

## Summary, conclusions and future prospects

### *Summary*

The main focus of the current thesis was to extend the knowledge about the use of fish parasites as bioindicators. On one hand the research emphasis was aimed at the faunistical and ecological aspects of parasite communities of barbel (*Barbus barbus*) in relation to environment conditions - the use of parasites as effect indicators (**Chapter 1**). On the other hand the thesis evaluated and reverified the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* as accumulation indicator, while covering all critical aspects (as summarized by Sures, 2003) concerning its application - the effects of size and sex composition of its infracommunities (**Chapter 2**) as well as the seasonality (**Chapter 3**) on the metal uptake process in the parasite. Finally, the thesis delivered a detailed metal monitoring survey focused mainly on the lower Danube (**Chapter 4**), which was performed using the suggested barbel – *P. laevis* system.

The important results are summarized in the following:

*Chapter 1:* The endohelminth fauna of barbel correlates with water quality of the Danube River in Bulgaria.

- Infection of barbel with ten species of metazoan parasites including three trematodes, three acanthocephalans and four nematodes was observed in fish collected from three localities in the Bulgarian part of the river Danube between summer 2004 and summer 2007.
- New host records for three parasitic species – the nematode larvae of genus *Eustrongylides* sp. and *Hysterothylacium* sp. as well as the acanthocephalan *Leptorhynchoides plagicephalus* were recorded for first time for the host *Barbus barbus*.
- The most prevalent species was the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*, which was also the dominant species of the intestinal component communities at all sampling sites.
- The second most frequent parasite at all Danube localities was *Rhabdochona hellichi*, which occurred in significantly higher numbers at the less polluted sites.
- The composition as well as the diversity characteristics of the parasite communities showed a clear correlation with the composition of the invertebrate fauna and water

quality – overall, the diversity of helminth communities increased with decreasing levels of nutrients and pollutants at all sampling sites.

*Chapter 2: Is metal accumulation in Pomphorhynchus laevis dependent on parasite sex or infrapopulation size?*

- From total twelve analyzed elements (As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, V, Zn) five (As, Cd, Cu, Pb and Zn) were detected in significantly higher concentrations in the acanthocephalan *P. laevis* compared to its host tissues (muscle, intestine, liver)
- According to the calculated mean bioconcentration factors, three more elements (Co, Mn, V) usually were with higher concentrations in *P. laevis*.
- Comparisons between high and low infected fish revealed significant differences only for V with higher concentrations for the heavily infected group.
- Concerning sex specific metal accumulation V and Zn showed significant differences (V, at  $p < 0.05$ ; Zn, at  $P = 0.05$ ), with higher levels in females of *P. laevis* each.

*Chapter 3: Seasonal differences of metal accumulation in Pomphorhynchus laevis and its definitive host Barbus barbus.*

- The concentrations of As, Cd, Cu, Pb and Zn were significantly higher in the parasite samples presented than in the host's tissues.
- These elements showed also a clear seasonal pattern, while the concentrations in the fish tissues remained similar in spring, summer and autumn.
- Seasonal variation in the mean individual weight of parasite infrapopulations, whereas the infrapopulations in autumn characterized with significantly lower mean individual weight than these in spring and summer - sign for predominant young specimens.
- Composition pattern of all accumulated elements reflected the pattern of the mean individual weight over the year - the highest concentrations obtained for As, Cd, Cu, Pb and Zn in *P. laevis* were found in autumn, followed by spring and summer.
- Concentration of Cd and Pb in *P. laevis* correlated negatively with the mean worm weight.
- Significant differences for the metals Cd and Pb were found, when the concentration in worms from summer and autumn were compared.

*Chapter 4: Application of acanthocephalan Pomphorhynchus laevis from its host barbel (Barbus barbus) as metal indicator in the Danube River.*

- The elements As, Cd, Cu, Pb and Zn were found to be significantly higher accumulated in the parasite compared to its host tissues.
- The concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in *P. laevis* exceeded the concentrations reported for the water column at the selected sampling sites.
- The longitudinal pattern of As, Cd, Cu, Pb and Zn in the parasite samples corresponded to the background available data (for water and suspended particulate matter) along the Danube River in Bulgaria.
- The comparisons between upper and lower Danube, performed in summer 2007, demonstrated increased concentrations of As, Cd and Pb in the lower Danube, whereas As showed also a peak in the upper reaches. Their concentration pattern reflected the pattern of suspended particular matter obtained during the 2<sup>nd</sup> Joint Danube Survey performed also in summer 2007.
- The long term monitoring at sampling site Kozloduy (685 km) showed progressive decrease in the concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn for the period summer 2004 to summer 2007, while the As contents remained similar.

### ***Conclusions and future prospects***

The collective data suggests that the fish parasites can be successfully used to characterize the ecosystems health and integrity. Following the alternations in composition and diversity of their communities, it was possible to detect differences in the environmental conditions between investigated sampling sites. Therefore fish parasites can be efficiently applied as effect indicators in the aquatic monitoring. The last published data on parasite fauna of barbel for the Bulgarian part of Danube River was from 1960 and 70-ties (Kakacheva-Avramova, 1962, 1977; Margaritov, 1959, 1966). The results obtained from the present investigation showed that the fauna composition completely differed from the one reported 40-50 years ago. The discrepancy can be associated with the changed/disturbed ecological conditions in the investigated river stretch.

Further investigations aimed on other river stretches in middle and upper part of the river and on other aquatic habitats as well should be performed for the sake of the future implementation of fish parasites as effect indicators in the Danube River and in the hydrobiological praxis as well. The faunistical data from the different parts of the Danube should be compared and subsequently correlated with the local abiotic and biotic data, in

order to confirm profoundly the relationship between parasites and environmental conditions. Furthermore, different host-parasite systems should be also be included in such surveys and studied from a bioindication perspective.

A major goal of the current thesis was filling in on the lack of knowledge regarding the application of fish acanthocephalans as accumulation indicators. The obtained results suggested that the size and the sex composition of acanthocephalan's infrapopulations play no considerable role in the metal uptake process. Therefore, in metal monitoring surveys, especially in those aimed on toxic elements such as As, Cd and Pb, these aspects should not be taken into account. Worth noticing is that the results regarded the acanthocephalan *P. laevis*. If other acanthocephalan species are taken as accumulation indicators, these aspects should be studied in order to confirm the tendencies obtained in the thesis.

On the other hand the results revealed a seasonal pattern in the metal uptake, which was found to be dependent on the stage of acanthocephalan's development in the final host. Thus, the seasonality of transmission of *P. laevis* under the local climate conditions should be considered in order to make our monitoring surveys more precise. In some geographical regions, where the seasonality of transmission is not clearly pronounced, the seasonal factor can be suppressed. Of course, the sentinel features of fish acanthocephalans should also be investigated under different climate conditions, in order to select the proper sampling periods for metal monitoring surveys. The same should be done with other acanthocephalan species, if they are taken as metal indicators.

With the help of the background metal monitoring data delivered by the International Commission for Protection of Danube River (ICPDR), it was confirmed that the levels of the elements accumulated in *P. laevis* corresponded to these in the environment. The pollution profile in the Danube River basin, obtained during the both Joint Danube Surveys (in 2001 and 2007), was additionally confirmed by the concentrations measured in the parasites. Despite the mobility of the fish host, the results of this thesis suggest the fish-parasite system is a perfect model in the field of ecological monitoring. However, future detailed analysis and correlations between the raw data from the JDS2 and obtained parasite data are required. Unfortunately, this data concerning the element concentrations in water, SPM, sediment and biota is still not available.

Regarding the practical use of a fish-parasite system as sentinel, the first step was made during the second Joint Danube Survey in 2007, where fish muscle tissue was analyzed. During the thesis I had the opportunity to contribute to the survey with metal analysis carried out on barbel – *P. laevis* system. The combined results suggest that the additional use of fish acanthocephalans as sentinels represents a more powerful approach in heavy metal

monitoring surveys, due to the higher accumulation capacity of acanthocephalans compared to fish muscle. Consequently, in future monitoring programs the fish parasites should be accessorially implemented as sentinels, especially in large and complex lotic systems like Danube River.

## **Zusammenfassung**

### **Indikationsvermögen von Fischparasiten zur Beurteilung des ökologischen Zustandes aquatischer Habitate**

#### ***Hintergrund***

Das im letzten Jahrzehnt steigende Interesse an Helminthen als potentielle Bioindikatoren für die Belastung und Verschmutzung von Gewässern mit Schwermetallen hat zu einer verstärkten Forschung auf dem Gebiet der ökologischen Parasitologie geführt. Die Möglichkeit, Fischparasiten als Indikatoren für die Beurteilung der Wasserqualität zu nutzen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht (MacKenzie *et al.* 1995; Kennedy, 1997; Lafferty, 1997; Overstreet, 1997; Sures *et al.* 1997b; Valtonen *et al.* 1997; Lafferty und Kuris, 1999; Sures *et al.* 1999a; Sures, 2001). Parasiten können als Effektindikatoren (Valtonen *et al.* 1997; Sures, 2001), und als Akkumulationsindikatoren (Sures *et al.* 1999a; Sures, 2001) benutzt werden. Dabei übertreffen sie sogar die Bioindikationseigenschaften der bislang bekannten freilebenden Organismen. Bei den freilebenden Bioindikatoren wurden vor allem die Akkumulationseigenschaften sowie Änderungen in der Physiologie und Ethologie erforscht, die durch Veränderung der Umweltqualität entstanden sind (Gunkel, 1994).

Eine Möglichkeit für einen Einsatz von Parasiten in der Effektindikation, liegt in der Erfassung der Diversität und der Veränderung von Parasitengemeinschaften. Bei dieser Form der Effektindikation liefern die Organismen durch ihre An- oder Abwesenheit Informationen über den physikalisch-chemischen Zustand der Umwelt (Sures, 2003). Eine Untersuchung der Diversität, Struktur und Dynamik der Parasitengemeinschaften hilft den Zustand und die Veränderlichkeit natürlicher Ökosysteme zu erfassen. Um die Auswirkungen, die Umweltkontaminationen auf Parasitengemeinschaften ausüben zu erfassen, müssen viele Aspekte berücksichtigt werden, wie z.B. die Dynamik und Eingliederung des Fischwirtes in das Nahrungsnetz (Marcogliese und Cone, 1997), die Beziehung und die Wechselwirkung zwischen den Parasiten (Overstreet, 1997) sowie die Ab- und Anwesenheit der Zwischenwirte. Außerdem beeinflussen Faktoren wie der pH-Wert (Marcogliese und Cone, 1997) und der Grad der Eutrophierung (Valtonen *et al.* 1997) direkt oder indirekt die Abundanz, die Verteilung und die Struktur von Parasitenpopulationen.

Wie bereits erwähnt, können Fischparasiten auch als Akkumulationsindikatoren verwendet werden. Durch ihre Fähigkeit, verschiedene Substanzen in ihrem Gewebe zu akkumulieren, liefern sie als Akkumulationsindikatoren Informationen über den chemischen Zustand ihrer

Umwelt. Gegenwärtig ist bekannt, dass nicht nur freilebende Organismen, wie z.B. Krebse und Muscheln, Schwermetalle in ihrem Gewebe akkumulieren können, sondern auch Parasiten. Und zwar in einem Maß, das die Konzentrationen in den Geweben des Wirtes oder der Umwelt, um ein Vielfaches übersteigt.

Durchgeführte Untersuchungen an parasitischen Nematoden deuten darauf hin, dass diese Helminthen nicht als Akkumulationsindikatoren geeignet sind, da die Anreicherung der Metalle zu niedrig ist (Sures *et al.* 1994b; Sures *et al.* 1998; Szefer *et al.* 1998; Baruš *et al.* 1999a,b). Cestoden dagegen scheinen vielversprechendere Akkumulationsindikatoren zu sein (Riggs *et al.* 1987; Turčeková und Hanzelová, 1996; Sures *et al.* 1997c; Tenora *et al.* 1997; Baruš *et al.* 2000; Sures *et al.* 2002). Anhand experimenteller Daten lässt sich ihre Akkumulationsfähigkeit höher einstufen als die freilebender Organismen. Die hinsichtlich ihrer Bioakkumulationsfähigkeiten am besten untersuchte Parasitengruppe sind die Acanthocephalen (vgl. z.B. Sures 2003, 2004a,b). Es gibt nicht nur eine Reihe von Freilandstudien (Sures *et al.* 1994a,b,c; Sures und Taraschewski, 1995; Sures *et al.* 1997a, 1999b; Sures und Reimann, 2003), sondern auch Laboruntersuchungen (Siddall und Sures, 1998; Sures und Siddall, 1999; Zimmermann *et al.* 1999; Scheef *et al.* 2000; Sures *et al.* 2000b; Sures und Siddall, 2001, 2003; Sures *et al.* 2003) zur Schwermetallakkumulationskapazität von Acanthocephalen. Die Metallanreicherung bei adulten Acanthocephalen kann einige tausend Male höher sein als in den Geweben ihres Endwirtes. Der Akkumulationsprozess fängt dabei unmittelbar nach der Infektion des Endwirts an und erreicht in 4-5 Wochen seine Gleichgewichts-Konzentration. Untersuchungen an Larvenstadien weisen darauf hin, dass diese Stadien noch nicht in der Lage sind, Metalle in hohen Konzentrationen zu akkumulieren (Sures, 2003). Auch im Vergleich zu etablierten, freilebenden Bioindikatoren ist die Biokonzentration von Cd und Pb in Acanthocephalen um ein Vielfaches höher, wie der unmittelbare Vergleich der Metallanreicherung in *Acanthocephalus lucii* und der Dreikantmuschel, *Dreissena polymorpha*, zeigt (Sures *et al.* 1997a, 1999b). Trotz der enormen Akkumulationskapazität von Fischacanthocephalen bestehen diverse unerforschte Aspekte, die potenziell ihre praktische Anwendung im Bereich des Metallmonitorings kritisch machen könnten. Wie von Sures (2003) zusammengefasst, sollten noch die Auswirkung des Alters und der Größe von Parasiten sowie Effekte der Saisonalität und der Reproduktionsaktivität auf die Metallaufnahme gründlich erforscht werden, um die Acanthocephalen als Akkumulationsindikatoren einsetzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die oben genannten Aspekte bezüglich der Anwendung von Fischparasiten als Indikatoren zu erfassen. Daraus leiten sich die folgenden Arbeitshypothesen und Schwerpunkte ab:

*(1) Die Zusammensetzung der Fischparasiten-Gemeinschaft korreliert mit dem Verschmutzungsgrad in den Flussabschnitten, aus welchen die Fische stammen.*

Die Fischparasiten reagieren auf die veränderten Umweltbedingungen mit einer Änderung in ihrer Diversität und Artenzusammensetzung. Die Verschmutzung (chemische oder physikalische) kann direkt oder indirekt die Fischparasitenpopulationen beeinflussen. Der direkte Einfluss zeichnet sich durch eine letale Reaktion der Larven- oder Adultstadien aus. Bei indirektem Einfluss handelt es sich um letale Effekte auf die Zwischen- oder Endwirte, wobei die Effizienz der Parasitentransmission verhindert wird. Zudem könnte die Verschmutzung die Wirtsphysiologie insofern beeinflussen, dass Wirt und Parasit zusätzlich unter diesem externen Stress leiden. In beiden Fällen führt die Kontamination zu Änderungen in der Artenzusammensetzung und der Diversität von Parasitenpopulationen.

*(2) Die Infrapopulationsgröße und geschlechtsspezifische Metallanreicherung in dem Acanthocephalen Pomphorhynchus laevis und dessen Endwirt Barbus barbus.*

Die Fischacanthocephalen sind fähig die Metallgehalte in den Wirtsorganen zu reduzieren, wobei die Konzentrationen im Wirtsgewebe negativ mit der Anzahl der Würmer im Darm korreliert (Sures und Siddal, 1999; Sures *et. al.* 2003). Für den Fall, dass Fischacanthocephalen als Metallindikatoren verwendet werden, sollte untersucht werden, ob die Infrapopulationsgröße berücksichtigt werden muss. Parallel könnte, bedingt durch den unterschiedlichen Metabolismus, ihre Geschlechterzusammensetzung auch eine Rolle bei der Metallaufnahme spielen. Zusätzlich könnten die rein morphologischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern auch einen Einfluss auf den Akkumulationsprozess aufweisen. Dies könnte durch unterschiedliche Oberfläche- Volumen-Verhältnisse verursacht werden.

*(3) Jahreszeitliche Unterschiede bei der Metallaufnahme in Pomphorhynchus laevis und dessen Endwirt Barbus barbus.*

Eine Saisonalität bei der Metallaufnahme in den derzeit verwendeten freilebenden Indikatororganismen (wie z.B. Muscheln) ist bereits bekannt. In den meisten Fällen sind die Unterschiede durch deren Reproduktionszyklen geprägt. Ein Grund dafür ist hauptsächlich die Änderung in der Metabolismusaktivität vor und nach der Gametenfreisetzung (Luoma und

Rainbow, 2008). Ähnliche Tendenzen sind auch bei den Fischacanthocephalen während ihrer Entwicklung im Darm des Endwirtes zu erwarten. Dadurch besteht ein Bedarf, bestimmte Beprobungszeiträume zu berücksichtigen, damit der Faktor Saisonalität vermindert werden kann.

*(4) Die Metallkonzentrationen in dem Acanthocephalen Pomphorhynchus laevis spiegeln die Konzentrationen in der Umwelt wider.*

Um einen Akkumulationsindikator effektiv für Metallmonitoringszwecke verwenden zu können, müssten dessen Gewebekonzentrationen jene der Umwelt widerspiegeln (zusammengefasst von Sures, 2001). Darüber hinaus sollten die Fischacanthocephalen eine realistische Information über den Metallbelastungsgrad in den entsprechenden aquatischen Habitaten liefern.

Um die Schwerpunkte der Dissertation abdecken zu können, wurden die folgenden Methoden und Materialien angewendet:

### ***Durchführung der Arbeit***

In dieser Forschungsarbeit wurde eine Freilandstudie zur Zusammensetzung der Fischparasitengemeinschaft an verschiedenen Standorten im Verlauf der Donau durchgeführt. Zwischen 10 und 30 Barben (*Barbus barbus*) der jeweiligen Probestellen wurden im Zeitraum Sommer 2004 bis Sommer 2007 auf ihre Parasitozöosen hin untersucht. Die Fische wurden von Berufsfischern entlang der Donau bezogen, wobei ein Teil (im Sommer 2007) während der zweiten wissenschaftlichen Donau Expedition (JDS2) gefischt wurde. Die Fische wurden im eingefrorenen Zustand in das Labor gebracht, wo sie einer vollständigen parasitologischen Untersuchung unterzogen wurden (vgl. z.B. Sures *et al.* 1999c). Aus den Daten zur Befallssituation der Fische, unter spezieller Berücksichtigung von Helminthen, wurden dann die mittleren Diversitäts- und Dominanzindices (vgl. z.B. Magurran, 1988; Sures *et al.* 1999c) berechnet, so dass objektive Größen resultierten, die einen Vergleich der Fischparasitozöosen zwischen den Probestellen sowie zwischen den Jahreszeiten erlauben. Zusätzlich wurden die Resultate der Fischparasitozönose in Korrelation zu den entsprechenden Makrozoobenthos-Daten und den physikalisch-chemischen Wasserparametern gesetzt. Diese Hintergrunddaten wurden von der Datenbank der Internationalen Kommission zum Schutze der Donau (ICPDR) entnommen.

Zusätzlich wurden die Parasiten (insbesondere Acanthocephalen) wie auch verschiedene

Fischgewebe (Muskel, Darm und Leber) im Labor auf ihren Schwermetallgehalt hin untersucht. Dazu wurden die Proben mittels Mikrowellenaufschluss in Lösung gebracht (Zimmermann *et al.* 2001). Anschließend wurden die Metallgehalte mit Hilfe der Massenspektrometrie (ICP-MS) gemessen. Die Konzentrationen der Elemente As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, V und Zn wurden analysiert. Um die Akkumulationskapazität von Fischacanthocephalen zu ermitteln, wurden mittlere Biokonzentrationsfaktoren für die gemessenen Elemente wie folgt berechnet (nach Sures *et al.* 1999a):  $C_{[P.laevis]} / C_{[Wirtsgewebe]}$ ;  $C_{[P.laevis]} / C_{[Wasser]}$ .

### ***Wichtige Ergebnisse und Erkenntnisse***

Die oben genannten Schwerpunkte und Arbeitshypothesen der Dissertation wurden einzeln jeweils in Unterkapiteln dargestellt und diskutiert.

1) *Die Zusammensetzung der Fischparasiten-Gemeinschaft korreliert mit dem Verschmutzungsgrad der Flussabschnitte, aus welchen die Fische stammen.*

Insgesamt wurden 407 Barben aus dem Zeitraum Sommer 2004 bis Sommer 2007 parasitologisch untersucht. Die Fische stammten aus drei Beprobungsstellen in dem bulgarischen Abschnitt der Donau und wurden jeweils im April, Juli und Oktober entnommen. An den Probestellen Vidin (834 km) und Kozloduy (685 km) wurden jeweils 165 bzw. 193 Barben in dem gesamten Zeitraum untersucht und an der Stelle Silistra (375 km) insgesamt 49 Barben im Jahr 2006 und 2007.

Die erhobene Parasitenfauna umfasste 10 Endohelminthenarten - 3 Trematodenarten (Metacercarie von *Diplostomum spathaceum* in den Augenlinsen, *Posthodiplostomum cuticola* auf der Haut, *Metagonimus yokogawai* auf den Schuppen), 3 Acanthocephalenarten (*Pomphorhynchus laevis*, *Acanthocephalus anguillae* und *Leptorhynchoides plagicephalus* im Darm) und 4 Nematodenarten (Adulten von *Rhabdochona hellichi*, *Pseudocapillaria tomentosa* und Larven von *Hysterothylacium* sp. im Darm und Larven von *Eustrogyliodes* sp. in der Leibeshöhle). Der Acanthocephale *L. plagicephalus* und die Larven von den Nematoden *Eustrongylides* sp. und *Hysterothylacium* sp. wurden zum ersten Mal für den Wirt Barbe beschrieben.

Die dominante Parasitenart an allen drei Probestellen war der Acanthocephale *P. laevis*, der mit einer Befallsrate von fast 100 % vorkam. Der zweithäufigste Parasit war der Nematode *R. hellichi* dessen Prävalenz und Befallsintensität an den Stellen im Unterlauf (Kozloduy und Silistra) mit einer besseren Wasserqualität anstieg. Im Gegensatz dazu kam der Nematode

*Eustrgylides* sp. zusammen mit *R. hellichi* mit gleichen Befallsraten an der Probestelle im Oberlauf (Vidin) vor, wobei im Lauf der Donau seine Befallsrate und Intensität absanken. Die Verteilungsmuster dieser Parasitenarten können auf den Verschmutzungsgrad (Eutrophierungsgrad) bezogen werden, wenn davon ausgegangen wird, dass diese Arten unterschiedliche Zwischenwirte benötigen. Als Zwischenwirt für *R. hellichi* dienen Köcherfliegenlarven (Trichoptera) von der Gattung *Hydropsyche* (Moravec, 1995), deswegen war die niedrigste Prävalenz dieser Art an der Stelle Vidin zu finden- auf Grund der niedrigen Abundanz des Zwischenwirtes. Der Fakt spiegelt den höheren Eutrophierungs- und Verschmutzungsgrad wider, welcher von der Internationalen Kommission zum Schutz der Donau für diesen Flussabschnitt ermittelt wurde. Die Larven von *Hydropsyche* sp. werden im Saprobiensystem mit einem Indikationswert zwischen 2.1 und 2.3 eingestuft (Moog, 1995).

Im Gegensatz zu *R. hellichi* erfolgt die Entwicklung der Nematoden der Gattung *Eustrgylides* sp. über Oligochaeten (*Lumriculus variegatus*, *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus* sp.) als Zwischenwirt (Morevec, 1994), die mit einem Indikationswert von über 3 organisch- und chemisch-belastete aquatische Habitats charakterisieren. Es wurde gefolgert, dass das Vorkommen von diesen Parasitenarten abhängig von der Belastung war.

Die berechneten Diversitätsindizes (Brillouin- und Shannon-Wiener- Index) unterstützten zusätzlich die Korrelation mit dem Belastungsgradienten. Die niedrigsten Werte wurden an der Probestelle Vidin gemessen, während die unteren zwei Stellen deutlich höhere Werte aufwiesen. Das Belastungsprofil im bulgarischen Abschnitt der Donau konnte zudem durch die chemischen Hintergrunddaten der ICPDR belegt werden (Literathy *et al.* 2002, 2009; TNMN, 2009).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Parasitenfauna mit den lokalen Gewässerbedingungen korreliert. Die Diversitätsindizes spiegelten auch den Belastungsgradient entlang der untersuchten Flussstrecke, wobei die Diversität hier als ein Maß für die allgemeine Ökosystemgüte betrachtet wird.

## 2) Die Infrapopulationsgröße und geschlechtsspezifische Metallanreicherung in dem Acanthocephalen *Pomphorhynchus laevis* und dessen Endwirt *Barbus barbus*.

Die Konzentrationen von 12 Elementen (As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, V, Zn) wurden mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) im Darmparasiten *Pomphorhynchus laevis* und in den Geweben (Muskel, Darm, Leber) seines Wirtes *Barbus barbus* analysiert. Der Zweck der Untersuchung war, eventuelle Anreicherungsunterschiede, sowohl zwischen gering und stark infizierten Fischen, als auch

zwischen beiden Geschlechtern von *P. laevis* festzustellen. Dafür wurden 30 mittelgroße Fische im Oktober 2006 von einer Probestelle bei Flusskilometer 685 an der bulgarischen Flussbank der Donau entnommen und entsprechend ihrer Befallsintensität mit Acanthocephalen eingeteilt. Fische (n=9) mit einer Befallsintensität weniger als 20 Würmer wurden der Gruppe Gering Infiziert zugeteilt. Eine zweite Gruppe (n=9) mit einer Befallsintensität von mehr als 100 Parasiten wurde der Gruppe Stark Infiziert zugeordnet. Anhand dieser beiden Gruppen wurden potenzielle Akkumulationsunterschiede in den Wirtsgeweben und den Acanthocephalen zwischen gering und stark infizierten Fischen untersucht. Eine weitere dritte Gruppe (n=8) von Barben mit einer Befallsintensität zwischen 66 und 89 Würmern wurde ausselektiert. Die Gruppe wurde für die Erfassung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Metallanreicherung verwendet.

Die Elementzusammensetzung im Wirt-Parasit-System wies einen signifikant stärkeren (bis zu 1070 höheren) Anreicherungsgrad von As, Cd, Cu, Pb und Zn im Parasiten im Vergleich zu den Wirtsgeweben auf. Gemäß den berechneten Biokonzentrationsfaktoren wurden drei weitere Elemente (Co, Mn, V) mit einer höheren Konzentration in *P. laevis* gefunden. Die Vergleiche zwischen stark und leicht infizierten Fischen zeigten weder in den Wirtsgeweben noch im Parasiten signifikante Unterschiede. Die einzigen Anreicherungsunterschiede wurden für das Element Vanadium in Parasitenproben und Fischleber gefunden, wobei die stark infizierte Gruppe höhere Gehalte aufwies. Zusammenfassend blieb die Konzentration von den in *P. laevis* stark akkumulierten Elementen (As, Cd, Cu, Pb und Zn) unabhängig von der Befallsintensität.

Zwischen den beiden Geschlechtern von *P. laevis* wurden signifikante Unterschiede nur für die Elemente V ( $p < 0.05$ ) und Zn ( $p \approx 0.05$ ) festgestellt. Wobei die Weibchen jeweils höhere Gehalte aufwiesen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *P. laevis* gut geeignet für Metallmonitoringstudien ist, da die Infrapopulationsgröße und Geschlechterzusammensetzung keinen großen Einfluss auf den Akkumulationsprozess im Wirt-Parasit-System ausüben. Diese Aspekte zusammen mit der enormen Akkumulationskapazität, besonders für toxische Metalle wie Cd and Pb, stützen den Vorschlag für die Verwendung von *P. laevis* als Akkumulationsindikator.

Die Arbeitshypothese, dass die Metallanreicherung im Wirt-Parasit System von der Größe und Geschlechterzusammensetzung der Parasiteninfrapopulationen abhängig ist, konnte nicht vollständig bestätigt werden. Bis auf die Elemente V und Zn, die noch vom Wirtsmetabolismus als essentielle Metalle (wie z.B. Zn) beeinflusst werden, war die Elementzusammensetzung in Parasiten ähnlich.

3) *Jahreszeitliche Unterschiede bei der Metallaufnahme in Pomphorhynchus laevis und dessen Endwirt Barbus barbus.*

Um die Wirkung der Saisonalität auf die Metallaufnahme in den Acanthocephalen zu erforschen, wurden die Gehalte der Elemente As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, V und Zn in dem gewählten Wirt-Parasit System analysiert. Die Untersuchung deckte Frühjahr, Sommer und Herbst bzw. die Monate April, Juli und Oktober 2006 ab, wobei acht mittelgroße Barben jeweils pro Saison von einer Probestelle (Kozloduy, 685 km) entnommen wurden. Nach der parasitologischen Untersuchung wurde die Anzahl der Acanthocephalen und das Frischgewicht deren Infrapopulationen erhoben. Zusätzlich wurde die mittlere individuelle Masse von *P. laevis* für jede Barbe berechnet, als das Infrapopulationsgewicht geteilt durch die Anzahl der Würmer. Der Zweck dieser morphologischen Berechnung war Informationen über den Entwicklungszustand der Acanthocephalen im Endwirt zu erhalten. Darüber hinaus bringt die individuelle Wurmmasse auch weitere Erkenntnisse bezüglich der Oberflächen – Volumen-Verhältnisse von Parasiten, die eine entscheidende Rolle bei der Metallaufnahme spielen können ähnlich wie bei freilebenden Metallindikatoren wie z. B. Muscheln (Luoma und Rainbow, 2008).

Wie erwartet, waren die Konzentrationen der Elemente As, Cd, Cu, Pb und Zn im Parasiten im Vergleich zum Wirtsgewebe (Muskel, Darm und Leber) signifikant höher. Diese Elemente zeigten auch einen ähnlich ausgeprägten jahreszeitlichen Konzentrationsverlauf. Die höchsten mittleren Konzentrationen wurden im Herbst und die niedrigsten im Sommer nachgewiesen. Die Frühjahrswerte lagen im Bereich zwischen den Werten von Herbst und Sommer. Die Tendenz wurde zusätzlich statistisch für die toxischen Metalle Cd und Blei geprüft- deren Gehalte waren im Herbst signifikant höher. Die Konzentration dieser Metalle korrelierte negativ mit dem mittleren individuellen Wurmgewicht, und spiegelte zudem das jahreszeitliche Konzentrationsprofil der akkumulierten Elemente wider. Die berechnete mittlere Parasitenmasse war im Vergleich zu Frühjahr und Sommer im Herbst signifikant niedriger. Ein Zeichen dafür, dass die Acanthocephalen-Infrapopulationen im Herbst überwiegend aus jüngeren Individuen besteht. Dies beeinflusste die Wurmgehälter, da sich jüngere Individuen in der Wachstumsphase durch einen entsprechend intensiveren Metabolismus auszeichnen. Deswegen waren die mittleren Konzentrationen von As, Cd, Cu, Pb und Zn im Herbst am höchsten. Das höhere Oberflächen – Volumen-Verhältnis der jüngeren Acanthocephalen beeinflusste zusätzlich die Metallaufnahme, so wie für freilebende Metallindikatoren bereits beschrieben. Dieser Aspekt muss auch bei dem Metallaufnahmemechanismus der Acanthocephalen berücksichtigt werden, da die

Akkumulation durch die Tegumentoberfläche erfolgt. Zusätzlich brachte die Untersuchung Erkenntnisse über die Saisonalität der Entwicklung von *P. laevis* unter den spezifischen klimatischen Bedingungen im Unterlauf der Donau. Das ausgeprägte Kontinentalklima beeinflusst den Lebenszyklus und die Übertragung der Parasiten, wobei ein jährliches Muster deutlich zu sehen ist. Von den erhobenen Ergebnissen zur Morphologie und Elementzusammensetzung der Acanthocephalen wurde eine grobe Schätzung der Lebensdauer von *P. laevis* im Darm des Endwirtes *B. barbatus* erzeugt. Die Lebensdauer beträgt höchst wahrscheinlich 7-8 Monate.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Metallanreicherung in *P. laevis* von der Saisonalität bzw. von den Entwicklungsstadien der Parasiten abhängig ist.

4) *Die Metallkonzentrationen im Acanthocephalen Pomphorhynchus laevis spiegeln die Konzentrationen in der Umwelt wider.*

Die Metallmonitoringstudie mit Hilfe von Fischacanthocephalen wurde überwiegend entlang des bulgarischen Donauabschnitts durchgeführt. Zuerst wurde versucht ein Längsprofil der gewählten Flussstrecke zu erzeugen. Aus diesem Grund wurden im Sommer 2006 jeweils acht Barben von drei Probestellen entlang der Donau (Vidin, 834; Kozloduy, 685; Silistra, 375 km) untersucht. Zusätzlich wurde eine Langzeitmonitoringstudie im Unterlauf der Donau durchgeführt, die vier Jahre umfasste. Die Studie wurde an der Probestelle Kozloduy durchgeführt, die als Referenzstelle im Unterlauf gewählt wurde. Von dieser Stelle wurden in jedem Sommer in dem Zeitraum 2004 bis 2007 acht Fische entnommen. Im Jahr 2007 wurde noch eine weitere Studie durchgeführt, welche für einen Vergleich zwischen dem Ober- und Unterlauf der Donau diente. Für diesen Zweck wurden von vier Probestellen in Mitteleuropa Barben beprobt und mit der Probestelle Kozloduy im Unterlauf verglichen. Die Fische von Mitteleuropa stammten aus Probestellen in der Nähe von Wien (1930 km), Bratislava (1869 km), Szob (1707 km) und Budapest (1648 km) und wurden während der zweiten Donau Forschungsexpedition (JDS2) im Sommer 2007 gefangen.

Die Acanthocephalen und die Fischgewebe (Muskel, Darm, Leber) wurden auf den Gehalt mehrerer Elemente (As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn) analysiert und es wurden Gehaltprofile erstellt. Die Konzentrationen im Parasit – Wirt-System wurden sowohl mit den Wasserdaten im Zeitraum 2004-2007 (monatliches Metallmonitoring des Wasserkörpers im Rahmen der TransNational Monitoring Network Programm) als auch mit den Metalldaten (zu Wasser und Schwebstoffen (SPM)) von beiden Donauexpeditionen (JDS1 in 2001 und JDS2 in 2007) verglichen (Literathy *et al.* 2002, 2009; TNMN, 2009).

Von den analysierten Elementen As, Cd, Cu, Pb und Zn wurden im Vergleich zu den Wirtsgeweben wieder signifikant höhere Konzentrationen in *P. laevis* gefunden. Um einen Vergleich zwischen den Konzentrationen im Parasit und im Wasser zu erlauben, wurden die mittleren Biokonzentrationsfaktoren bezüglich des Wassers berechnet. Damit zeigte sich ein höherer Anreicherungsgrad für die Schwermetalle Cd, Cu, Pb und Zn in den Acanthocephalen. Das Längsprofil dieser Elemente in den Parasiten spiegelte das Längsprofil der Metallgehalte des Wassers und der Schwebstoffe wider. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für das Element As beobachtet. Generell senken sich die Gehalte von As, Cd, Pb im Lauf der Donau in Bulgarien ab. Die essenziellen Metalle Cu und Zn wiesen höhere Konzentrationen an der oberen (Vidin) und an der unteren Probestelle (Sillistra) auf. Der Grund dafür sind zwei Nebenflüsse (Fluss Timok und Fluss Russenski Lom), die als die größten Verschmutzungsquellen für Cu und Zn von der ICPDR bezeichnet werden.

Das durchgeführte Langzeitmetallmonitoring an der Stelle Kozloduy zeigte eine Verbesserung der Wasserqualität bezüglich der vom Parasit akkumulierten Metalle. Mit der Ausnahme von Arsen senkten sich die Gehalte von Cd, Cu, Pb und Zn im Zeitraum vom Sommer 2004 bis Sommer 2007 ab. Die Tendenz wird zum Teil von den Hintergrunddaten der ICPDR belegt.

Die Vergleiche zwischen Ober- und Unterlauf der Donau zeigen generell eine deutliche Metallgehalterhöhung im Unterlauf an der Probestelle Kozloduy. Besonders deutlich zeigt sich dies für die Elemente Cd und Pb. Die höheren Konzentrationen in der bulgarischen Donaustricke stehen unter dem Einfluss zweier großer Nebengewässer (Tisa und Sava), die im Gesamtverlauf der Donau von km 1000 bis zum Donaudelta zu Belastungen durch Schwermetalle führen (Literathy *et al.* 2009). Für detaillierte Analysen waren noch zusätzliche Rohdaten der zweiten Donauforschungsexpedition erforderlich.

Die Metallgehalte im Parasit spiegeln die Konzentrationen in der Umwelt wider. Die beobachtete Tendenz in den Parasitengehalten wird von den Ergebnissen der unterschiedlichen Donaumonitoringprogramme bestätigt.

### ***Schlussfolgerungen***

Die durchgeführte faunistische Untersuchung im Rahmen der Dissertation lieferte eine neue Wirtsmeldung für drei parasitische Arten. Die Nematoden der Gattung *Eustrongylides* sp. und *Hysterothylacium* sp und der Acanthocephale *L. plagicephalus* wurden zum ersten Mal für den Wirt *B. barubs* beschrieben, wobei *Eustrongylides* sp. einer der häufigsten Vertreter im Unterlauf der Donau war. Die Parasitenfauna der Barbe wies beim Vergleich der derzeitigen Ergebnisse mit den zuletzt publizierten Daten aus den 1960-er und 70-er Jahren (Kakacheva-

Avramova, 1962, 1977; Margaritov, 1959, 1966) generell große Unterschiede auf. Ein möglicher Grund dafür liegt bei den veränderten Bedingungen im Unterlauf der Donau in den letzten 40 Jahren.

Die abgedeckten Aspekte bezüglich der Anwendung von Fischparasiten als Indikatoren unterstützen deren Einsatz im Bereich des aquatischen Monitorings sowohl als Effektindikatoren als auch als Akkumulationsindikatoren. Ihre Anwendung als Effektindikatoren war von der Artenzusammensetzung unterstützt, da das Vorkommen der Parasiten zum Teil die Umweltbedingungen widerspiegeln. Zusätzlich lieferten die Diversitätsindizes ähnliche Tendenzen, die den Belastungsgradienten in der Donau folgten.

In der Dissertation wurden diverse, bisher nicht untersuchte, Aspekte betrachtet, welche den Einsatz von Fischacanthocephalen als Akkumulationsindikatoren verhindern könnten (wie z.B. der Einfluss der Infrapopulationsgröße, der Geschlechterzusammensetzung und der Saisonalität auf die Metallanreicherung). Aus den erhobenen Ergebnissen können folgende Rückschlüsse gezogen werden:

- Die Infrapopulationsgröße übt keinen großen Einfluss auf den Metallgehalt in *P. laevis* aus. Darüber hinaus sollte die Befallsintensität bei Metallmonitoringsstudien mit der Hilfe von Fischacanthocephalen nicht berücksichtigt werden.
- Die Geschlechterzusammensetzung der Parasiteninfrapopulationen muss nicht in Betracht gezogen werden, da beide Geschlechter ähnliche Tendenzen bei der Metallanreicherung gezeigt haben.
- Der Metallanreicherungsprozess ist von der Saisonalität bzw. vom Parasitenentwicklungsstadium im Endwirt abhängig. Darüber hinaus sollten bei den Beprobungszeiten unter anderem die lokalen klimatischen Bedingungen berücksichtigt werden.

Die Fischacanthocephalen, konkret *P. laevis*, scheinen sehr vielversprechend für Metallindikationszwecke zu sein. Die enorme Akkumulationskapazität besonders für toxische Elemente wie As, Cd und Pb zeichnet sie als ein perfektes Werkzeug im Bereich des aquatischen Monitorings aus. Trotz der höheren Mobilität des Fischwirtes, spiegelten die Konzentrationen in *P. laevis* jene der Umwelt wider und lieferten ein anschauliches Bild über die Metallbelastung der Donau. Der erste Schritt für den Einsatz von Fischen als Metallindikatoren wurde während der zweiten Donauforschungsexpedition (JDS2) gemacht (Literathy *et al.* 2009). Im Rahmen der Dissertation wurde bewiesen, dass im Gegensatz zur

alleinigen Analyse von Fischgewebe, die zusätzliche Anwendung von Fischparasiten als Metallindikatoren ein vielversprechenderes Verfahren darstellt.