuen Europäischen Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie (MSRL) [7] hat biologisches Effektmonitoring in den europäischen Meeren einen höheren Stellenwert bekommen: Diese Richtlinie gibt vor, dass sich "aus den Konzentrationen der Schadstoffe keine Verschmutzungswirkung ergeben" dürfen. Unter Deskriptor 8.2. der MSRL sind dann auch explizit die Effekte von Schadstoffen als zu überwachender Indikator genannt. Man muss sich also mit biologischen Effekten beschäftigen, wenn man den Vorgaben der MSRL nachkommen will. Die MSRL bezieht sich bei der Auswahl der Parameter auf bereits vorhandene internationale Überwachungsprogramme. Die Komponenten dieser Programme orientieren sich für den Bereich Nordsee in erster Linie an den im OSPAR Abkommen „Co-ordinated Environmental Monitoring Programme“ (CEMP)[8] festgelegten Parametern und Techniken sowie an den durch gemeinsame Expertengruppen von OSPAR und den Internationalen Rat für Meeresforschung (ICES) (ICES/OSPAR Workshops on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open-Sea Areas, WKIMON; ICES/OSPAR Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects, SGIMC) in den Jahren 2005-2011 erarbeiteten Empfehlungen [9,10].

Auch für die Ostsee befinden sich derartige Programme in der Entwicklung, z. T. in Zusammenhang mit der Erarbeitung des HELCOM Baltic Sea Action Plan [11] und seinen ökologischen Zielen in Bezug auf Schadstoffe sowie dem HELCOM CORESET Projekt [12] zur Identifizierung der zentralen Messgrößen für die Ostsee. Zwischen diesen Programmen gibt es in Strategie und Ziel viele Überlappungen. Die wesentlichen Biomarker aus den genannten Programmen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Im Meeresmonitoring ist bis auf Imposex bei Schnecken bislang keine Biomarkermessung verpflichtend verankert. Um z.B. die Auflagen des CEMP zu erfüllen, kann alternativ zum Imposex auch Tributylzinn (englisch TBT) chemisch-analytisch gemessen werden. Alle anderen Messungen aus Tabelle 1 sind momentan freiwillig, aber deshalb nicht weniger relevant.



Zurzeit ist im Effektmonitoring durch die MSRL vieles in Bewegung und die biologischen Messgrößen erfahren mehr Aufmerksamkeit. Ein weiterer positiver Schritt ist, dass für die meisten Parameter jetzt Bewertungskriterien vorliegen. Einige der Biomarker werden daher voraussichtlich in den nächsten Jahren verpflichtenden Status bekommen. Dieser „Aufstieg“ ist abhängig von mehreren Voraussetzungen: (1) einer verbindlichen Methodenbeschreibung mit Festlegung von Einheit und Bezugsgröße, (2) der Festlegung von Bewertungskriterien und (3) der Qualitätssicherung der Messung durch Interkalibration zwischen mehreren Laboren. Zusätzlich spielt eine Rolle, ob Daten für diesen Parameter auch regelmäßig von den relevanten Ländern erhoben werden. Es ist grundsätzlich von Vorteil, wenn die mit dem Monitoring befassten Institutionen aus mehr als einem Land die Methode beherrschen und Daten an die internationalen Datenbanken weiter leiten.

Signal oder Hintergrundrauschen?

Ein zentrales Ziel der OSPAR-Konvention und -Strategie ist es, die Konzentrationen von Umweltschadstoffen im Meer zu senken, und zwar für natürlich vorkommende Substanzen auf Konzentrationen nahe den natürlichen Hintergrundkonzentrationen und für synthetische Chemikalien auf Konzentrationen nahe Null. Aber wo liegt dieser Hintergrund und wo ist seine Grenze? Um zu entscheiden, ob ein Biomarkerwert von dem abweicht, was man ohne Schadstoffeinfluss erwarten würde, werden Bewertungskriterien (Assessment Criteria) herangezogen. Das Bewertungskriterium „Hintergrundkonzentration“ (Background Concentration, BC) beschreibt die Konzentration eines Schadstoffs in einem anthropogen unbelasteten Gebiet und stützt sich auf aktuelle

und/oder historische Zeitreihen. Für Sedimente besteht zusätzlich die Möglichkeit, Bohrkern zu untersuchen und so Zugriff auf Sedimentablagerungen aus vorindustrieller Zeit zu haben. Zur Berechnung kann man Daten aus einem unbelasteten Referenzgebiet verwenden und den Mittelwert der Konzentrationen als BC definieren. Zur Unterscheidung von Werten, die als Hintergrundbelastung angesehen werden können, und solchen, die darüber liegen, wird ein Hintergrundbewertungskriterium (Background Assessment Criteria, BAC) herangezogen. Das BAC ist eine Konzentration nahe und oberhalb der BC, die sich aus einer gemessenen natürlichen Hintergrundkonzentration und ihrer Variation, z.B. als 90 %-Quantil der empirischen Werte, ableiten lässt. Diese Werte werden beispielsweise für Metalle herangezogen, da geringe Mengen dieser Stoffe in der Umwelt natürlicherweise zu finden sind. Auch für Xenobiotika mit dem BC gleich Null lassen sich BAC berechnen, indem die kleine, aber analytisch messbare Varianz der Werte nahe Null zugrundegelegt wird.

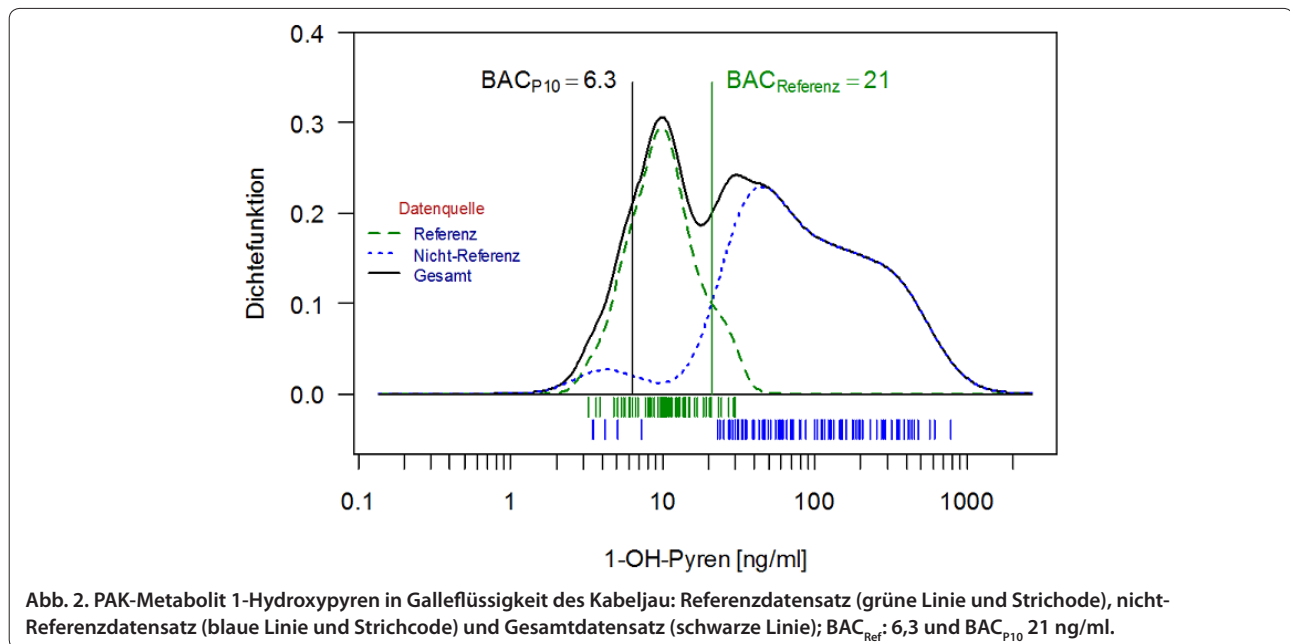
In der marinen Umwelt ist es oft schwierig, anthropogen unbelastete Referenzgebiete zu identifizieren. Ohne diese Gebiete können weder BC noch BAC in der oben genannten Weise berechnet werden. Ein Grund für die schwierige Identifikation kann der Umstand sein, dass die gesuchte Komponente sowohl zum natürlichen Hintergrund gehört, wie es bei vielen Metallen der Fall ist, als auch anthropogen eingetragen wird. Ebenso ist es möglich, dass eine Substanz trotz überwiegend anthropogener Herkunft mittlerweile weltweit verbreitet ist, wie das Dioxin, und es deshalb keine anthropogen unbelasteten Vergleichsregionen mehr gibt. Wenn also keine Daten aus einem Referenzgebiet zur Verfügung stehen, muss ein anderer Weg zur Abschätzung eines BAC

Tabelle 1. Messgrößen im biologischen Effektmonitoring für Fische und Schnecken aus dem OSPAR CEMP/preCEMP [8], aus HELCOM Combine [29] und der Vorschlagliste für CORESET [12]. Die Fischkrankheiten (*) sind in den Programmen teilweise unter „Fish-Disease-Index“ zusammengefasst

Biomarker	Ebene	Effekt	Schadstoff	Programm	Nordsee	Ostsee	Lit.
EROD / Cyp1A	Molekül	Cytochrom p450 Mono-Oxygenase-System (MFO) ist ein Enzymsystem des Entgiftungsstoffwechsels in Wirbeltieren und wird über den AH-Rezeptor angesprochen. Cyp1A bzw. Ethoxyresorufin(O) deethylase (EROD) ist Teil dieses Systems. Messbar sind das Cyp1A-Protein, die EROD-Aktivität oder die Cyp1A Genexpression in der Leber.	z.B. PCB, PAK, DDT, PCDF, PCDD	preCEMP, COMBINE	x	x	[22,30]
PAK-Metabolite	Molekül	PAK-Metabolite sind die Abbauprodukte von PAKs und lassen sich in der Galle und im Urin von Organismen nachweisen, die über ein MFO-System verfügen. Messbar sind diese Substanzen über HPLC, GC-MS oder die Fluoreszenz der Gallenflüssigkeit.	PAK	preCEMP CORESET	x	x	[25,31]
Metallothionein	Molekül	Metallothionein ist ein schwefelhaltiges metallbindendes Protein, das im Organismus für die Regulation der essentiellen Metalle Kupfer und Zink zuständig ist und durch zweiwertige Schwermetallionen wie Cadmium und Quecksilber induzierbar ist. Messbar sind die Proteine, die Genexpression oder Metallgehalte in Zellisolaten.	zweiwertige Metalle	preCEMP	x		[32,33]
Mikronuclei	Molekül	Mikronuclei sind kleine Chromosomenfragmente z.B. im Kern von Fischblutzellen (Erythrozyten) und zeigen einen Fehler bei der Zellteilung an. Die Veränderungen werden mikroskopisch an Blutausstrichen ermittelt.	Erbgut-schädigende Substanzen	CORESET		x	[19]
Lysosomale Stabilität	Organelle	Sinkende Entgiftungsleistung in der Zelle. An histologischen Leberpräparaten durchgeführte Stabilitätsmessung von Lysosomen.	verschiedene	preCEMP CORESET	x	x	[34]
Makroskopische Leberneoplasmen (*)	Organ	An Fischlebern makroskopischen festgestellte und histologisch bestätigte Lebertumore (gut- oder bösartig). Als Auslöser werden krebserregende Umweltschadstoffe (z.B. PAK, PCB) angenommen.	Karzinogene Substanzen	preCEMP CORESET	x	x	[35,36]
Leberhistopathologie (*)	Organ	Pathologische Leberveränderungen bei Fischen: (1) unspezifische, (2) frühe schadstoffinduzierte nicht-neoplastische, (3) prä-neoplastische, (4) neoplastische Veränderungen. Bei (2), (3) und (4) ist eine Beteiligung von Schadstoffen wahrscheinlich, bei (1) sind Schadstoffe lediglich eine der möglichen Ursachen.	Verschiedene, inkl. karzinogener Substanzen	preCEMP, CORESET	x	x	[36]
äußerlich sichtbare Krankheiten (*)	Organismus	Bei Fischen (hauptsächlich Plattfische) werden verschiedene Infektions- und andere Krankheiten (inkl. Parasitosen) erfasst, die als Indikatoren für den Einfluss von Umweltstressoren auf das Immunsystem der Fische dienen. Schadstoffe sind lediglich eine der möglichen Ursachen.	Umweltstressoren inkl. Schadstoffe	preCEMP, CORESET	x	x	[35]
Imposex (Schnecken)	Organismus/ Population	Vermännlichung weiblicher Schnecken und dadurch schrittweiser Verlust der Reproduktionsfähigkeit. Gemessen wird die Penislänge weiblicher Tiere.	TBT	CEMP, COMBINE, CORESET	x	x	[37]
Reproduktionserfolg in Fisch (Aalmutter)	Organismus/ Population	Das Auftreten von Entwicklungsstörungen (missgebildete Larven, spät tote Larven, verzögerte Entwicklung) bei der Brut trächtiger Weibchen wird mikroskopisch festgestellt.	Endokrine Substanzen	preCEMP CORESET	x	x	[38]

herangezogen werden. Eine einfache Variante geht von der Annahme aus, dass zwar nicht nur unbelastete Proben im Datensatz vorhanden sind, aber Proben mit niedrigen Konzentrationen nahe dem natürlichen Hintergrundwert

vorliegen. Es wird näherungsweise das untere 10 % Perzentil des Datensatzes als BAC angesehen, in der Erwartung, sich damit dem oberen Bereich der Hintergrundwerte gut genähert zu haben. Mit anderen



Worten: Man nimmt an, dass die niedrigsten 10 % der Werte im Datensatz den Hintergrundwerten nahe sind und verwendet diese Grenze anstelle des unbekanntem Hintergrundwertes. In Abb. 2 ist die Lage des so berechneten BAC für einen Datensatz von PAK-Metaboliten (1-Hydroxypyren) in Kabeljau aus der Nordsee dargestellt. Eingezeichnet sind BAC_{Ref} (berechnet anhand eines Referenzgebiets) und BAC_{P10} (berechnet aus dem dargestellten Datensatz). In diesem Beispiel unterschätzt der aus Monitoringdaten abgeleitete BAC den aus den Referenzdaten berechneten Wert. Der Vorteil des BAC_{P10} ist, dass er auch ohne Referenzgebiet aus den Messwerten selbst berechnet werden kann. Die Nachteile dieser Berechnung sind (1) die Gefahr, dass der Datensatz mehr oder weniger als die unterstellten 10 % Hintergrundähnlichen Werte enthält und (2) dass per Definition immer 10 % der Daten unter dem BAC liegen, so dass eine echte Bewertung auf diese Weise nicht stattfindet.

Wenn man mithilfe eines BAC Proben mit erhöhten Werten von solchen abgrenzen kann, die nur das „natürliche Hintergrundrauschen“ darstellen, hat man den ersten Schritt getan, um die Ergebnisse in Relation zu einer Bezugsgröße zu bewerten und damit signifikant erhöhte Werte als „Effekt“ zu identifizieren. Aufbauend auf diesen Wert können Kategoriegrenzen und ein Bewertungssystem entwickelt werden. Eine einfache Kategorisierung nach dem Ampelsystem (Abb. 3) kann man vornehmen, indem man zwei Grenzen definiert:

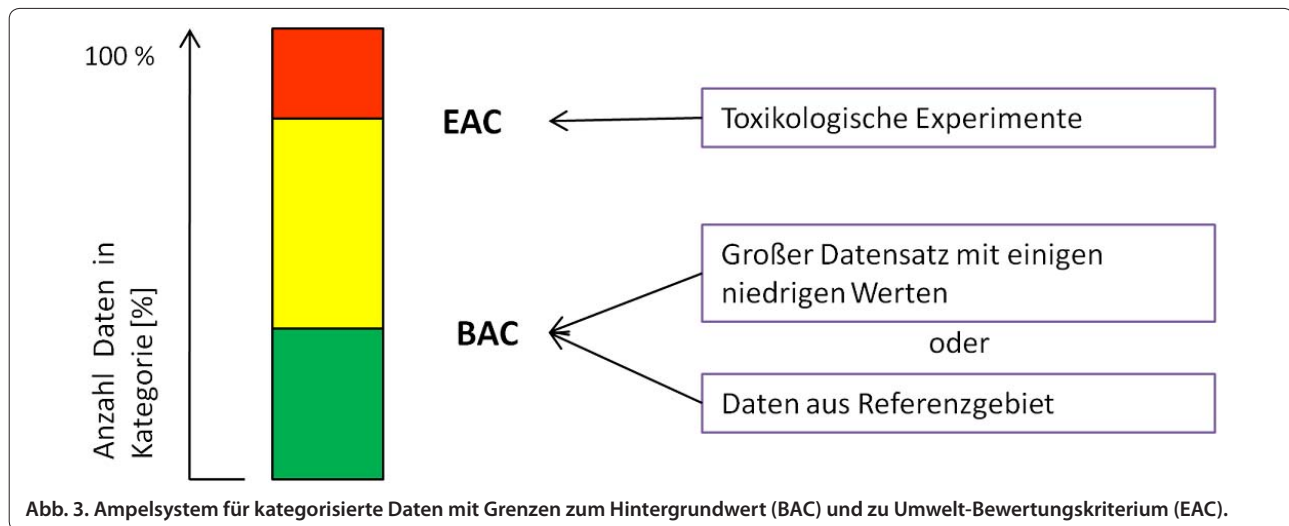
1. Zwischen Hintergrund und signifikant höheren Werten (BAC_{Ref} oder BAC_{P10})
2. Zwischen Werten oberhalb des BAC und unterhalb eines „Umwelt-Bewertungskriteriums“, welches das

Auftreten von unerwünschten Effekten mit signifikantem Risiko für den Organismus markiert (Environmental Assessment Criteria, EAC)

Die Berechnung von EAC beruht meist nicht auf Monitoringdaten. In der Regel werden EAC aus toxikologischen Laboruntersuchungen gewonnen [13,14]. Die Autoren exponierten mehrere Fischarten in Rohölbelastetem Wasser und erfassten verschiedene toxikologische Endpunkte. Für 1-Hydroxypyren in Fischgalle konnte mithilfe dieser Experimente beispielsweise EAC zwischen 473 und 909 ng/ml berechnet werden [15]. Leider liegen solche Experimente nicht für jeden Endpunkt und für jede Fischart vor, so dass in Bezug auf EAC noch viel Forschungsarbeit zu leisten ist.

Darüber hinaus ist es möglich, den EAC über eine Expertenentscheidung festzulegen, wenn es gute Argumente für dieses Vorgehen gibt. Hat ein Fisch einen Lebertumor, so sind sich die Experten einig, dass dieser Effekt unerwünscht und mit einem signifikanten Risiko für den Organismus verbunden ist. Dieser Fisch würde in die Kategorie „rot“ in Abb. 3 fallen.

In Abb. 4 sind Monitoringdaten zu PAK-Metaboliten nach ihrer Kategorisierung anhand des BAC als prozentuale Anteile dargestellt. Der EAC für andere marine Fischarten wird in diesem Beispiel nicht erreicht, so dass keine Daten in die Kategorie „rot“ fallen. Mit einer bewertungsgetragenen Indexierung der Biomarkerwerte, wie sie in Abb. 4 dargestellt ist, ist die Möglichkeit gegeben, Daten auf einer gemeinsamen Skala miteinander zu vergleichen. In dieser gemeinsamen Skala liegt durch die Berechnung der BAC und EAC als Schwellenwerte gleichzeitig eine Bewertungskomponente. Mit der so



erreichten Operationalisierung der Messdaten ist die Grundlage für eine integrierte Betrachtung gegeben. Beispielsweise ist es denkbar, aus Messwerten wie PAK-Metaboliten, EROD und Fischkrankheiten nach einer Indexierung einen gemeinsamen „Fisch-Gesundheits-Index“ zu berechnen.

Integriertes Bewertungssystem am Beispiel Fischkrankheiten

Untersuchungen zu Krankheiten mariner Fischarten erfolgen seit mehr als 20 Jahren im Rahmen nationaler Meeresüberwachungsprogramme gemäß methodischer Richtlinien des ICES [16]. Ein Beispiel für ein kategorisiertes Analyse- und Bewertungssystem für die Befallsraten ist der Fischkrankheitsindex (Fish Disease Index, FDI), der von der ICES Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms [17] entwickelt wurde, um das vielfältige Bild der Befallsraten von Fischen mit verschiedenen Fischkrankheiten vor dem Hintergrund der regionalen und saisonalen Einflussfaktoren in einem Index zusammenzufassen [18]. Die Entwicklung des Fischkrankheitsindex, der den Gesundheitszustand einzelner Fische in einer Zahl zusammenfasst, basiert auf Daten zu Krankheiten der Kliesche als Modellorganismus, da für diese Spezies die meisten Daten in der ICES-Datenbank vorhanden sind (> 600.000 Einzelfische). Der Index lässt sich aber auch für andere Arten anwenden. Seine Berechnung besteht aus folgenden Bausteinen:

- Daten über die An- bzw. Abwesenheit von äußerlich sichtbaren Krankheiten, makroskopischen Lebertumoren und histopathologischen Leberveränderungen,
- Daten zu Schweregraden der Krankheiten (zumeist drei Grade),
- Zuweisung von krankheitsspezifischen Gewichtungsfaktoren, welche die Auswirkungen der jeweiligen

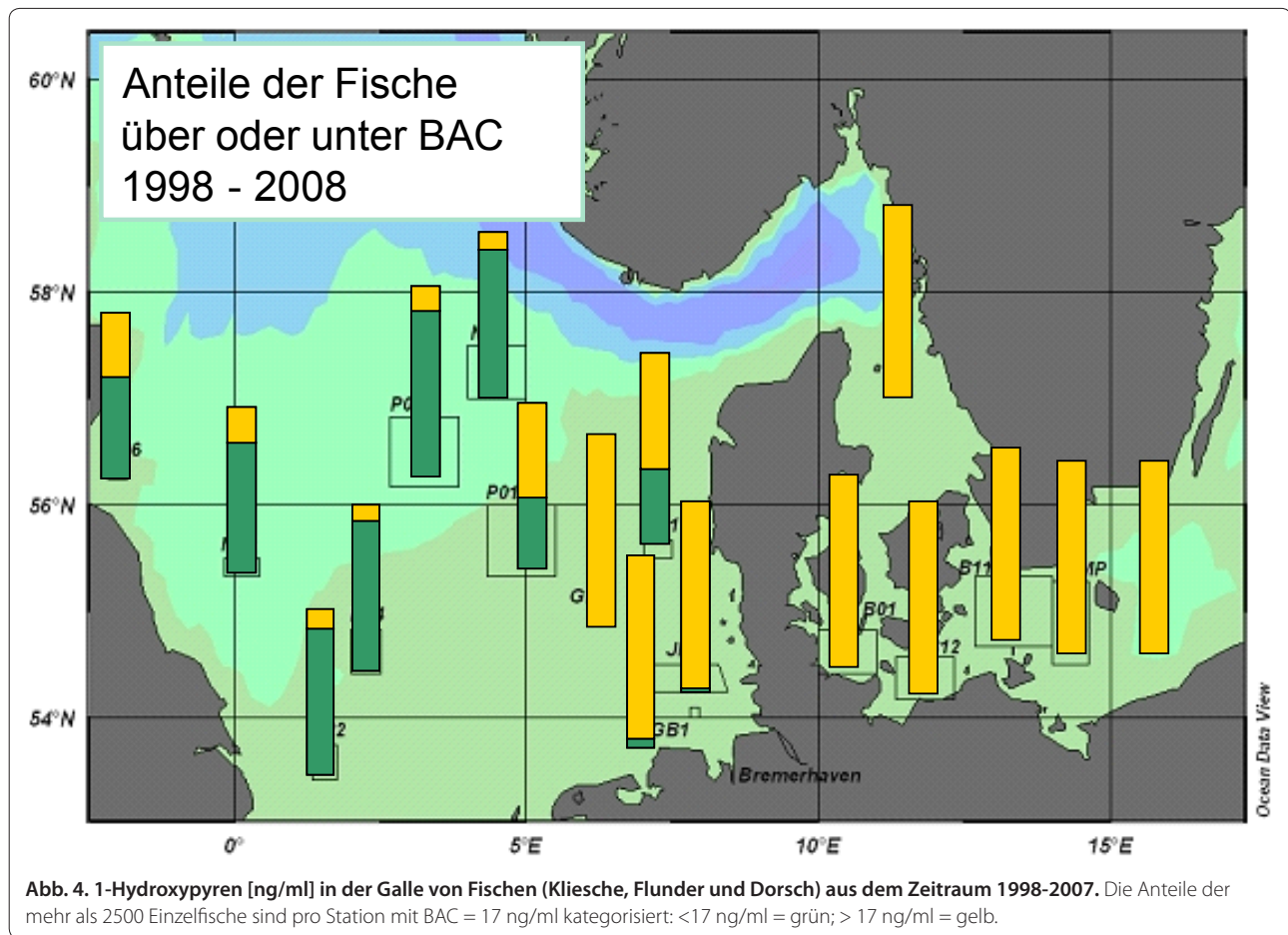
Krankheiten auf den Wirtsorganismus charakterisieren (basierend auf Expertenmeinungen),

- Zuweisung von krankheitsspezifischen Adjustierungsfaktoren für Effekte von Länge, Geschlecht und Probenahme-Saison auf die Befallsraten.

Aus den Bausteinen errechnet sich für jeden untersuchten Fisch ein FDI-Wert, der den Gesundheitszustand des Fisches beschreibt. Anhand von mittleren FDI-Werten lassen sich mit Hilfe von Langzeitdaten Aussagen über die zeitlichen Veränderungen des Gesundheitszustandes von Fischpopulationen einer definierten geografischen Region ableiten. Mit einer Bewertungskomponente und einer dreistufigen Skala, die sich aus den zeitlichen Beobachtungswerten ableitet, fungiert der FDI als Bewertungssystem: Die Stufen der Skala repräsentieren einen guten (grün), indifferenten (gelb) oder schlechten, Besorgnis erregenden (rot) Gesundheitszustand (Abb. 5). Der FDI ist also für sich gesehen schon eine integrierte Bewertung einzelner Krankheiten und Parasiten des Fisches.

Mit Hilfe des FDI kann man unter Berücksichtigung der saisonalen und regionalen Besonderheiten eine Bewertung der Krankheitssituation vornehmen, die sich auf Langzeitdatenreihen stützt. Vereinfacht gesagt signalisiert der FDI einen guten Gesundheitszustand, wenn sich die regionale Situation für die Fische verbessert bzw. einen schlechten Gesundheitszustand im umgekehrten Fall. Ein System wie dieses ist prinzipiell für alle Größen im biologischen Effektmonitoring einsetzbar und fängt saisonale Unterschiede im Hintergrundrauschen ebenso auf wie regionale Unterschiede z.B. zwischen den Fischpopulationen. Ein weiterer Vorteil des Ansatzes ist es, dass er ohne Referenzgebiete und Hintergrundwerte auskommt.

Wenn keine dynamische Aussage über die zeitliche Entwicklung gewünscht ist, kann mit dem FDI auch eine



statische Aussage über den aktuellen Zustand des einzelnen Fisches in Bezug auf Krankheiten und Parasiten getroffen werden. Die oben beschriebene krankheits-spezifische Gewichtung kommt auch in dieser FDI-Variante zur Anwendung.

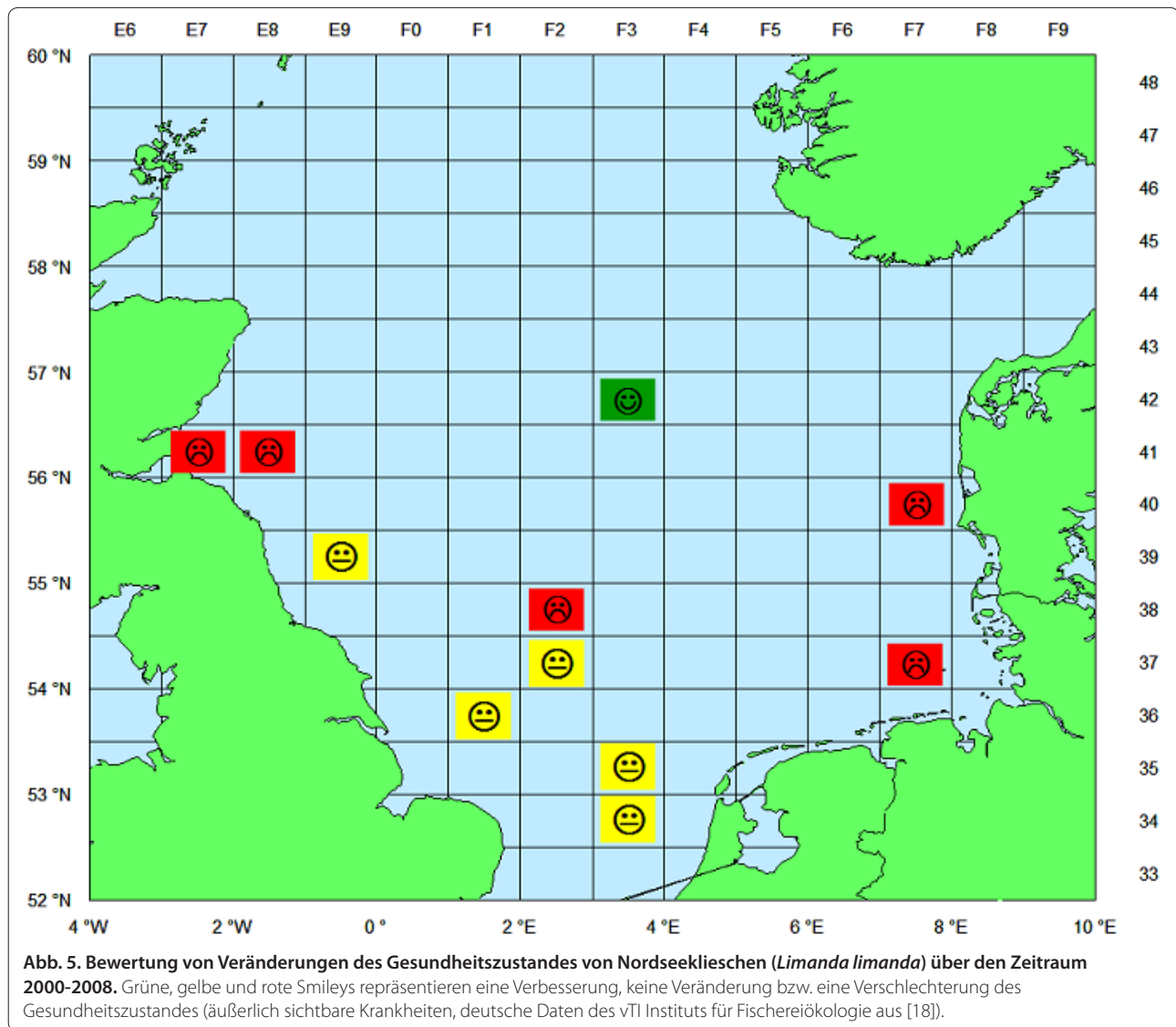
Grenzen der Biomarker

Biologische Effekte sollen als Frühwarnsystem Belastungen anzeigen, bevor die chemische Routineanalytik sie entdecken kann. Das Konzept wird in der Meeresforschung seit mehreren Jahrzehnten erprobt, und es hat eine Reihe von integrierten Ansätzen zur Beschreibung der marinen Umwelt gegeben [19,20]. Eine Idee war, mit Biomarkern problematische Situationen in der Umwelt zu erkennen und dann nach diesem Screening die chemischen Ursachen für die biologischen Effekte mit aufwändiger instrumenteller Analytik zu identifizieren. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Biomarkern zur Bewertung des Zustandes des Ökosystems.

Nicht jeder Parameter eignet sich für die Überwachung. Man muss sich die Frage stellen, ob der nötige Aufwand einer Biomarkermessung auch wirklich eine zusätzliche Information liefert. Biomarker für Exposition, wie zum

Beispiel Metallothionein, brauchen wir nur dann, wenn eine chemische Messung der Belastung schwieriger ist als die des Biomarkers. Metallmessungen sind in der Regel einfacher als die Bestimmung von Metallothionein. Wenn es darum geht, ob ein Metall im Organismus vorhanden ist, dann reicht eine chemische Messung. Dass das Metall im Organismus an ein spezifisches Protein gebunden ist, ist dabei weder überraschend noch besonders nachteilig für den Fisch.

Biomarker haben nicht alle in sie gesetzten Erwartungen erfüllt. Die erhaltenen Ergebnisse waren oft anders als die Analyse der klassischen chemischen Kontaminanten es erwarten ließ. Aber muss das falsch sein? Viele Biomarker zeigen einen summarischen Effekt mehrerer Schadstoffe oder eine generelle Stressantwort an. Das ist genau die gewünschte Eigenschaft einer integrierten biologischen Antwort. Trotzdem ist es außerordentlich schwierig, mit Ergebnissen aus einem Biomarker-Programm zu argumentieren, wenn die passenden Chemikalien nicht wie erwartet mit den Biomarker-Ergebnissen korrelieren. In solch einem Fall muss geklärt werden, ob die Biomarker auf Belastungen reagieren, die bisher gar nicht als solche erwogen wurden



(z.B. bisher nicht betrachtete Chemikalien oder unerwartete Kombinationswirkungen von Kontaminanten) oder ob die Reaktion des Biomarkers gar nicht mit einer Belastung zusammenhängt, sondern anderweitige Ursachen hat. Im ersten Fall würden die Biomarker genau die Funktion erfüllen, wegen derer sie betrachtet werden. Im zweiten Fall würden sie sich teilweise disqualifizieren, da sie ein Signal liefern, an dem man im Rahmen des Monitorings nicht interessiert ist und das in die Irre führt. An den erfassten Biomarker-Werten ist jedoch nicht immer zu erkennen, welcher der beiden Fälle vorliegt. Vielmehr sind umfangreiche Begleitmessungen notwendig, um entweder die belastenden Kontaminanten zu identifizieren oder auszuschließen, dass es Kontaminanten waren, die das Biomarker-Signal ausgelöst haben. Praktisch heißt das, dass man die zusätzliche Einflussvariablen auf den Biomarker kennen und einschätzen

können muss: Neben den bekannten biologischen Eckdaten wie z. B. Art, Alter und Geschlecht des Tieres werden Biomarker häufig von der Wassertemperatur oder dem Reifestadium beeinflusst. In weiblichen Fischen ist die jährliche Reproduktion die Ursache für große physiologische Änderungen in Kondition und Hormonhaushalt. In Fischen aus der Nordsee zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen der Laichreife der Tiere und EROD, einem Enzym aus dem Entgiftungsstoffwechsel; denn EROD ist am Stoffwechsel von Sexualhormonen beteiligt. Dieser Zusammenhang führt zu einer saisonalen Variabilität des EROD-Hintergrunds [21] parallel zur Reproduktion. Eine akute Belastungssituation würde nur dann angezeigt werden, wenn sie sich von diesen Hintergrundschwankungen signifikant absetzt. In vielen Freilandstudien hat sich gezeigt, dass EROD in Fischen durch Schadstoffe wie PAKs

induzierbar ist. Je größer der Schadstoffeinfluss im Verhältnis zum natürlichen Hintergrund ist, desto sicherer lässt sich der Effekt erkennen. Im Fall von Ölverschmutzungen auf dem Meer oder in hochbelasteten Ästuarien kann man mit EROD gute Ergebnisse erzielen. Nur fern der Quellen auf der offenen See überwiegt der natürliche Hintergrund und die Beziehung von EROD zum Schadstoff bleibt aus [22]. Es ist also notwendig den natürlichen Biomarker-Hintergrund einzuschätzen und im Verhältnis zum erwarteten Schadstoffeffekt zu sehen, um die Ergebnisse zu interpretieren. Natürliche, saisonale Schwankungen im Biomarker-Hintergrund sind ebenso für Fischkrankheiten [23] und Metallothionein [24] bei der Kliesche beschrieben. Für PAK-Metaboliten gibt es deutliche Hinweise auf saisonale Unterschiede [25]. Oft werden diese Einflussvariablen als Argument gegen die Biomarker angeführt. Wenn man die Situation im Freiland kennt und die wichtigsten Einflussfaktoren einschätzen kann, bzw. ihnen durch eine geeignete Probenahme entgegenwirkt, dann liefern Biomarker ebenso belastbare Daten wie Schadstoffkonzentrationen in Fisch. Gehalte lipophiler Schadstoffe in Fischen unterliegen ähnlichen Einflussfaktoren wie die Biomarker und sind u.a. vom Fettgehalt der Tiere und damit von jahreszeitlichen Zyklen abhängig.

Oftmals ist die Anwendung mehrerer Biomarker parallel sinnvoller als die Messung eines Parameters allein. Die Biomarker sollten passend zur gestellten Frage ausgewählt und gemeinsam mit chemischen oder hydrographischen Parametern integriert ausgewertet werden. Das ist nicht mehr so eindimensional, wie man es sich am Anfang der Biomarker-Forschung vorgestellt hat. Es ist ein langer Weg, um diese Parameter fest in einem Meeresüberwachungsprogramm zu verankern. Aber der Aufwand lohnt sich, denn ohne Ergebnisse des biologischen Effektmonitorings ist das Bild der Meeresüberwachung unvollständig.

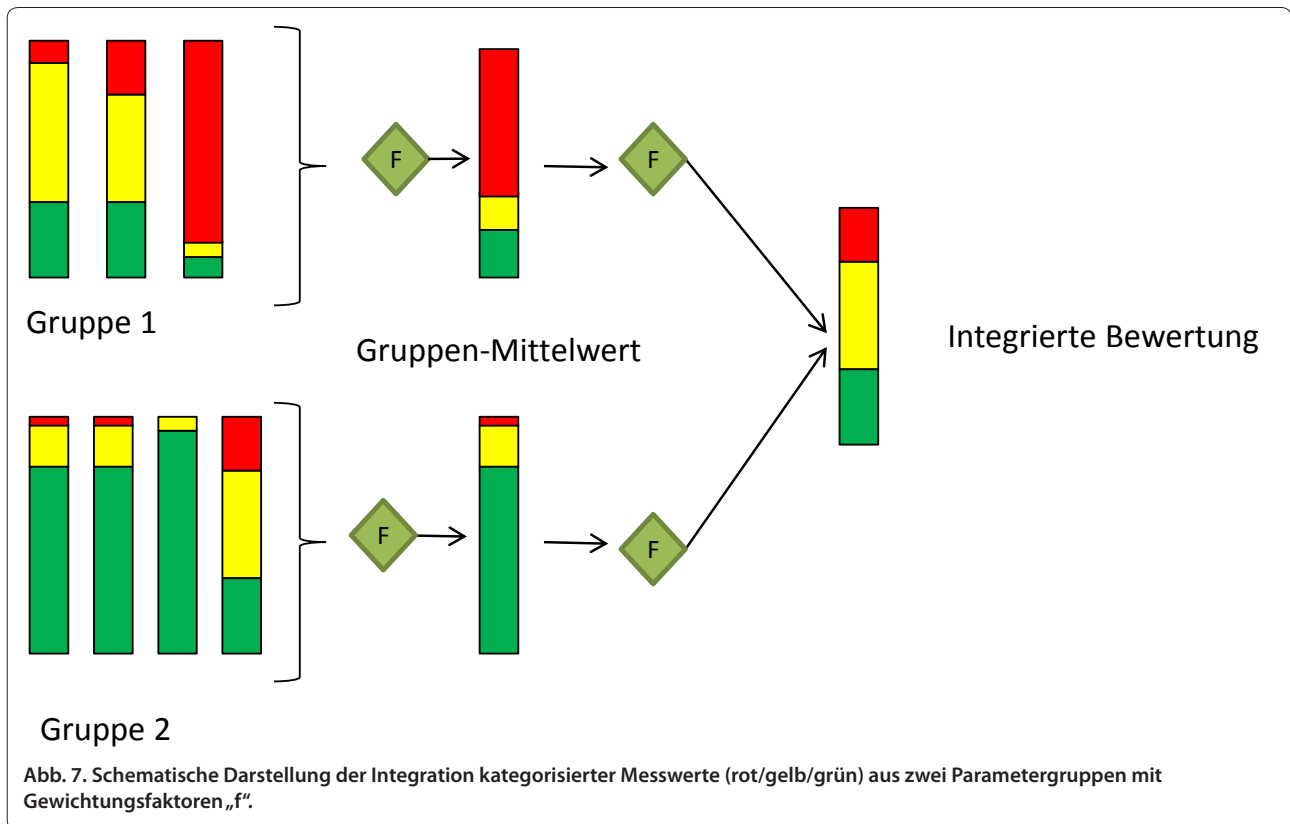
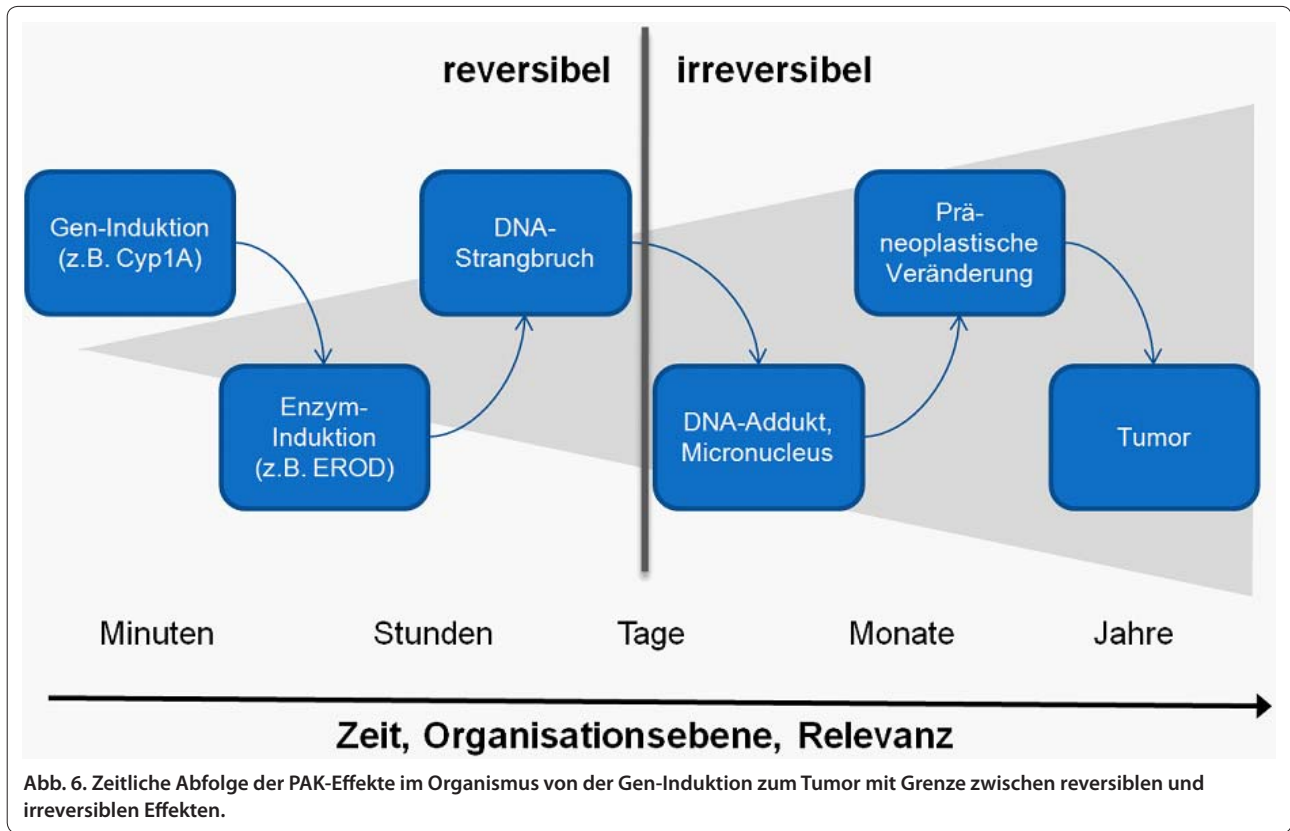
Integrierter Ansatz

In der MSRL sind elf Deskriptoren zur Beschreibung des Umweltzustandes von „Biodiversität“ bis „Lärm“ genannt, die einzeln und gemeinsam (integriert) betrachtet werden sollen. Schadstoffe und ihre Effekte in der marinen Umwelt stellen einen dieser MSRL-Deskriptoren dar. Bezogen auf Schadstoffe beinhaltet ein integrierter Ansatz auch die gemeinsame Betrachtung von Schadstoffgehalten in Biota, Sedimenten und Wasser, da alle diese Kompartimente für eine Beurteilung des Zustands des Ökosystems wichtig sind. Für integrierte Biomarker-Antworten müssen verschiedene Effekte gegeneinander gewichtet werden. Aber wie gewichtet man im Fisch eine Enzyminduktion gegen eine virale Krankheit? Diese Frage ist bis heute unbeantwortet. Trotzdem kann man

prinzipielle Vorüberlegungen anstellen: Es bestehen wesentliche Unterschiede in der biologischen Relevanz von reversiblen und irreversiblen Schäden - insbesondere in der Schiene der Tumorentstehung. In dieser Kausalkette sind die Geninduktionen, die Entstehung von DNA-Strangbrüchen und die EROD-Induktion reversibel. DNA-Addukte, histologische Veränderungen und schließlich die manifestierten Tumore sind es dagegen weitestgehend nicht (Abb. 6). Wenn man sich von den reversiblen zu den irreversiblen Schäden bewegt, dann ändert sich auch die Organisationsebene, auf der sich diese Effekte manifestieren von der molekularen Ebene in Richtung Population. Die Effekte, die für den Organismus oder gar die Population irreversible Auswirkungen haben, sind höher zu gewichten als reversible Schäden. Ähnliche Überlegungen lassen sich beispielsweise für reproduktions- und immunotoxische Effekte anstellen.

Statt nach Organisationsebene, kann man auch nach Effektgruppen gewichten. Gemeint ist damit zum Beispiel eine höhere Gewichtung von Biomarkern aus der Gruppe der reproduktionstoxischen Effekte im Vergleich zu allgemeinen Stress-Parametern. Die reproduktionstoxischen Effekte haben eine hohe ökologische Relevanz und schlagen die Brücke zu den Bestandszahlen und Populationsentwicklungen. Zu dieser Gruppe gehören der Reproduktionserfolg bei der lebendgebärenden Aalmutter, der durch missgebildete Larven gemindert sein kann, Intersex bei Fischen oder, als Anzeichen einer ersten Störung durch endokrine Substanzen, erhöhte Gehalte des Eiproteins Vitellogenin im Blut männlicher Fische. Es ist denkbar, dass sich Biomarker, die derselben Effektgruppe angehören zukünftig gegenseitig ersetzen lassen, wenn Sensitivität, Selektivität und Dosis-Wirkungs-Verhalten der Biomarker ausreichend gut bekannt sind. Das kann nötig werden, wenn man an die Grenzen des Verbreitungsgebietes einzelner Arten stößt oder aber nur bestimmte Regionen vom nationalen Monitoringprogramm des jeweiligen Landes abgedeckt werden. Eine weitere strategische Überlegung ist die Frage, ob Messwerte, welche die Schwelle der EAC überschreiten, also die „roten“ Signale, stärker gewichtet werden sollen als „grün“ oder „gelb“ klassifizierte Ergebnisse. Dieser Strategie verhindert, dass viele „grüne“ Eingangparameter, die wenigen „roten“ Signale überlagern. Man kann diesem Problem auch mathematisch begegnen und über nicht-lineare Beziehungen die „roten“ Ergebnisse durchgehend höher gewichten. Letztendlich kann dem Experten aber nicht die Entscheidung der Gewichtung abgenommen werden. Diese Gruppierung und Gewichtung der Daten ist ein entscheidender Schritt in der Indexentwicklung und befindet sich derzeit noch in der Diskussion.

Für eine integrierte Umweltbewertung werden, wie bereits oben beschrieben, nicht nur gewichtete



Biomarker-Ergebnisse herangezogen, sondern ebenso andere Parametergruppen wie Schadstoffmessungen, hydrographische Daten, Eutrophierung, Artenzusammensetzung und Biodiversität. Diese und andere relevante Größen für die Bewertung des Ökosystemzustands fließen in die Berechnung mit ein und müssen untereinander gewichtet werden (Abb. 7).

Auf den ersten Blick wirkt der Ansatz mit den drei Ampelfarben simpel. Die Zusammenhänge in der Natur sind in der Regel viel komplexer, als dass sie mit drei Kategorien abgedeckt werden könnten. Das in Abb. 7 dargestellte System der integrierten Bewertung kann daher nur eine Annäherung sein, die entsprechend sensibel interpretiert werden muss. Viele komplexere Zusammenhänge sind seit langen bekannt und in Verbindung mit dem marinen Monitoring umfassend diskutiert worden. Trotzdem hat sich mit dem Ampelsystem und dem BAC/EAC-Ansatz eine übersichtliche Idee durchgesetzt. Hier musste ein Kompromiss gefunden werden zwischen wissenschaftlicher Exaktheit und Kommunizierbarkeit der Ergebnisse. Ein einfaches System hat den Vorteil, von Entscheidungsträgern leichter akzeptiert zu werden. Die Aufgabe der Wissenschaft wird es sein, das Integrierte Monitoring vor der zu starken Vereinfachung und vor missverständlichen Aussagen zu bewahren. Dieser Prozess ist noch nicht abgeschlossen. Internationale Forschungsprojekte wie BEAST [26] beschäftigen sich intensiv mit integrierten Bewertungskonzepten von Nordsee und Ostsee und bauen dabei auf die Erfahrungen der ICES-Arbeitsgruppen auf. Entscheidungen zur Wahl von Eingangsparametern, Gewichtungsfaktoren und Integrationslevel sind trotz der übersichtlichen Mathematik schwer zu treffen.

Wir brauchen integrierte Antworten und auch konkrete Aussagen über biologische Schadstoffeffekte. Diese Aussagen sollen stark und belastbar sein, damit sie fest in der nationalen und internationalen Meeresüberwachung verankert werden können. Gute Konzepte für integriertes Monitoring existieren bereits [27,28] und setzen sich international immer mehr durch. Die Zeiten für einzelne Biomarker-Messungen sind vorbei. Die Zukunft gehört der integrierten Multiparameter-Meeresüberwachung.

Appendix

- Das OSPAR-Abkommen (Oslo-Paris-Abkommen) zum Schutz der Meeresumwelt des Nordostatlantiks umfasst den Nordostatlantik vom Nordpol über Grönland bis zu den Azoren sowie die gesamten west- und nordeuropäischen Küstengewässer. 15 Staaten sowie die Europäische Union sind die Mitglieder.
- Die Helsinki-Kommission zum Schutz der Meeresumwelt des Ostseeraums (HELCOM) ist eine Kommission, die für den Schutz der Meeresumwelt

der Ostsee arbeitet. Die Mitglieder sind alle Ostseeanrainerstaaten sowie die EU.

Konkurrierende Interessen

Die Autoren erklären, dass sie keine konkurrierenden Interessen haben.

Beiträge der Autoren

UK Ausarbeitung und Konzeption des Manuskripts, WW Revision des Textes und der mathematischen Aspekte, TL und WW Beitrag zum Thema Fischkrankheiten sowie Abb. 2 und 5. Alle Autoren haben das Manuskript gelesen, geprüft und ihr Einverständnis erklärt.

Author details

¹Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Palmallee 9, 22767 Hamburg, Deutschland. ²Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Deichstraße 12, 27472 Cuxhaven, Deutschland. ³Universität Bremen, Institut für Statistik, Postfach 330 440, 28334 Bremen, Deutschland.

Received: 10 June 2011 Accepted: 9 January 2012

Published: 9 January 2012

Literatur

1. Hempel G: Food from the Sea: Our interaction with living resources. *Umweltwiss Schadst Forsch* 2008, **20**:12-119
2. Rüdell H, Steinhilber J, Mueller J, Schröter-Kermani C: Retrospective monitoring of organotin compounds in biological samples from North Sea and Baltic Sea - are the use restrictions successful? *Umweltwiss Schadst Forsch* 2009, **21**: 282-291
3. Kase R, Kunz P, Gerhardt: Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen. *Umweltwiss Schadst Forsch* 2009, **21**:339-378
4. Floeter C, Ratte HT, Ahlf W: Development of ecotoxicological instruments and their legal implementation for the marine ecological risk assessment of chemicals, pesticides and dredged material. *Umweltwiss Schadst Forsch* 2009, **21**:48-60
5. Lehtonen KK, Schiedek D, Köhler A, Lang T, Vuorinen PJ, Förlin L, Barsiene J, Pempkowiak J, Gercken J: The BEEP project in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Mar Pollut Bull* 2006, **53**:523-537
6. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE: Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar* 2003 **13**(2), 57-149
7. MSRL [<http://ec.europa.eu/environment/water/marine>] *European Union Marine Strategy Framework Directive* 2008
8. OSPAR Commission [<http://www.ospar.org/content/content.asp?menu=00900301400000>] Co-ordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP) 2008
9. ICES [<http://www.ices.dk/reports/ACME/2007/WKIMON07.pdf>] *Report of the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open-Sea Areas (WKIMON III)* 2007, ICES CM 2007/ACME: 01.
10. ICES [http://www.ices.dk/reports/ACOM/2011/SGIMC/sgimc_2011_final.pdf] *Report of the Joint ICES/OSPAR Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC)* 2011, ICES CM 2011/ACOM:30.
11. HELCOM [http://www.helcom.fi/BSAP/ActionPlan/en_GB/SegmentSummary/] *BSAP Baltic Sea Action Plan 2007*
12. HELCOM [http://www.helcom.fi/projects/on_going/en_GB/coreset/] *CORESET, Development of HELCOM Core Set indicators*
13. Skadsheim A: Cod stocks exposed to crude oils: uptake, metabolism and biomarker effects. *Technical report AM-2004/005*, 2004, Akvamiljo, Randaberg, Norway.
14. Skadsheim A, Sanni S, Pinturier L, Moltu U-E, Buffagni M, Bracco L: Assessing and monitoring long-range-transported hydrocarbons as potential stressors to fish stocks. *Deep-Sea Research Part II*. 2009, **56**(21-22): 2037-2043
15. ICES [http://www.ices.dk/reports/ACOM/2009/SGIMC/sgimc_2009.pdf] *Report of the Joint ICES/OSPAR Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC)* 2009, ICES CM 2009/ACOM:30.
16. Lang T: Fish disease surveys in environmental monitoring: the role of ICES. *ICES Marine Science Symposia* 2008, **215**: 202-212

17. ICES [<http://www.ices.dk/reports/SSGHIE/2009/WGPDMO09.pdf>] *Report of the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms (WGPDMO) 2009*, ICES CM 2009/MCC:01.
18. Lang T, Wosniok W: **The Fish Disease Index: a method to assess wild fish disease data in the context of marine environmental monitoring.** *ICES CM 2008/D:01*, 2008
19. Barsiene J, Lehtonen KK, Köhler A, Broeg K, Vuorinen PJ, Lang T, Pempkowiak J, Syvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Repecka R, Vuontisjärvi H, Kopecka J: **Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic sea).** *Mar Pollut Bull* 2006, **53**:422-436
20. Schnell S, Schiedek D, Schneider R, Balk L, Vuorinen PJ, Karvinen H, Lang T: **Biological indications of contaminant exposure in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic Sea.** *Can J Fish Aquat Sci* 2008, **65**: 1122-1134
21. Kammann U, Lang T, Vobach M, Wosniok W: **Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in dab (*Limanda limanda*) as biomarker for marine monitoring.** *Environ Sci Pollut Res* 2005, **12**(3):140-145
22. Kammann U, Lang T, Berkau A-J, Klemp M: **Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A or EROD – a comparison.** *Environ Sci Pollut Res* 2008, **15**(7):600-605
23. Lang T, Wosniok W, Barsiene J, Broeg K, Kopecka J, Parkkonen J: **Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants.** *Mar Pollut Bull* 2006, **53**:488-496
24. Hylland K, Niessen-Lie T, Christensen P.G., Sandvik M: **Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L.** *Mar Environ Res* 1998, **46**:51-55
25. Kammann U: **PAK metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*) – spatial distribution and seasonal changes.** *Environ Sci Pollut Res* 2007, **14**(2):102-108
26. BEAST [<http://www.environment.fi/default.asp?contentid=365837&lan=EN>] *Biological Effects of Anthropogenic Chemical Stress: Tools for the Assessment of Ecosystem Health*, 2009
27. Korpinen S, Meski L, Andersen JH, Laamanen M: **Human pressures and their potential impact on the Baltic Sea ecosystem.** *Ecological Indicators* 2012, **15**:105-114.
28. HELCOM: **Hazardous substances in the Baltic Sea. An integrated thematic assessment of hazardous substances in the Baltic Sea.** *Baltic Sea Environmental Proceedings No. 120B*, Helsinki, Finland, 2010.
29. HELCOM [http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/PartD/en_GB/main/] *COMBINE Part D. Programme for monitoring of contaminants and their effects*
30. Stagg RM, McIntosh A: **Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity.** *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark, 1998, **23**
31. Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Baršienė J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D: **Use of biliary PAK metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea.** *Mar Pollut Bull* 2006, **53**:479-487
32. George S, Gubbins M, MacIntosh A, Reynolds W, Sabine V, Scott A, Thain J: **A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution.** *Mar Environ Res* 2004, **58**:571-575
33. Kammann U, Friedrich M, Steinhart H: **Isolation of a metal-binding protein from ovaries of dab (*Limanda limanda*) – effect of cadmium exposure.** *Ecotox Environ Safety* 1996, **33**(3):281-286
34. Köhler A, Wahl E, Söffker K: **Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* L.)** *Environ Toxicol Chem* 2002, **21**:2434-2444
35. Bucke D, Vebaak AD, Lang T, Møllergaard S: **Common diseases and parasites of fish in the North Atlantic: Training guide for identification.** *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 1996, **19**:27 pp
36. Feist SW, Lang T, Stentiford GD, Köhler A: **Biological effects of contaminants: use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring.** In: *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 2004, **38**:42pp
37. Strand J, Jacobsen JA: **Imposex in two sublittoral neogastropods from the Kattegat and Skagerrak: the Common Whelk *Buccinum undatum* and the Red Whelk *Neptunea antiqua*.** *Marine Ecology Progress Series* 2002 **244**: 171-177
38. Gercken J, Förlin L, Andersson J: **Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters.** *Mar Pollut Bull* 2006, **49**:7-507

doi:10.1186/2190-4715-24-1

Cite this article as: Kammann U, *et al.*: Biological effects monitoring in marine research. *Environmental Sciences Europe* 2012, **24**:1.