

# **Einsatz von Biomarkern zur Erfassung möglicher Wirkungen von elektromagnetischen Feldern und Temperaturen auf marine Organismen unter Laborbedingungen**

**FKZ 0329954**



Institut für Angewandte Ökologie  
Forschungsgesellschaft mbH  
Alte Dorfstr. 11  
18184 Neu Broderstorf

Fon 038204/618-0  
Fax 038204/618-10  
[info@ifaoe.de](mailto:info@ifaoe.de)  
[www.ifaoe.de](http://www.ifaoe.de)

**Das dem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit unter dem Förderkennzeichen 0329954 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung liegt bei den Autoren.**

## **verantwortliche Autoren**

Projektleitung: Prof. Dr. H. Sordyl

Feldmessungen Windpark: Dr. K. Meißner  
Dipl. Ing. K. Brosda  
Dipl. Geogr. H. Pehlke  
Dipl. Ing. J. Bockhold (Technik; Fa. JeBo-Elektronik )

Biomarker-Untersuchung: Dr. J. Gercken  
B. Bernau  
C. B. Borrmann  
M. Sundt

Untersuchung an  
Immunzellen der Maus: PD. Dr. M. Simkó; FB Biologie, Universität Rostock

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Veranlassung und Zielsetzung der Studie</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Feldmessungen der Meeresbodentemperatur an Seekabeln im Offshore-Windpark Nystedt</b>	<b>4</b>
2.1	Einführung in die Untersuchung	4
2.2	Methoden	6
2.3	Ergebnisse	12
2.4	Zusammenfassende Diskussion	31
<b>3</b>	<b>Biomarker als diagnostische Instrumente für Umweltstress</b>	<b>35</b>
3.1	Biomarker-Ansatz	35
3.2	Zur Bedeutung der ausgewählten Biomarker	37
3.2.1	Stressproteine (Heat Shock Proteins)	37
3.2.2	Comet-Assay	38
3.2.3	Metallothionein-Induktion	38
3.2.4	Acetylcholinesterase-Hemmung	39
3.2.5	Lipidperoxidation	39
3.2.6	Stabilität der Lysosomenmembran (Neutralrot-Test)	40
3.2.7	Phagozytose-Aktivität	40
3.2.8	Histologische Untersuchung	41
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>42</b>
4.1	Testorganismus und Untersuchungsmaterial	42
4.2	Probenmaterial und Zwischenhälterung	42
4.3	Entnahme von Gewebeproben für einzelne Untersuchungen	42
4.4	DNA-Schädigung (Comet-Assay)	43
4.5	Nachweis des Stressproteins-70 (Hsp70)	43
4.5.1	Nachweis der Hsp70-Expression im Western Blot	43
4.5.2	Nachweis der Hsp70-Expression mit der Durchflusszytometrie	45
4.6	Neutralrot-Test	45
4.7	Phagozytose-Aktivität	46
4.8	Metallothionein-Bestimmung	46
4.9	Lipidperoxidation	47
4.10	AChE-Aktivität	47
4.11	Histologische Untersuchungen	48
<b>5</b>	<b>Wirkung thermischer Belastung auf marine Invertebraten</b>	<b>49</b>
5.1	Biologische Wirkungen von thermischem Stress	49
5.2	Versuchsanlage zur thermischen Exposition mariner Invertebraten	51
5.3	Biomarker-Untersuchungen an der Miesmuschel <i>Mytilus edulis</i> nach Exposition auf erwärmtem Sediment – Ergebnisse und Diskussion	53
5.3.1	Zur Konzeption und Methodik der Temperatur – Versuche	53
5.3.2	Reaktion des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten	54

5.3.2.1	Streulichtcharakterisierung der untersuchten Hämocyten	54
5.3.2.2	Nachweis von Hsp70 in Hämocyten mittels Immunoblot	56
5.3.2.3	Hsp70-Expression in Hämocyten bei starker thermischer Belastung	57
5.3.2.4	Hsp70-Expression in Hämocyten bei schwacher thermischer Belastung	58
5.3.2.5	Hsp70-Expression im Kiemengewebe	61
5.3.3	Biomarker für Effekte von oxidativem Stress	64
5.3.4	AChE-Aktivität im Kiemengewebe	67
5.3.5	Gentoxische Schädigung	68
5.3.6	Histologische Untersuchungen	70
5.4	Migrationsverhalten von <i>Corophium volutator</i> und <i>Marenzelleria neglecta</i> nach thermischer Exposition	72
5.4.1	Einleitung	72
5.4.2	Untersuchte Arten	72
5.4.3	Experimenteller Versuchsaufbau	73
5.4.4	Ergebnisse	76
5.4.4.1	Temperaturmessung	76
5.4.4.2	Reaktionsverhalten von <i>Corophium volutator</i>	76
5.4.4.3	Reaktionsverhalten von <i>Marenzelleria neglecta</i>	76
<b>6</b>	<b>Versuche mit 50Hz-EMF – Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>78</b>
6.1	Biologische Wirkungen von elektromagnetischen Feldern	78
6.1.1	Wirkungen von ELF-EMF auf Wirbeltiere	78
6.1.2	Wirkungen von ELF-EMF auf wirbellose Organismen	79
6.2	Untersuchungen an Immunzellen der Maus	80
6.2.1	Methoden und Ergebnisse	80
6.3	50Hz-EMF-Exposition von Miesmuscheln	84
6.3.1	Versuchsanlage und Expositionsbedingungen	84
6.3.2	Durchführung der Befeldung und methodisches Vorgehen	84
6.3.3	Zur Konzeption und Methodik der EMF-Versuche	85
6.3.4	Ergebnisse und Diskussion	86
6.3.4.1	Expression von Hsp70 nach kurzzeitiger Magnetfeld-Exposition	86
6.3.4.2	Expression von Hsp70 nach längerer Magnetfeld-Exposition	88
6.3.5	Stabilität der lysosomalen Membran	89
6.3.6	Phagozytose-Aktivität von Hämocyten	91
6.3.7	Comet-Assay	92
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Schlussfolgerungen</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Anlage</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
A.demin.	entionisiertes Wasser
AWZ	ausschließliche Wirtschaftszone
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrografie
Comet-Assay	Einzelzell-Gelelektrophorese
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DHR	Dihydrorhodamin 123
DTNB	Dithiobisnitrobenzoat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELF-EMF	Extremly-Low-Frequency-EMF
EMF	Elektromagnetisches Feld
FI	Fluoreszenzintensität
FSC	Vorwärtsstreulicht
HELCOM	Helsinki-Kommission zum Schutz der Ostsee
HSP	Heat Shock Protein
ICES	International Council for the Exploration of the Sea (Internationaler Rat für Meeresforschung)
IfAÖ	Institut für Angewandte Ökologie GmbH Neu Broderstorf
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MDA	Malondialdehyd
MDD	Mitteldarmdrüse
MF	Magnetfeld
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
MT	Metallothionein
MTP	Mikrotiterplatten
NO	Stickoxide
NR	Neutralrot (Vitalfarbstoff)
NRR	Neutralrot-Retentions-Test
OSPAR	Oslo-Paris-Abkommen zum Schutz der Meeresumwelt von Nordost-Atlantik und Nordsee
SSC	Seitwärtsstreulicht
WEA	Windenergieanlage

## 1 Veranlassung und Zielsetzung der Studie

Bereits seit einigen Jahren nimmt der Anteil erneuerbarer Energien an der weltweiten Energieversorgung stetig zu. Zu dieser Entwicklung haben unter anderem gestiegene Preise für fossile Energieträger, instabile Rohstoffmärkte und die Reaktion auf den mittlerweile eindeutig dokumentierten globalen Klimawandel als Folge der Verbrennung fossiler Energieträger beigetragen.

Für die Bundesrepublik Deutschland sieht das Konzept zur zukünftigen Energieversorgung einen starken Ausbau des Anteils an erneuerbaren Energien vor. So soll sich deren Anteil an der Stromversorgung bis 2010 auf mindestens 12,5% und bis 2020 auf mindestens 20% erhöhen. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen regenerative Energiequellen wie Biomasse, Solarenergie, Geothermie und Windkraft besonders gefördert werden.

Die Windenergie nimmt bereits jetzt einen hohen Stellenwert an der Stromerzeugung mit erneuerbaren Energien ein. Im Jahr 2004 lag ihr Anteil an der Strombereitstellung bei 3,1%. Mit 3,5% besaß nur die Wasserkraft einen ähnlich hohen Anteil (Staiß et al., 2004).

Neben einer weiteren Zunahme der an Land erzeugten Windenergie, soll zukünftig die Nutzung der Offshore-Windenergie einen bedeutenden Beitrag zur Stromerzeugung leisten (Pschorr-Schoberer et al., 2006). Bis 2030 soll der Anteil der Windenergie mindestens 25% der Stromerzeugung ausmachen, wobei die im Meer installierten Windparks mit 15% einen größeren Anteil einnehmen sollen als die an Land genutzte Windenergie (BMU, 2007). Aus der Sicht des Bundesumweltministeriums könnten etwa 1.500 Megawatt installierter Offshore-Leistung bis Ende 2011 erreicht werden (Rede Bundesumweltminister Gabriel am 23.03.2007 in Bremerhaven).

Derzeit existiert in der deutschen 12-Seemeilen-Zone und in der ausschließlichen Wirtschaftszone (AWZ) noch kein in Betrieb befindlicher Offshore-Windpark. Nach Angaben des für die Genehmigung von Windparks in der AWZ zuständigen Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrografie (BSH) wurden bislang 15 Offshore-Windparks in der Nordsee und 3 Windparks in der Ostsee genehmigt. Zahlreiche weitere befinden sich im Planungsstadium.

In der ersten Ausbaustufe umfassen Offshore-Windparks i.d.R. 80 einzelne Windenergieanlagen (WEA). In der AWZ sollen Windparks in der Endausbaustufe aus bis zu 200 WEA bestehen. Angesichts dieser Dimensionen muss im Rahmen des Genehmigungsverfahrens sorgfältig geprüft werden, ob vom Bau und/oder Betrieb eines Windparks eine Gefährdung für das marine Ökosystem ausgeht. Aus ökologischer Sicht stehen dabei insbesondere Wirkungen auf die benthische Fauna und Flora sowie auf den Vogelzug im Fokus einer Umweltverträglichkeitsprüfung (Merk & von Nordheim, 2000).

Bei der Diskussion über potenzielle Wirkungen auf die Meeresumwelt wurden den zahlreichen im Bereich eines Windparks verlegten stromführenden Seekabeln und der Kabelanbindung an das landseitige Verbundstromnetz bislang wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Angesichts der großen Anzahl einzelner WEA, ist die von Stromkabeln beanspruchte Fläche jedoch nicht zu vernachlässigen (WWF, 2006). Das Institut für Angewandte Ökologie GmbH (IfAÖ) und die OECOS GmbH haben hierzu im Auftrag von Vattenfall Europe Transmission GmbH für die deutsche Ostsee eine vertrauliche „Gutachterliche Analyse zu ausgewählten Aspekten des möglichen Endausbaus installierter Windkraft auf dem Gebiet der deutschen Ostsee (2007)“ angefertigt, aus der hervorgeht, dass der jetzige Planungsstand der Windparks bis 2015 für den Bereich der deutschen Ostsee durchaus realisiert werden könnte. Daraus ergibt sich als Konsequenz, dass auch der landseitige Anschluss der Anlagen durch Seekabel erfolgen muss.

Während des Betriebs eines Windparks können sich die im Meeresboden verlegten Kabel stark erwärmen und dadurch das sie umgebende Sediment thermisch belasten. Je nach verwendetem Kabeltyp emittieren die Kabel auch elektrische und magnetische Felder (EMF) von unterschiedlicher Stärke. Zu dieser Problematik liegt eine aktuelle Literaturstudie aus dem Jahr 2006 vom IfAÖ GmbH im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz (BfN) vor (Meißner et al., 2006: Impacts of submarine cables on the marine environment – A literature review). Insgesamt belegt die Studie, dass Aussagen zur Sedimenterwärmung im Bereich von Seekabeln lediglich auf Abschätzungen im Rahmen von Modellrechnungen beruhen. Konkrete Daten aus Feldmessungen liegen bislang nicht vor. Die in der Studie zitierte Literatur ist diesem Bericht als Anlage angefügt.

Was die potenziellen Wirkungen von Seekabeln auf marine Organismen betrifft, betrachten die wenigen diesbezüglichen Studien hauptsächlich einen möglichen Einfluss der generierten EMF auf das Verhalten von Fischen, insbesondere auf deren Wanderungsbewegungen (BIO/CONSULT, 2004; Engell-Sorensen, 2002). Von Gill et al. (2005) liegt eine Literaturstudie zu diesem Themenkomplex vor, in der hauptsächlich Untersuchungen an Knorpel- und Knochenfischen und nur sehr wenige an Invertebraten unternommene Studien zitiert werden.

Erkenntnisse über die Wirkungen einer von Seekabeln ausgehenden Meeresboden-erwärmung und Emittierung von niederfrequenten EMF auf die im und auf dem Sediment siedelnden wirbellosen Organismen gibt es derzeit praktisch nicht.

Vor diesem Hintergrund sollte das hier vorgestellte Projekt erste Befunde zur Reaktion von benthischen Organismen auf eine thermische Belastung und auf niederfrequente EMF liefern. Das Vorhaben zielte dabei nicht auf Feldversuche ab, vielmehr wurden unter Laborbedingungen in der Umwelttoxikologie gebräuchliche Biomarker (Gercken & Sordyl, 2007) als Indikatoren einer Stressreaktion betrachtet. Für die Bewertung potenzieller biologischer Effekte von elektrischen Seekabeln ist die Untersuchung von zellulären Indikatoren (Biomarker) ein grundsätzlich neuer methodischer Ansatz.

Im Rahmen einer ganzheitlichen Risikoanalyse stellen Biomarker ein wichtiges Instrument zur Bewertung des potenziellen von Offshore-Windkraftanlagen und deren Netzanbindung ausgehenden Umweltrisikos dar. Im Rahmen des „klassischen“ Umweltmonitorings werden Biomarker zunehmend zur Ermittlung von Umweltstress durch Schadstoffe und andere Stressfaktoren eingesetzt (Gercken & Sordyl, 2007).

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Teilprojekte durchgeführt:

1) In einem Offshore-Windpark (Nysted, Dänemark) wurden Feldmessungen im Bereich der dort verlegten Seekabel durchgeführt, um erstmalig konkrete Daten zur Seebodenerwärmung unter realistischen Betriebsbedingungen zu erhalten. Hierzu musste eine praxistaugliche Messkette und die entsprechende Datenübertragung entwickelt werden.

2) Im Labor wurde in einer speziell entwickelten Versuchsanlage die Wirkung von thermischem Stress auf benthische wirbellose Organismen untersucht. Bei der Hälterung wurde nur das Bodensediment mit Hilfe von Heizkabeln erwärmt, während die Temperatur des Hälterungswassers konstant blieb. Auf diese Weise sollten die potenziell im Freiland vorliegenden Temperaturbedingungen simuliert werden.

Unter dem Einfluss eines Temperaturgradienten erfolgten Untersuchungen zum Migrationsverhalten des Schlickkrebsses *Corophium volutator* und des Borstenwurms *Marenzelleria neglecta* bei thermischer Belastung.

An der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) wurden die Reaktionen von Biomarkern nach einer Exposition auf dem erwärmten Sedimentboden erfasst. Bei den Biomarkern handelte es sich um das Stressprotein Hsp70, Endpunkte von oxidativem Stress, die Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase und Gentoxizität.

Die Exposition der Miesmuscheln erfolgte vorwiegend bei einer geringen thermischen Belastung ( $\Delta T=2-3K$ ), da die konkreten Ergebnisse der Feldmessungen im Windpark Nysted (Teilprojekt 1) ergeben hatten, dass die Erwärmung des Sediments nahe der Oberfläche gering ist.

3) In Laborversuchen wurden Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) mit 50Hz-Magnetfeldern unterschiedlicher Flussdichte (100-1000 $\mu T$ ) für kurze (1h) und längere Zeit (16h) befeldet. Anhand verschiedener Biomarker (Stressprotein-Hsp70, Lysosomenstabilität, Phagozytose, DNA-Strangbrüche) wurde die potenzielle Wirkung des Magnetfeldes auf die Immunzellen (Hämocyten) der Muschel untersucht.

In Kooperation mit der Universität Rostock (Fachbereich Biologie) erfolgten parallel dazu Untersuchungen zur Wirkung von 50Hz-Magnetfeldern auf Immunfunktionen von Knochenmarksmakrophagen der Maus.

## **2 Feldmessungen der Meeresbodentemperatur an Seekabeln im Offshore-Windpark Nysted Havmøllepark (Dänemark)**

### **2.1 Einführung in die Untersuchungen**

Begleitend zu den im Labor durchgeführten Biomarker-Untersuchungen über mögliche Wirkungen von elektromagnetischen Feldern und thermischer Exposition auf benthische Organismen wurden im Offshore-Windpark Nysted (Dänemark, Ostsee) Feldmessungen der Meeresbodentemperatur im Bereich der dort verlegten Seekabel durchgeführt (Abb. 1).

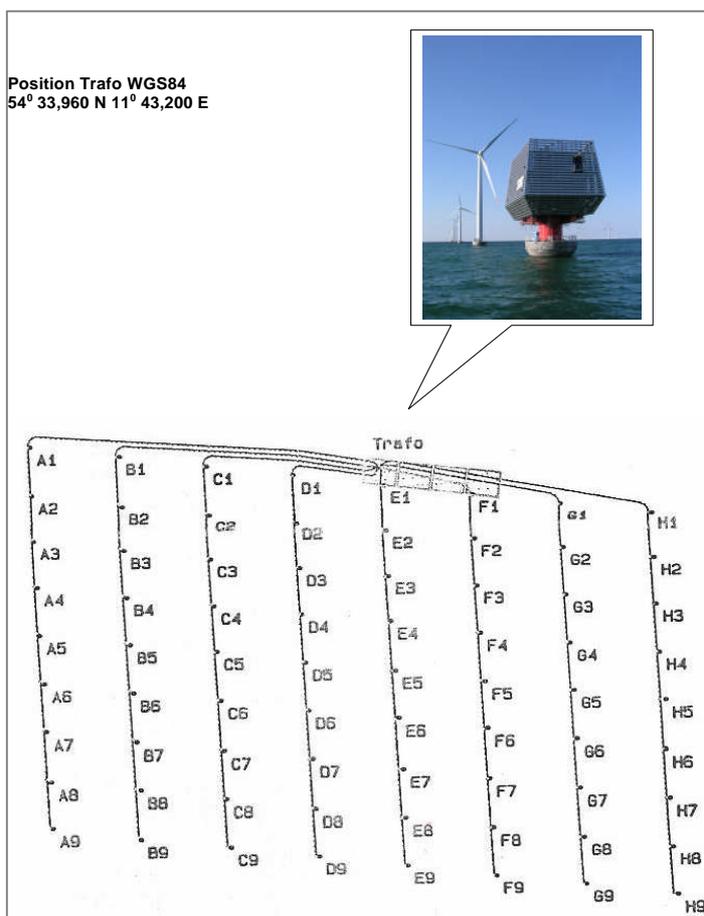
Die dänischen Kooperationspartner für dieses Vorhaben waren SEAS Transmission A/S und DONG Energy A/S (früher ENERGI E2 A/S). Die mathematische Modellierung der Seebodenerwärmung in der Umgebung von Stromkabeln wurde häufig im Rahmen von Genehmigungsverfahren für Windparks in der deutschen AWZ unternommen. Offensichtlich gibt es keinen einheitlichen Standard für solche Modellierungen, denn die betrachteten Variablen und Methoden bei der Berechnung waren recht unterschiedlich. Aus diesen Gutachten konnte jedoch postuliert werden, dass für das Ausmaß des Temperaturanstieges im Seeboden Faktoren wie die Kabeleigenschaften (Kabeltyp), die Übertragungsleistung (Last), die Seebodeneigenschaften (Wärmewiderstand/Wärmedurchlasskoeffizient des Sedimentes) und die Umgebungsbedingungen entscheidend sind. In der Regel waren die Modellierungen orientiert an einer Vorgabe des Bundesamtes für Naturschutz, dem so genannten 2K – Kriterium, welches eine Temperaturerhöhung von  $\Delta T < 2K$  20cm unter der Sedimentoberfläche im Bereich der AWZ für tolerabel ausweist. Nach den Angaben der Antragsteller für Offshore-Windpark-Projekte lässt sich dieses Kriterium bei Kabelverlegediefen von etwa 1m in der Regel einhalten. Allerdings werden in größerer Nähe zum Kabel deutlich größere Temperaturänderungen von weit mehr als 10K erwartet. Diese könnten nach Befürchtungen von Ökologen Änderungen der physikochemischen Eigenschaften des Sedimentes, einen Anstieg der mikrobiellen (heterotrophen) Produktion und der Primärproduktion sowie eine Verschiebung des Artenspektrums angefangen von der Bakterienfauna über das Mikro- und Makrophytobenthos bis hin zum Meio- und Makrozoobenthos nach sich ziehen.

Ziel der Messungen im Offshore-Windpark Nysted Havmøllepark war es, erstmals die tatsächlich vorliegenden Seebodentemperaturen im Bereich der elektrischen Kabel in einem Offshore-Windpark zu ermitteln und die Ergebnisse dieser Messungen mit den Voraussagen zur Meeresbodenerwärmung auf Grundlage theoretischer Modellierungen zu vergleichen.

Die Schaffung der technischen Voraussetzungen für die kontinuierliche Messung der Temperatur in verschiedenen Bodentiefen und im bodennahen Wasserkörper an einem Elektrokabel, einschließlich der Datenübertragung, war ebenfalls Gegenstand des Vorhabens.



**Abb. 1:** Lage des Offshore-Windparks Nysted in der Ostsee.



**Abb. 2:** Windpark-internes Kabelnetz (Skizze zur Verfügung gestellt von COMDIVE ApS.). Der Standort der Temperaturmessung befand sich in unmittelbarer Nähe von der Trafostation.

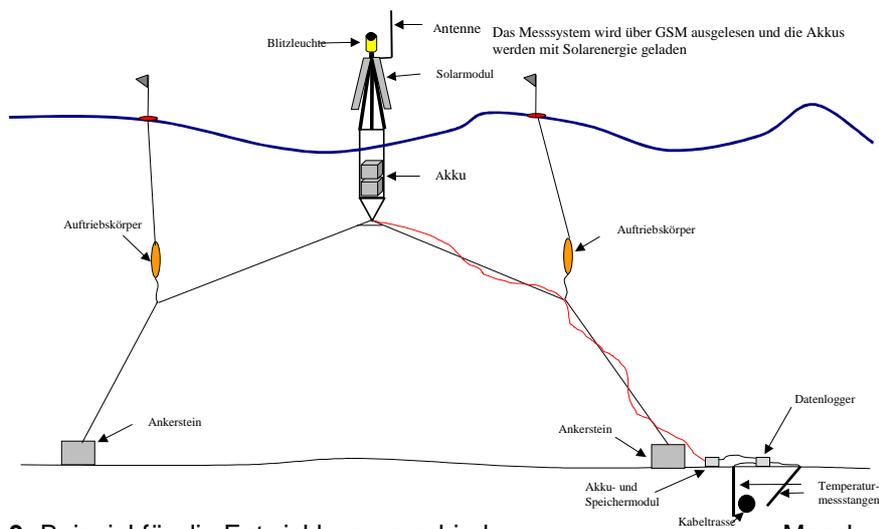
## 2.2 Methoden

Der Offshore-Windpark Nysted liegt 10km südlich von Nysted (Insel Lolland) in der Ostsee (Abb. 1). Die Entfernung zur östlich gelegenen Stadt Gedser an der Südspitze der Insel Falster beträgt zwischen 11-17km. Der Windpark befindet sich in einem Seegebiet mit leicht abfallenden Wassertiefen zwischen 6-9,5m. Der Meeresgrund wird durch Geschiebemergel, der mit Sand überlagert ist, gebildet.

Im Offshore-Windpark Nysted vor der Küste Lollands sind in einer Wassertiefe von 6-9,5m 72 Turbinen mit einer maximalen Leistungskapazität von 2,3MW installiert. Das ergibt eine maximale Gesamtleistung von rund 166MW für den Windpark. Je neun Windenergieanlagen sind in acht Nord-Süd-orientierten Reihen über 30-kV-Kabel (18/30kV AC, 3x185mm<sup>2</sup> Cu, Aluminium, XLPE) miteinander und mit der Transformatorplattform verbunden. Die Anbindung von der Transformatorplattform zum Land erfolgt über ein 132-kV-Kabel (132kV AC, 3x760mm<sup>2</sup> Cu, XLPE) (Abb. 2). Die Kabelverlegetiefe wurde von den Betreibern des Windparks mit 0,5-1m angegeben. Der im Gebiet vorliegende Substrattyp wurde als Geschiebemergel, der mit unterschiedlich starken Schichten von Sand überlagert ist, charakterisiert.

Im Rahmen der technischen Entwicklung wurden zahlreiche Messvarianten konzipiert, auf die hier nicht weiter eingegangen wird (Beispiele Abb. 3). Nach der Entwicklung der endgültigen Messkonfiguration und zahlreichen Funktionstests standen für die Messungen der Seebodentemperaturen zwei baugleiche Messsysteme zur Verfügung (Abb. 4 und 5). Zu jedem Messsystem gehörten zwei Titanrohre, die mit je 16 Sensoren (PT100) bestückt waren (Abb.6 links). Der Abstand zwischen den Sensoren betrug 10cm. Jeder Sensor war einzeln thermisch isoliert, um die Temperaturleitung durch das Rohr zu minimieren. Da die PT100-Sensoren in 4-Draht-Technik betrieben wurden, wurden pro Messstab 64 analoge Eingänge benötigt. Zur Reduzierung dieser Zahl kam ein Multiplexer zum Einsatz. Die Daten wurden in einem Datenlogger (Typ Campbell CR10X) mit 1MB Speicher zwischengespeichert.

Die Datenfernübertragung wurde über das vorhandene IP-Netzwerk der Windparkbetreiber vor Ort (SEAS und DONG Energy) realisiert. Diese Variante des Datentransportes konnte gewählt werden, da alle Temperaturmessungen in der näheren Umgebung der Transformatorplattform durchgeführt wurden. Hierzu wurde ein Daten- und Versorgungskabel durch vorhandene Kabelkanäle in der Transformatorplattform gelegt und von hier mittels eines Com-Port-Servers die Verbindung zum Netzwerk hergestellt. Der Abruf der Daten erfolgte wöchentlich via VPN-Client direkt zur Firma JeBo-Elektronik und von dort zum IfAÖ.



**Abb. 3:** Beispiel für die Entwicklung verschiedener Messkonfigurationen

Nachfolgend werden einige Angaben zur Messgenauigkeit angegeben, die im Rahmen der Entwicklungsarbeiten und des Funktionstests ermittelt wurden.

Verwendeter Temperatursensor: PT100 Chip  
Genauigkeit: DIN IEC 751 Klasse A  
Bedeutet:  $t = \pm (0,15 + 0,002 \cdot t)$   
gültig für Temperaturen von  $-200 \dots +650^\circ\text{C}$  in 3- oder 4-Leiterschaltung

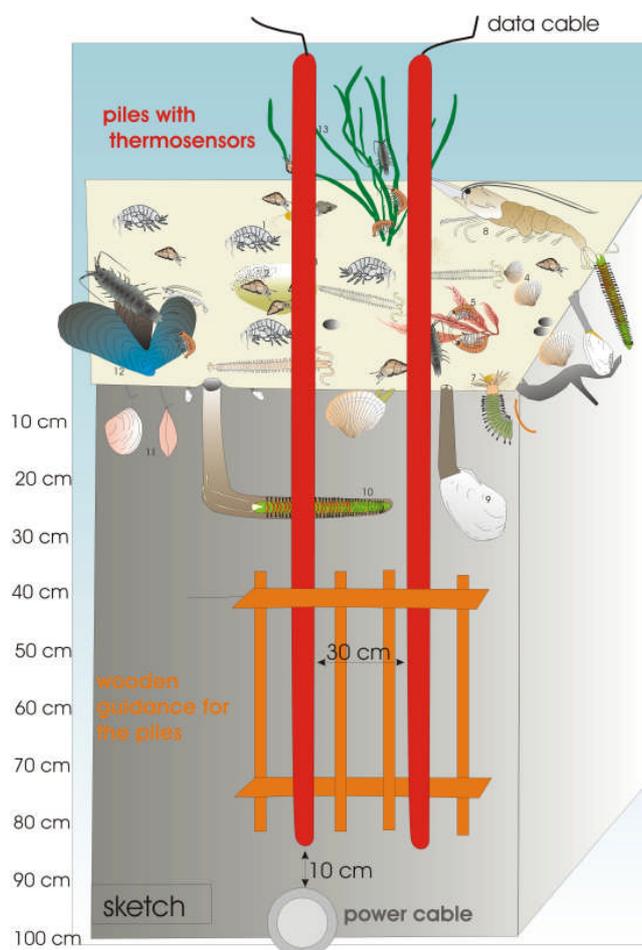
Verwendeter Datenlogger : Campbell CR10X  
Genauigkeit:  $\pm 0,05\%$  of FSR (0 to  $40^\circ\text{C}$ )

Anschluss am Datenlogger: Vierleiterschaltung

Datenweiterverarbeitung: digital

Kalibrierung: Es wurde im Bereich von  $6$  bis  $20^\circ\text{C}$  eine lineare Kalibrierung durchgeführt.

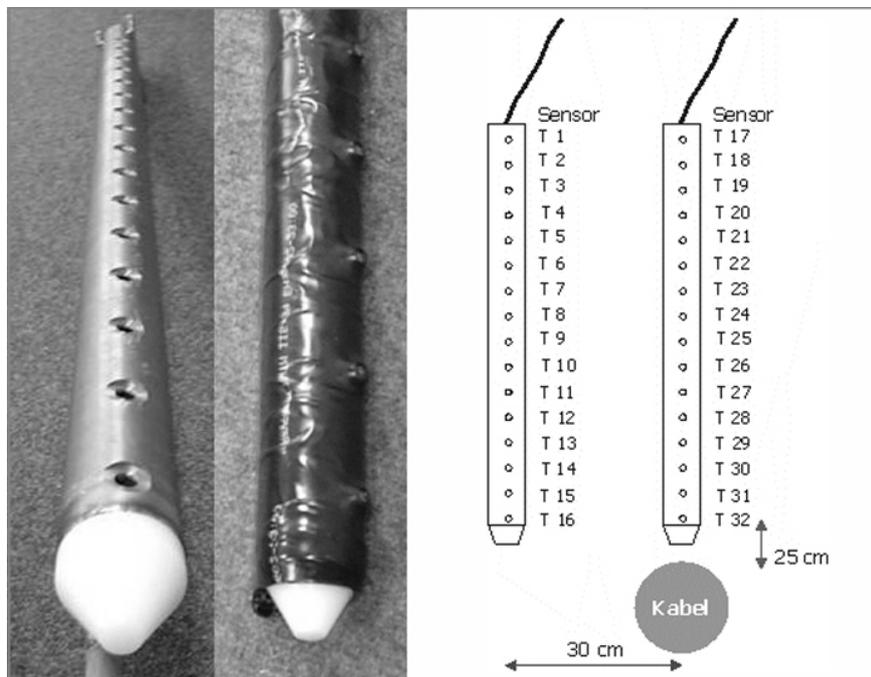
Alle 64 Sensoren hatten in diesem Temperaturbereich keine messbaren temperaturabhängigen Fehler. Die gemessenen Fehler lagen in diesem Temperaturbereich, wie unter DIN IEC 751 festgelegt, im Bereich von  $\pm 0,15\text{K}$ . Die Fehler wurden von uns durch Addition bzw. Subtraktion ausgeglichen. Das zur Kalibrierung benutzte Quecksilberthermometer wurde mit einem Präzisionsthermometer kontrolliert.



**Abb. 4:** Schematischer Messaufbau im Meeresgebiet.



**Abb. 5:** Beispiel einer Messkonfiguration, die im Windpark zum Einbau kam. Die Holzkonstruktion diene als Schutz, damit eine Stromkabelbeschädigung verhindert wird, der Fixierung im Sediment und der Einhaltung eines definierten Abstandes zum Stromkabel.



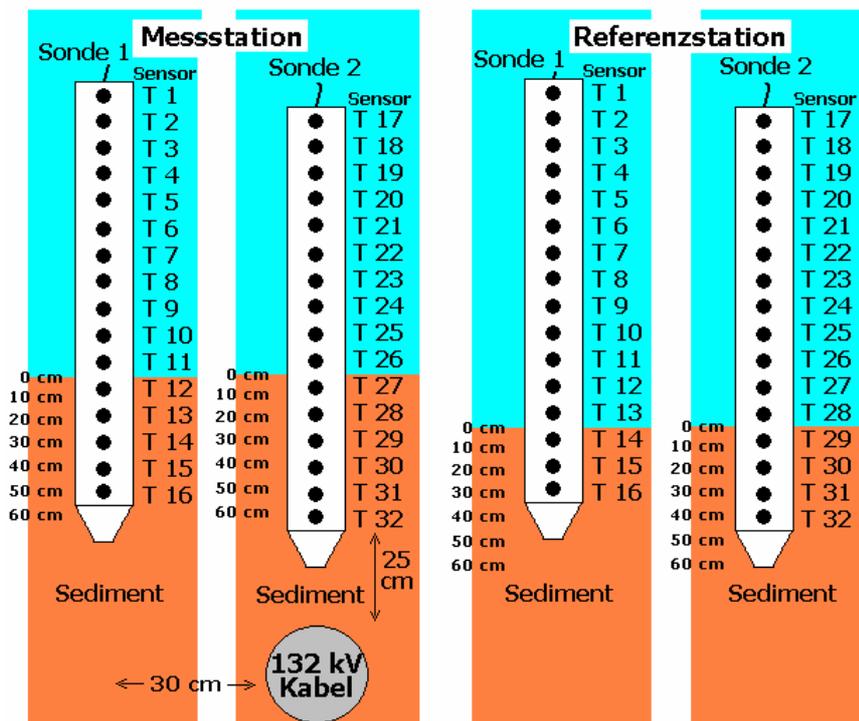
**Abb. 6:** Teile des Messsystems: Titanrohr mit Bohrungen für Anordnung der Sensoren, unterer Teil des Titanrohres mit thermisch isolierten Sensoren, Schema der Anordnung des Messsystems bestehend aus zwei Messstäben über den Kabeln (v.l.n.r.).

Die Temperaturmessungen wurden am 33-kV-Kabel, am 132-kV-Kabel und außerdem an einer Referenzstation durchgeführt. Da nur zwei Messsysteme zur Verfügung standen, wurde am 22.03.2005 zunächst mit Messungen am 33-kV-Kabel und am 132-kV-Kabel begonnen. Die Messstationen lagen in einer Entfernung von etwa 18m (33-kV-Kabel) bzw. 25m (132-kV-Kabel) von der Transformatorplattform. Die Messstation am 33-kV-Kabel wurde dann am 20.09.2005 zugunsten einer Referenzmessstation aufgegeben. Diese Station befand sich ebenfalls unweit der Transformatorplattform abseits der Kabel. Seebodentemperaturen wurden für den Bereich direkt senkrecht über den stromführenden Kabeln und 30cm seitlich versetzt davon ermittelt (Abb. 6 und 7). Die Messsysteme wurden durch Taucher der dänischen Firma COMDIVE APS in den Meeresboden eingespült. Dabei wurde zunächst das Kabel vollständig freigespült, um seine exakte Lage zu bestimmen. Anschließend wurden die Messsysteme in die gewünschte Position gebracht und das Spülloch durch die Taucher mit Strandsand aufgefüllt (Korngrößenmedian d<sub>50</sub> 310–390µm, entspricht Mittelsand). COMDIVE stellte eine schriftliche sowie eine Video-Dokumentation zu den Installationsarbeiten zur Verfügung; jeweils zwei Kopien liegen der IfAÖ GmbH vor (vgl. Abb. 8). Auf den Videobildern sind die beiden aus dem Sediment ragenden Messstäbe zu sehen, die durch Gestelle fixiert sind. Die schlechte Bildqualität resultiert aus den ungünstigen Witterungsbedingungen, daher wurden zu einem besseren Verständnis die Abbildungen 4 bis 7 vorangestellt.

Da für die Interpretation der Messergebnisse detaillierte Kenntnisse über die Positionen der einzelnen Messstationen notwendig sind, werden diese nachfolgend für die Messstation am 132-kV-Kabel erläutert: Die Messstation am 132-kV-Kabel bestand aus zwei Messstangen. (Abb. 7). Eine Messstange befand sich unmittelbar über dem Kabel. Bei der Positionierung der Messstationen am Kabel musste berücksichtigt werden, dass zwischen Kabel und Messstange ein Sicherheitsabstand von mindestens 10cm eingehalten wurde (Abb. 7). Daraus ergab sich ein Abstand zwischen Kabel und erstem Sensor von 25cm, d.h. dass der tiefste Messpunkt im Sediment bei ca. 55cm lag. Die Sensoren T32 bis T27 dienten zur Messung der Sedimenttemperatur und die der Sensoren T26 bis T17 für die Messung der Wassertemperatur.

Die zweite Messstange befand sich seitlich um 30cm versetzt (Abb. 7). Hier dienten die Sensoren T1 bis T11 zur Ermittlung der Wassertemperatur und T12 bis T16 für die Erfassung der Temperatur im Boden.

Bei der Referenzmessung ermittelten die Sensoren T1 bis T13 (Messstange bzw. Sonde 1) sowie T17 bis T28 (Messstange bzw. Sonde 2) die Wassertemperaturen und die Sensoren T14 bis T16 (Sonde 1) bzw. T29 bis T32 (Sonde 2) die Temperaturen der verschiedenen Sedimenttiefen (Abb. 7).



**Abb. 7:** Darstellung der Messstation am 132-kV-Kabel sowie der Referenzstation

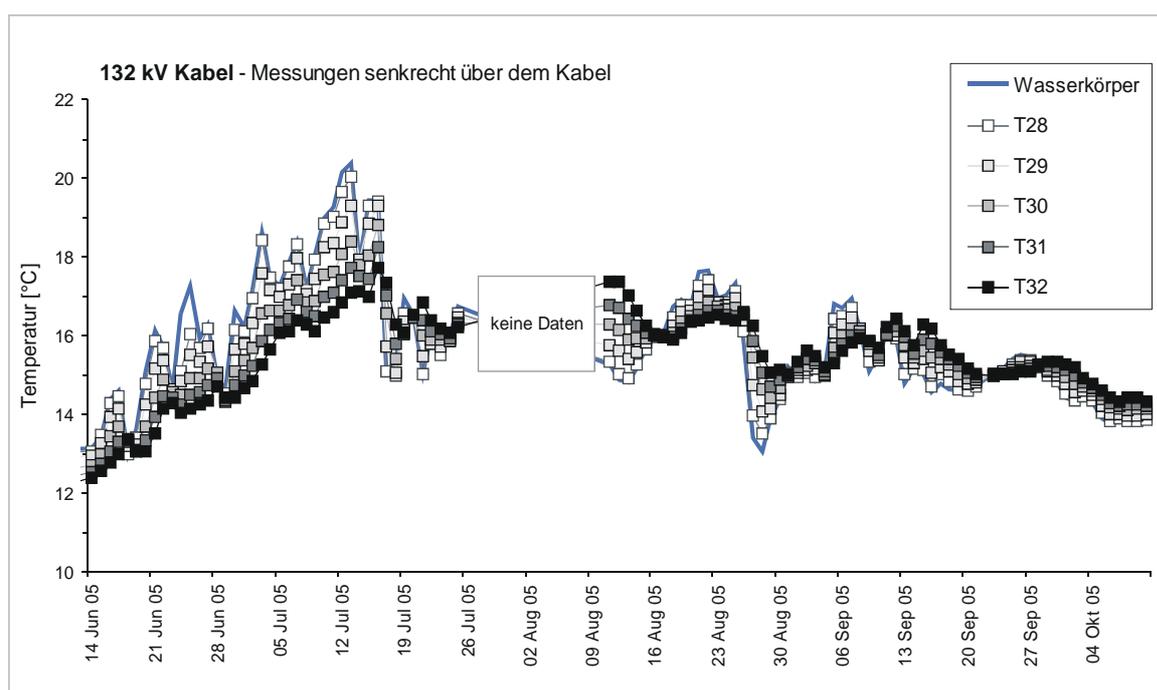


**Abb. 8:** Messsystem 3 Monate nach der Installation (Standbilder aus der Videodokumentation von COMDIVE ApS.).

Für die Dauer von insgesamt etwa einem Jahr, bis zum 27.3.2006, wurden die Temperaturen im Minutentakt für alle 2x32 Sensoren (entspricht 92160 Einzelwerten pro Tag) aufgezeichnet. Ein Datenverlust trat für eines der Messsysteme für wenige Tage im Juli/August 2005 auf (Abb. 9). Alle Daten wurden in einer Datenbank des IfAÖ GmbH gesammelt und analysiert.

## 2.3 Ergebnisse

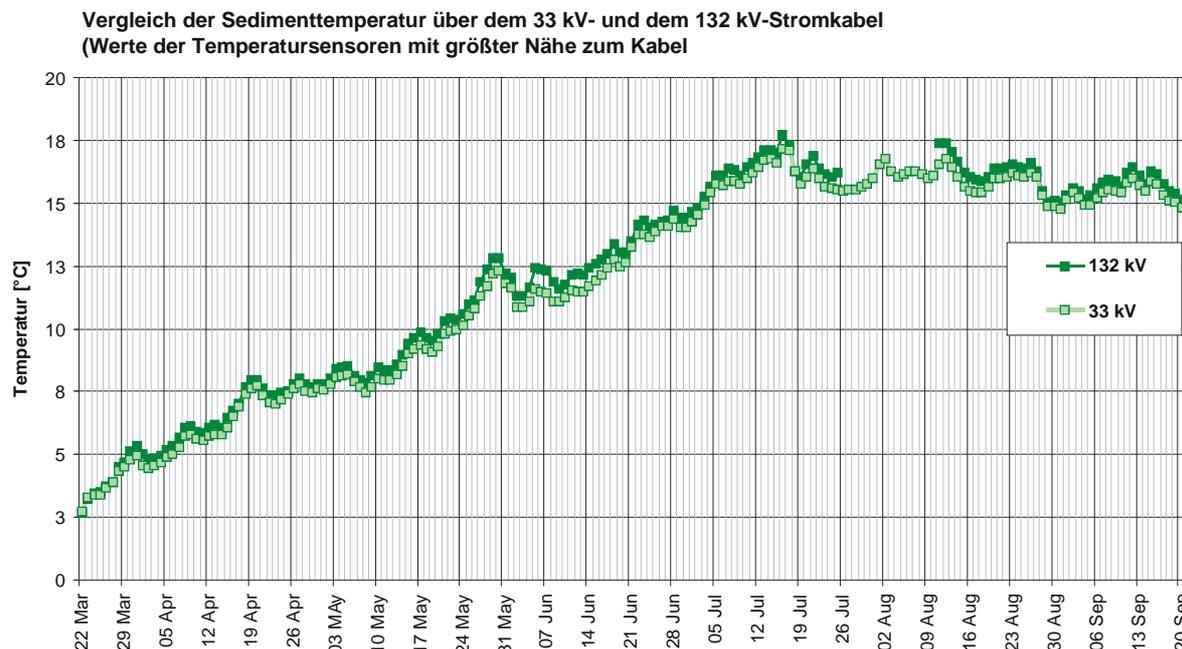
Die Ergebnisse der Messungen haben gezeigt, dass die entwickelten Messkonfigurationen, die Datensammlung und die Datenübertragung unter den Bedingungen einer Langzeitmessung an einem Elektrokabel unter Praxisbedingungen erfolgreich waren. Mit Ausnahme einiger Tage im August konnten über den gesamten Zeitraum an allen Messsonden kontinuierlich Daten ermittelt werden. Die Abbildung 9 gibt an der Messorgel, die senkrecht über dem 132-kV-Kabel installiert war (vgl. Abb. 7), einen Eindruck über die Messkampagne im Zeitraum Juni bis Oktober 2005.



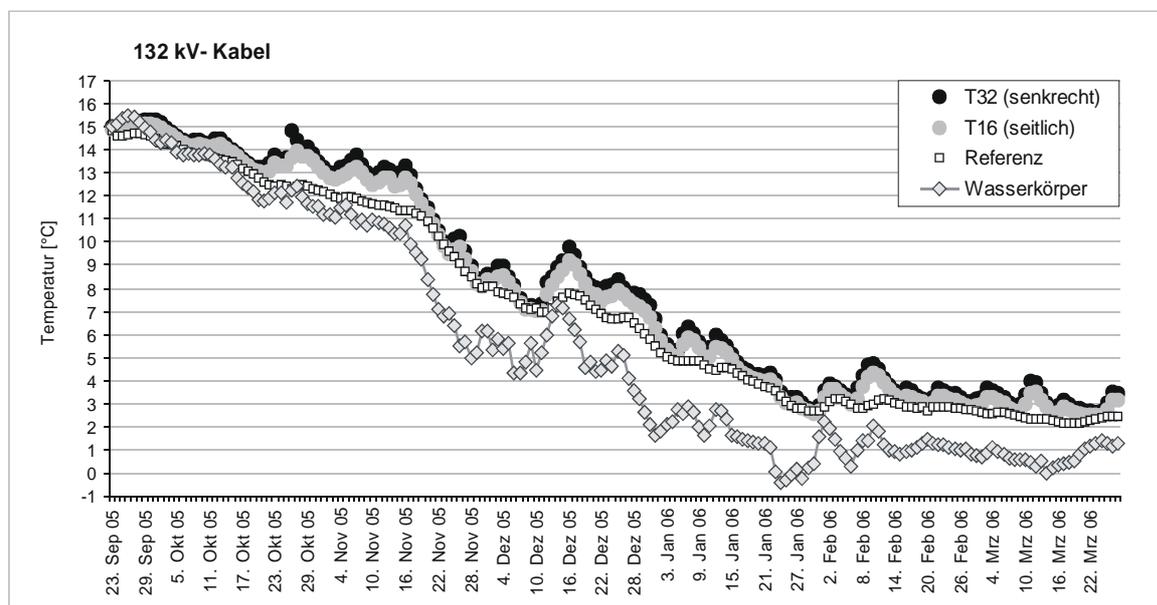
**Abb. 9:** Temperaturmessdaten für die senkrecht über dem 132-kV-Kabel installierte Messstange mit den Temperatursensoren T17 bis T32 für den Zeitraum 14.Juni – 16.Oktober 2005.

Insgesamt kann eingeschätzt werden, dass die Seebodentemperaturen im Untersuchungszeitraum 22.3.-20.9.2005 im Offshore-Windpark Nysted an der Messstation am 132-kV-Kabel stets höher als an der Messstation am 33-kV-Kabel war (Abb. 10).

Die höchste Sedimenttemperatur, die direkt oberhalb des 132-kV-Kabels gemessen wurde (Sensor T32, 25cm Entfernung zum Kabel) betrug 17,7°C und wurde am 16.Juli 2005 registriert. Die Wassertemperatur lag zum selben Zeitpunkt bei 19,4°C. Die größten Unterschiede zwischen den Seebodentemperaturen am 33-kV- und am 132-kV-Kabel traten am 6.Juli 2005 auf, als der Temperatursensor T32 am 132-kV-Kabel eine um 0,9K höhere Temperatur als Sensor T32 am 33-kV-Kabel aufzeichnete.



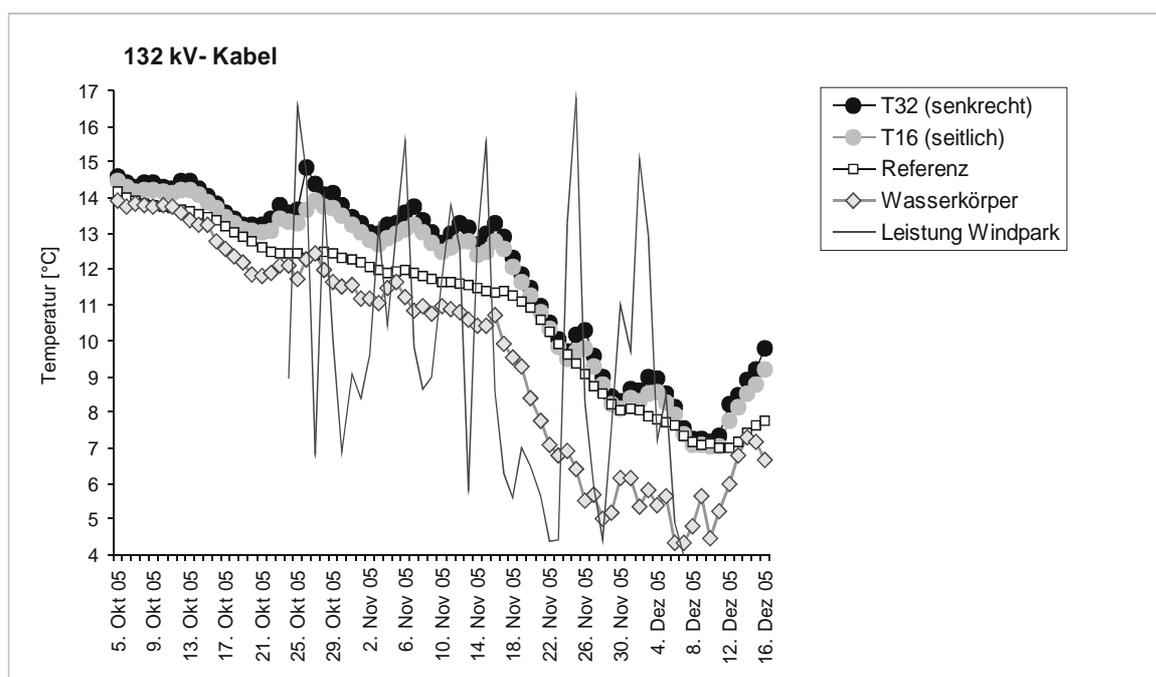
**Abb. 10:** Sedimenttemperaturen am 132-kV-Kabel und am 33-kV-Kabel; dargestellt sind die Daten der Temperatursensoren in größter Nähe zum Kabel (etwa 25-30cm senkrecht über dem Kabel).



**Abb. 11:** Temperaturen aufgezeichnet durch die Sensoren T32 und T16 an der Messstelle 132-kV-Kabel, Temperaturen des Wasserkörpers und Temperaturen an der Referenzmessstelle in vergleichbaren Sedimenttiefen im Zeitraum 23.09.-27.03.2006.

Die Sedimenttemperaturen senkrecht über dem Kabel waren höher als jene 30cm seitlich vom Kabel (Abb. 11). Die maximale Temperaturdifferenz zwischen den Sensoren T32 (senkrecht) und T16 am 132-kV-Kabel betrug 0,5K (12.August 2005), für das 33-kV-Kabel lag dieser Wert bei 0,2K (24.März 2005).

Nach Veränderung der Messanordnung im Feld (Verschiebung des Messsystems am 33-kV-Kabel in einen von der Wärmeemission unbeeinflussten Bereich) konnte ein Vergleich der Seebodentemperaturen am 132-kV-Kabel mit denen unter natürlichen Bedingungen erfolgen. Die in der Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse deuten bereits an, dass das Sediment im Bereich des Kabels erwärmt wird, also zeitweise eine Erhöhung der Seebodentemperatur gegenüber den natürlichen Verhältnissen auftrat. Hierzu werden nachfolgend umfangreiche statistische Analysen vorgestellt und deren Ergebnisse grafisch dargestellt. Sie beziehen sich u.a. auf Aussagen bezüglich saisonaler Betrachtungen, Abhängigkeit von der Stromproduktion und der Sedimenttiefe, d.h. die Ergebnisdarstellungen der Abbildungen 10 bis 12 dienen nur für eine erste Übersichtsbetrachtung.



**Abb. 12:** Temperaturen aufgezeichnet durch die Sensoren T32 und T16 an der Messstelle 132-kV-Kabel, Temperaturen des Wasserkörpers und Temperaturen an der Referenzmessstelle in vergleichbaren Sedimenttiefen ergänzt durch Angaben zur Stromproduktion des Offshore-Windparks Nysted (nicht skaliert) im Zeitraum 05.10.-16.12.2006.

Zu der Prüfung eines möglichen Zusammenhanges der Stromproduktion und der Temperaturerhöhung in der Umgebung des Kabels muss vorangestellt werden, dass der Betreiber zwar die Daten für die nachfolgenden erläuterten statistischen Analysen zur Verfügung gestellt hat, die Leistung des Windparks konnte aber aufgrund von Auflagen der Windparkbetreiber nur für einen begrenzten Zeitraum und unskaliert dargestellt werden (Abb.

12). Weitere Angaben durften im Rahmen der vorliegenden Studie nicht gemacht werden. Die Abbildung 12 soll aber einen Eindruck der Temperaturverläufe an den Sensoren T32 und T16 bezogen auf die Stromproduktion liefern.

Allgemein kann vorangestellt werden, dass die maximale Temperaturdifferenz zwischen unbeeinflusstem Meeresboden und dem Substrat im Bereich des 132-kV-Kabels am 26. Oktober 2005 verzeichnet wurde. Die an diesem Tag gemessenen Temperaturen sind in der Tab. 1 aufgeführt. Die höchsten Temperaturen im Meeresboden wurden an diesem Tag wieder in größter Nähe zum Kabel, also durch Sensor T32 etwa 50 bis 60cm unter der Sedimentoberfläche, gemessen. Die Temperaturdifferenz zur Referenzmessstation in vergleichbarer Messtiefe betrug 2,5K. Mit abnehmender Messtiefe sank die Temperatur im Substrat über dem Kabel und erreichte knapp unter der Sedimentoberfläche die Temperatur des Wasserkörpers. Die Temperaturdifferenz zur Referenzmessstation verringerte sich erst bei etwa 20–30cm unter der Sedimentoberfläche deutlich.

**Tab. 1: Temperaturmessdaten für den 26. Oktober 2005 aufgezeichnet im Offshore-Windpark Nysted.**

	Tiefe unter Seebodenoberfläche	Temperatur am 132 kV-Kabel [°C]		Referenzstation Temperatur [°C]	Δ T max
		senkrecht über dem Kabel	30 cm seitlich		
Seeboden	50 cm	14.8	13.6	12.3	2.5
	40 cm	14.6	13.2	12.3	2.3
	30 cm	14.4	12.9	12.2	2.2
	20 cm	13.5	12.6	12.1	1.4
	10 cm	12.5	12.4	12.2	0.3
	0 cm	12.1	12.2	12.3	-0.2
	Wasserkörper	12.1	12.2	12.4	

## Ergebnisanalysen und Interpretation

### Partielle Korrelationsrechnung

Bei der Messstation (Sonden über bzw. in der Nähe des Kabels, vgl. Abb. 7) wird laut Annahme die Sedimenttemperatur von der Temperatur des Wasserkörpers wie auch von der ausstrahlenden Wärme des Kabels beeinflusst, welche wiederum von der Nutzlast (= Stromstärke) abhängt\*. Daraus leitet sich die Frage ab, in welchem Maße diese beiden Faktoren schließlich die Sedimenttemperatur beeinflussen. Da das Interesse dem Einfluss der das Kabel durchlaufenden Strommenge und der damit verbundenen Erwärmung des Sediments gilt, muss der Einfluss der Wassertemperatur herausgerechnet werden. Dieses geschieht mittels einer partiellen Korrelationsrechnung. Der partielle Korrelationskoeffizient zeigt den (verbleibenden) Zusammenhang zwischen X und Y nach Herauspriorisierung des gemeinsamen Einflusses der Drittvariablen Z auf X und auf Y. Dazu wurden die drei

\* Anmerkung: Die Angaben zur Nutzlast wurden vom Betreiber den Autoren für die statistischen Analysen zur Verfügung gestellt, dürfen aber aus Gründen des Datenschutzes nicht veröffentlicht oder an Dritte weitergegeben werden.

einzelnen Korrelationskoeffizienten für die Sonde oberhalb des Kabels berechnet. Den partiellen Korrelationskoeffizienten (Korrelation zwischen x und y unter Ausschaltung von z) erhält man gemäß der folgenden Berechnungsformel:

$$r_{xy.z} = \frac{r_{xy} - r_{xz} \cdot r_{yz}}{\sqrt{1 - r_{xz}^2} \cdot \sqrt{1 - r_{yz}^2}}$$

$r_{(xy)}$  = bivariate Korrelation zwischen x und y

$r_{(xz)}$  = bivariate Korrelation zwischen x und z

$r_{(yz)}$  = bivariate Korrelation zwischen y und z

\* Zunächst wurde der partielle Korrelationskoeffizient zwischen Wassertemperatur und Sedimenttemperatur errechnet (Korrelation zwischen Wassertemperatur und Sedimenttemperatur unter Ausschaltung des Einflusses der Stromstärke). Dadurch konnte diese Korrelation auch mit der der Referenzstation verglichen werden.

Anschließend wurde dann die Variable Wassertemperatur herausgerechnet, um so den alleinigen Einfluss der Strömstärke auf die Temperatur des Sediments abschätzen zu können.

**Tab. 2: Ergebnisse der partiellen Korrelationsrechnung**

Sensor	Sedimenttiefe (cm)	Partielle Korrelationen		Referenzstation Sediment – Wassertemp.
		Messstation Sediment - Strom	Messstation Sediment - Wasser	
T 27	5	-0.278322692	0.999781869	0.996223
T 28	15	-0.176353561	0.998962862	0.99383
T 29	25	-0.076310325	0.996790561	0.991363
T 30	35	-0.001603895	0.992855582	0.996223
T 31	45	0.041856797	0.988738239	0.9888
T 32	55	0.139319532	0.982448602	0.996223

### Multiple lineare Regression

Eine Prognose der Y-Werte (die zu erwartenden Werte der abhängigen Variablen, hier also der Sedimenttemperatur) kann also berechnet werden, wenn nicht nur eine beeinflussende Variable, sondern mehrere solcher Variablen berücksichtigt werden – also wenigstens eine zusätzliche Variable. Wird beispielsweise die Sedimenttemperatur eines zufällig ausgewählten Datums in Abhängigkeit von der tagesdurchschnittlichen Wassertemperatur und der durchschnittlichen vom Kabel geleiteten Stromstärke betrachtet, so lässt sich jedes Datum als Punkt in einem dreidimensionalen Achsenkreuz darstellen. In Analogie zum bivariaten Fall der einfachen linearen Regressionsfunktion steht die Regressionsrechnung hier nun vor der Aufgabe, eine Regressionsfläche zu bestimmen (im einfacheren und hier

ausschließlich betrachteten Fall eine lineare Fläche), die sich den Punkten der dreidimensionalen Punktwolke möglichst gut anpassen soll. Diese zweidimensionale Regressionsfläche hat die folgende Form:

$$y'_i = b_0 + b_1x_{1i} + b_2x_{2i}$$

Dabei bedeutet:

- $b_1$  Steigung in Richtung der ersten unabhängigen Variablen
- $b_2$  Steigung in Richtung der zweiten unabhängigen Variablen
- $b_0$  Achsenabschnitt

Die unabhängigen (beeinflussenden) Variablen heißen hierbei nicht  $x$  und  $z$ , sondern  $x_1$  und  $x_2$ . Man nennt die Parameter  $b_1$  und  $b_2$  partielle Regressionskoeffizienten. Die Methode der kleinsten Quadrate führt zur Bestimmung der drei Parameter wie folgt:

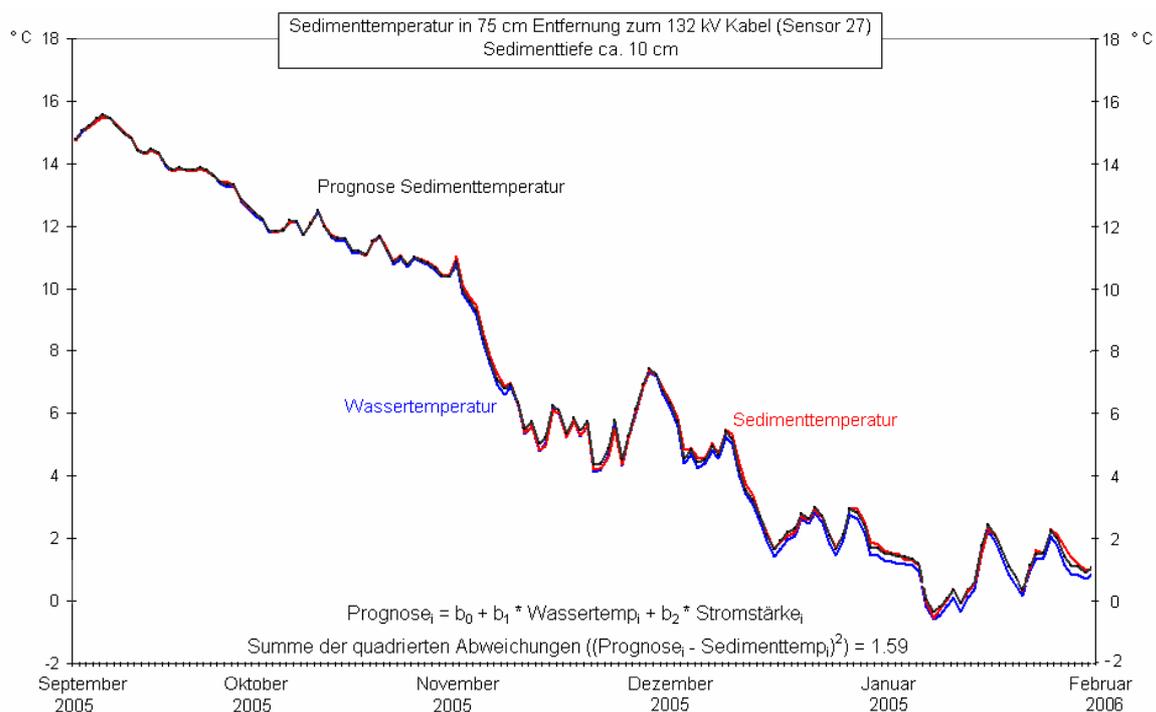
$$b_1 = \frac{r_{y1} - r_{y2}r_{12}}{1 - r_{12}^2} \cdot \frac{\sqrt{\text{var}(y)}}{\sqrt{\text{var}(x_1)}}$$

$$b_2 = \frac{r_{y2} - r_{y1}r_{12}}{1 - r_{12}^2} \cdot \frac{\sqrt{\text{var}(y)}}{\sqrt{\text{var}(x_2)}}$$

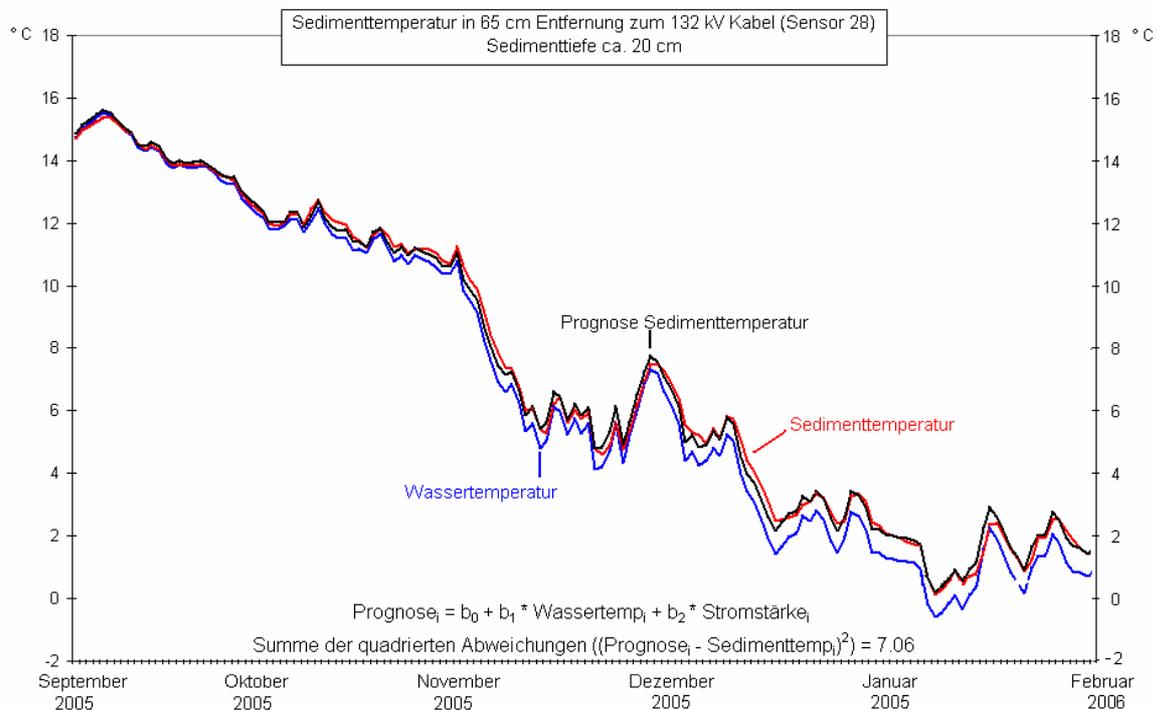
$$b_0 = \bar{y} - b_1\bar{x}_1 - b_2\bar{x}_2$$

Anmerkung: Dass die Variablen  $x$  und  $z$  hier als Unabhängige bezeichnet werden, bedeutet nicht, dass sie ihrerseits voneinander unabhängig wären. Es muss vielmehr in der Regel unterstellt werden, dass sie miteinander korrelieren, also keineswegs voneinander unabhängig sind. Gemeint ist mit diesem Begriff der Unabhängigkeit, dass sie als beeinflussende Variablen hinsichtlich der Variablen  $y$  (Sedimenttemperatur) angesehen werden.

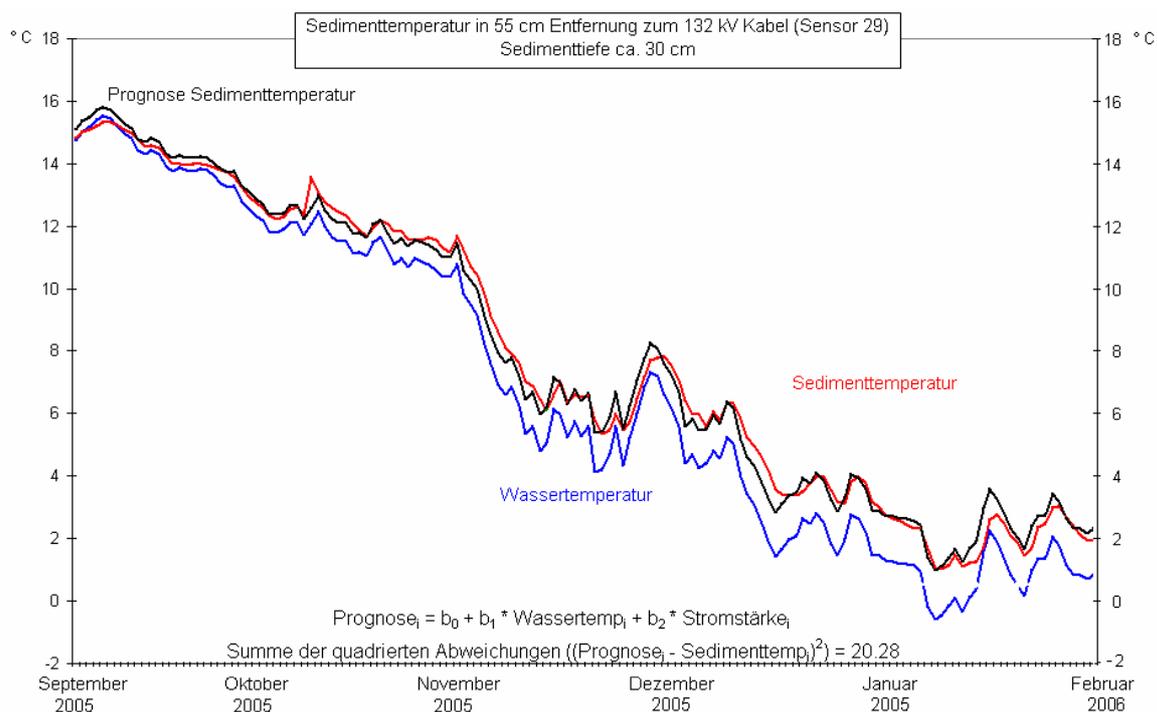
Aus den Abbildungen 13 bis 18 sowie der Tabelle 14: Prognosequalitäten der multiplen linearen Regression im Vergleich zur zweidimensionalen linearen Regression (Tab. 2), kann man die Güte dieser Prognose abschätzen.



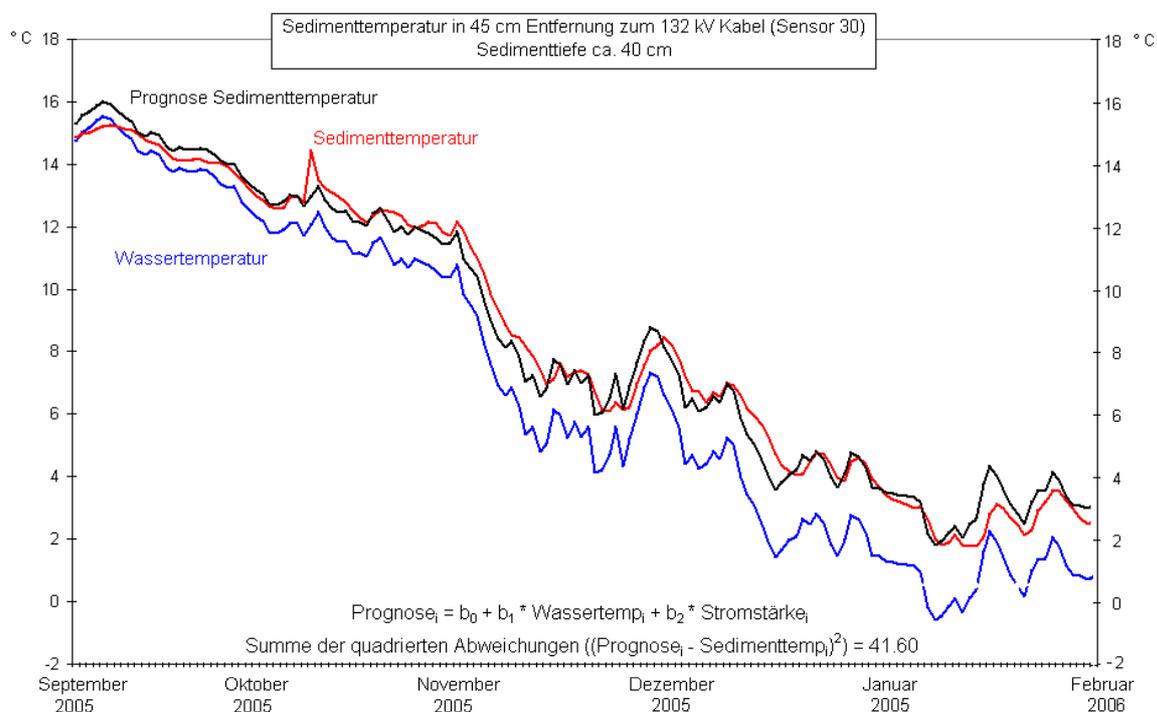
**Abb. 13:** Sedimenttemperatur am Sensor T27 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.



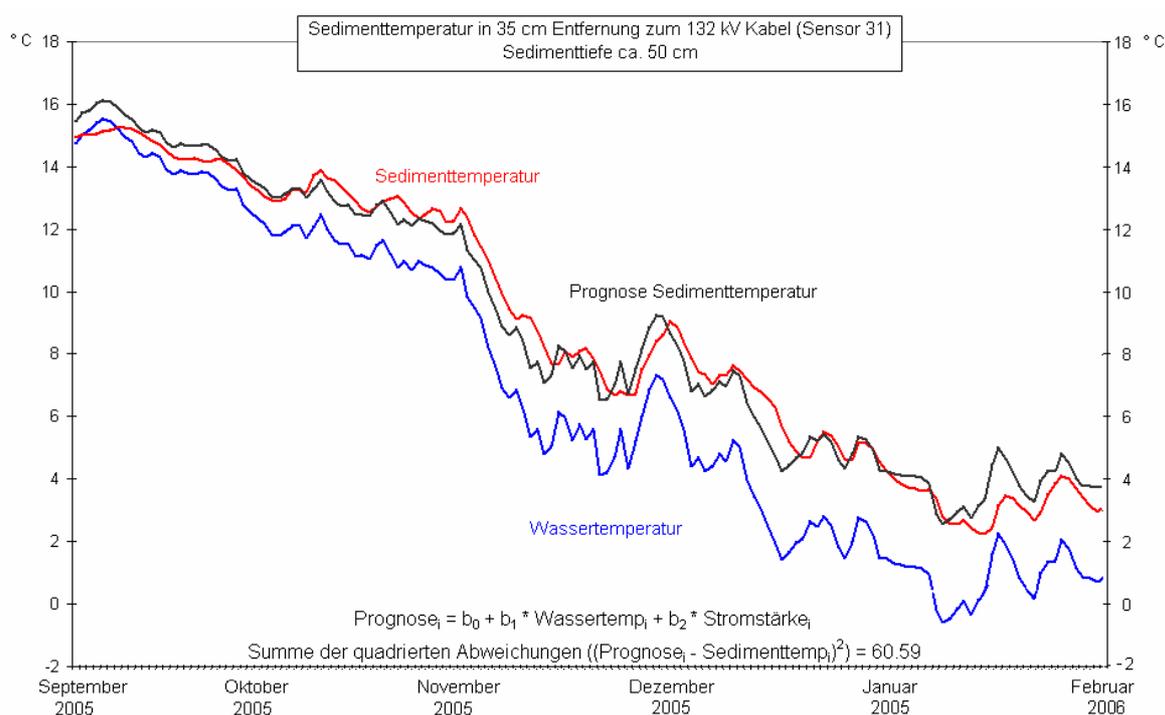
**Abb. 14:** Sedimenttemperatur am Sensor T28 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.



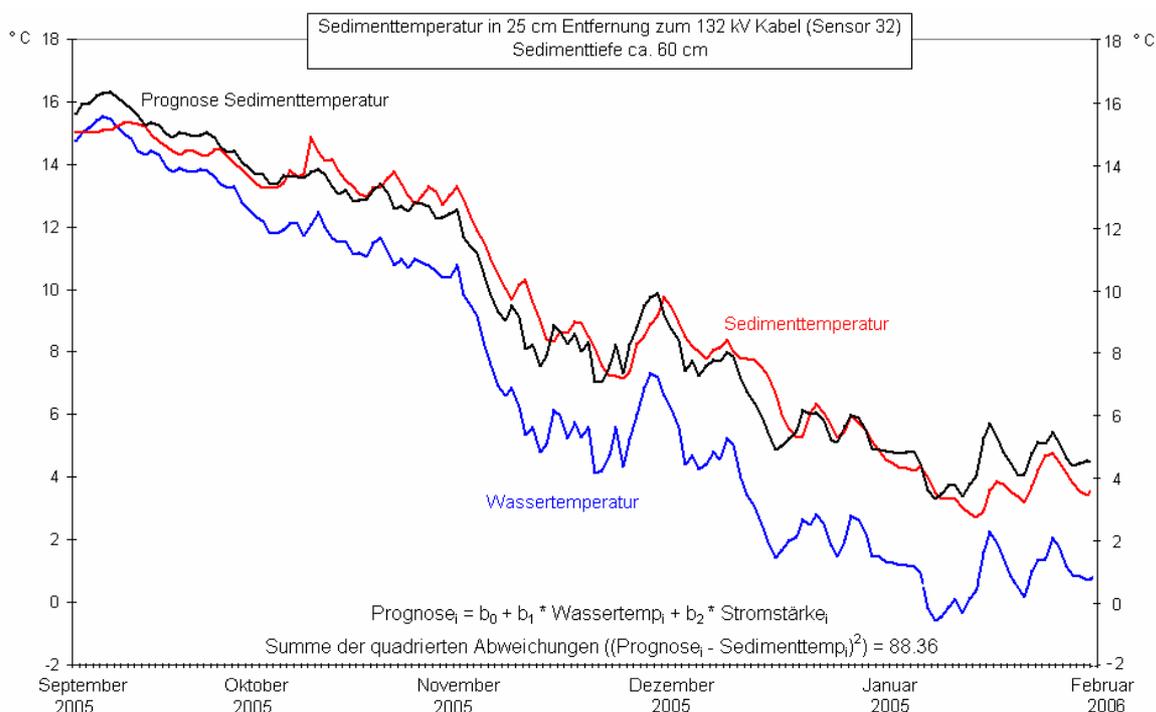
**Abb. 15:** Sedimenttemperatur am Sensor T29 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.



**Abb. 16:** Sedimenttemperatur am Sensor T30 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.



**Abb. 17:** Sedimenttemperatur am Sensor T31 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.



**Abb. 18:** Sedimenttemperatur am Sensor T32 der Messsonde direkt oberhalb des 132-kV-Kabels im Vergleich zur Wassertemperatur. Die prognostizierte Sedimenttemperatur wurde mit der multiplen linearen Regression berechnet.

**Tab. 3: Auswertung der Korrelationsrechnung und der multiplen Regression**

	$r_{\text{Wassertemp}}$	$r_{\text{Stromstärke}}$	$b_1$	$b_2$	$b_0$	$(y'-y)^2$	Kabelabstand (cm)	Sedimenttiefe (cm)
<b>T 27</b>	0.999781869	-0.278322692	0.983673804	-0.00069831	0.285539009	1.59097868	75	5 - 10
<b>T28</b>	0.998962862	-0.176353561	0.952118427	-0.00091181	0.285539009	7.056893964	65	15 - 25
<b>T29</b>	0.996790561	-0.076310325	0.917676737	-0.00066148	0.285539009	20.27962495	55	25 - 35
<b>T 30</b>	0.992855582	-0.001603895	0.878498339	-0.00001986	0.285539009	41.60439462	45	35 - 45
<b>T 31</b>	0.988738239	0.041856797	0.841648207	0.00062587	3.03847226	60.59404924	35	45 - 55
<b>T 32</b>	0.982448602	0.139319532	0.80979629	0.002536802	3.653912551	88.36538186	25	55 - 65

$r_{\text{Wassertemp}}$ : hier die partielle Korrelation zwischen Substrattemperatur und Wassertemperatur (unter Ausschaltung der Variablen Stromstärke)

$r_{\text{Stromstärke}}$ : hier die partielle Korrelation zwischen Substrattemperatur und Stromstärke (unter Ausschaltung der Variablen Wassertemperatur)

$b_1$ : die abhängige Variable (Sedimenttemperatur) nimmt tendenziell um diesen Wert zu, wenn die erste unabhängige Variable (Wassertemperatur) um eine Einheit (1°C) ansteigt

$b_2$ : die abhängige Variable (Sedimenttemperatur) nimmt tendenziell um diesen Wert zu, wenn die zweite unabhängige Variable (Stromstärke) um eine Einheit ansteigt

$b_0$ : Achsenabschnitt

$(y'-y)^2$ : Quadrierte Abweichungen der Prognosen zur tatsächlichen Sedimenttemperaturen (Qualitätsmerkmal)

In der Tabelle 3 wird die Qualität der Prognose, die unter Verwendung der linearen Regression erstellt wurde mit der Prognosequalität einer einfachen Regression verglichen.

**Tab. 4: Prognosequalitäten der multiplen linearen Regression im Vergleich zur zweidimensionalen linearen Regression**

	Quadrierte Abweichungen der Prognosen	
	multiple lineare Regression	Zweidimensionale Regression Wassertemp- Sedimenttemp.
<b>T 27</b>	1.59097868	1.708434196
<b>T 28</b>	7.056893964	7.254967723
<b>T 29</b>	20.27962495	20.39197508
<b>T 30</b>	41.60439462	41.60477509
<b>T 31</b>	60.59404924	60.67834013
<b>T 32</b>	88.36538186	89.98035462

Die Prognose mit dem geringeren Wert der quadrierten Abweichungen ist die Prognose mit der höheren Qualität

### Multipler Determinationskoeffizient

Der multiple Determinationskoeffizient ist definiert als das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten, der die Stärke des Zusammenhangs zwischen  $y$  einerseits und  $x_1$  und  $x_2$  andererseits berechnet. Der multiple Determinationskoeffizient zeigt den Anteil der Varianz der  $y$ -Werte, der durch die Variabilität der  $x_1$ -Variable und der  $x_2$ -Variable statistisch erklärt wird. Dies geschieht unter Nutzung der Hypothese, dass zwischen der  $y$ -Variablen einerseits und der  $x_1$ -Variablen und der  $x_2$ -Variablen andererseits ein linearer

Zusammenhang besteht, wie er durch die lineare Regressionsfunktion zum Ausdruck gebracht worden ist. Mit dem multiplen Determinationskoeffizient lässt sich erkennen, welche und wie viele Variablen für die Variabilität von  $y$  von Bedeutung sind. Dazu werden auch die einfachen Determinationskoeffizienten gebildet. Der multiple Determinationskoeffizient sollte aber immer größer sein als die einfachen Determinationskoeffizienten. Denn wenn eine weitere Variable keinen Zuwachs im Anteil der erklärten Varianz von  $y$  erbringt, dann ist sie bei der Beantwortung der Frage, welche Faktoren für die Variabilität von  $y$  (hier die Sedimenttemperatur) von Bedeutung sind, als unbedeutsam auszuschließen.

**Tab. 5: Vergleich des multiplen Determinationskoeffizienten mit einfachen bivariaten Ansätzen**

	$r_{y,12}^2$	$r_{y,1}^2$	$r_{y,2}^2$
<b>T 27</b>	99.956613	99.9529696	0.5368506
<b>T 28</b>	99.793856	99.7872387	0.5671327
<b>T 29</b>	99.362571	99.3588373	0.5350086
<b>T 30</b>	98.582607	98.5826038	0.4485765
<b>T 31</b>	97.768464	97.7645478	0.3631707
<b>T 32</b>	96.526064	96.4573009	0.1591858

$r_{y,12}^{2\cdot}$ : Prozentsatz der Varianz der interessierenden Variablen  $y$  (Sedimenttemperatur), der über die Variation beider Variablen  $x_1$  (Wassertemperatur) und  $x_2$  (Stromstärke) statistisch erklärt wird.

$r_{y,1}^{2\cdot}$ : Prozentsatz der Varianz der interessierenden Variablen  $y$  (Sedimenttemperatur), der allein über die Variation der Variablen  $x_1$  (Wassertemperatur) statistisch erklärt wird.

$r_{y,2}^{2\cdot}$ : Prozentsatz der Varianz der interessierenden Variablen  $y$  (Sedimenttemperatur), der allein über die Variation der Variablen  $x_2$  (Stromstärke) statistisch erklärt wird.

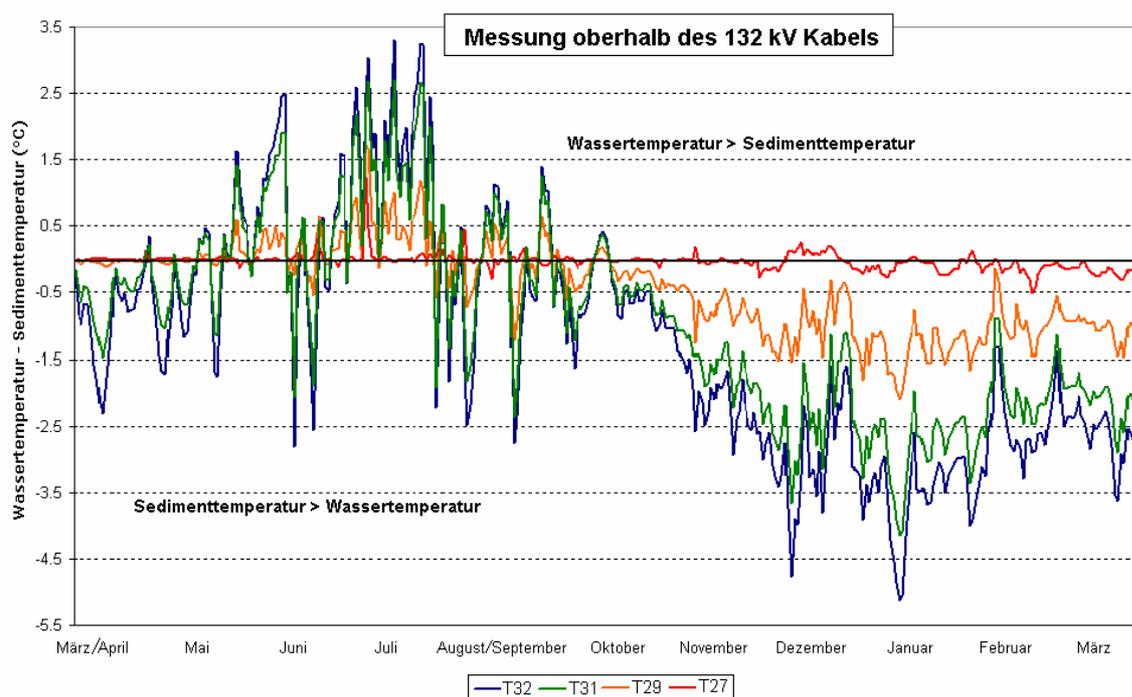
Sofern der multiple Determinationskoeffizient  $r_{y,12}^2$  größer ist als die einfachen Determinationskoeffizienten  $r_{y,1}^2$  und  $r_{y,2}^2$  wird mit der zweidimensionalen Funktion ein höherer Anteil der Varianz der Variablen  $y$  (Sedimenttemperatur) aufgeklärt (statistisch erklärt) als mit dem einfachen bivariaten Ansatz.

### Temperaturverlauf des Wasser- und des Sedimentkörpers im Untersuchungszeitraum

Die größten Temperaturdifferenzen zwischen Sedimenttemperatur und Wassertemperatur am 132-kV-Kabel wurden am 01.01.2005 sowie am 03.07.2005 festgestellt. Im Januar lag die Sedimenttemperatur in etwa 50–60cm Tiefe (T32) um 3,9K höher als die Wassertemperatur, im Juli um 3,6K niedriger. Bei der Messung am 33-kV-Kabel wurden die maximalen Differenzen ebenfalls am 31.12.2005 sowie am 03.07.2005 registriert. Im Winter lag die Sedimenttemperatur hier sogar 5,12K über der Wassertemperatur, die Differenz im Sommer war dagegen etwas geringer als am 132-kV-Kabel (3,3K unterhalb der Wassertemperatur) (siehe Tab. 6 und 7).

In den Monaten Mai, Juli, August und z.T. auch noch Anfang September lagen die Wassertemperaturen i.d.R. über den Sedimenttemperaturen. In den Monaten März bis einschließlich Anfang Mai dagegen lagen die Sedimenttemperaturen über den Wassertemperaturen. Innerhalb kurzer Perioden (Zeiträume von 3 bis 6 Tagen) ließ sich dieses auch in den

Monaten Juli und August beobachten. Ab Mitte September befanden sich dann - von sehr kurzen Unterbrechungen abgesehen - die Wassertemperaturen immer oberhalb der Sedimenttemperaturen (Abb. 19). In Abbildung 19 sind die Differenzen der Wasser- und Sedimenttemperatur an der Messstation am 132-kV-Kabel in einigen Sedimenttiefen dargestellt (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur einige abgebildet, vgl. hierzu Abbildung 7). Dargestellt ist also die Differenz aus Wassertemperatur abzüglich Sedimenttemperatur. Die Wassertemperatur ist definiert durch die 0°-Linie. Bei Peaks oberhalb dieser Linie war die Wassertemperatur größer als die des Sediments, bei Ausschlägen nach unten war es umgekehrt.



**Abb. 19:** Differenzen der Wassertemperatur und der Sedimenttemperatur an der Messstation am 132-kV-Kabel in einigen Sedimenttiefen (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur einige abgebildet, vergl. hierzu Abb. 7). Dargestellt ist die Differenz aus Wassertemperatur abzüglich Sedimenttemperatur. Die Wassertemperatur ist definiert durch die 0°-Linie. Bei Peaks oberhalb dieser Linie war die Wassertemperatur größer als die des Sediments, bei Ausschlägen nach unten war es umgekehrt.

Über den ganzen Zeitraum gesehen betrug die durchschnittliche Temperaturdifferenz (= Wassertemperatur – Sedimenttemperatur) am Sensor T32 bei der Messstation am 33-kV-Kabel etwa minus 0,64K, bei der Messstation oberhalb des 132-kV-Kabels sogar minus 1,2K. Bei der Messsonde in 30cm Entfernung zum 132-kV-Kabel betrug dieser Durchschnitt am Sensor T16 minus 1,013K, in derselben Entfernung beim 33-kV-Kabel nur minus 0,644K (Abb. 6 und 7).

**Tab. 6: Deskriptive Statistik der Temperaturdifferenzen (°C) zwischen Wasser und Sediment (= durchschnittliche Wassertemp. - Sedimenttemp.) bei den Temperatursensoren der Sonde 2 (direkt oberhalb des Kabels) bei 1.) dem 33-kV-Kabel und 2.) dem 132-kV-Kabel**

Statistik	1. Sonde 2 (direkt über 33 kV Kabel)						2. Sonde 2 (direkt über dem 132 kV Kabel)					
	kv 33 T32	kv 33 T31	kv 33 T30	kv 33 T29	kv 33 T28	kv 33 T27	kv 132 T32	kv 132 T31	kv 132 T30	kv 132 T29	kv 132 T28	kv 132 T27
Anz. der Beobachtungen	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347
Minimum	-3.905	-3.465	-2.971	-2.305	-2.305	-0.522	-5.124	-4.149	-3.197	-2.096	-0.999	-0.522
Maximum	3.624	3.004	2.345	1.702	1.702	1.235	3.298	2.695	2.276	1.723	1.464	1.235
Amplitude	7.529	6.469	5.317	4.007	4.007	1.758	8.422	6.844	5.473	3.820	2.462	1.758
1. Quartil	-1.868	-1.592	-1.357	-0.957	-0.957	-0.085	-2.590	-2.060	-1.557	-0.991	-0.465	-0.085
Median	-0.717	-0.627	-0.442	-0.208	-0.208	-0.024	-1.336	-0.889	-0.621	-0.326	-0.075	-0.024
3. Quartil	0.318	0.256	0.210	0.206	0.206	0.003	-0.080	0.001	0.022	0.001	0.029	-0.003
Summe	-222.208	-197.727	-172.947	-115.279	-115.279	-13.907	-430.681	-329.700	-240.930	-150.680	-64.213	-13.907
Mittelwert	-0.640	-0.570	-0.498	-0.332	-0.332	-0.040	-1.241	-0.950	-0.694	-0.434	-0.185	-0.040
Varianz (n)	2.532	1.855	1.263	0.691	0.691	0.016	2.990	1.936	1.118	0.434	0.108	0.016
Varianz (n-1)	2.539	1.860	1.267	0.693	0.693	0.016	2.999	1.941	1.121	0.435	0.108	0.016
Standardabweichung (n)	1.591	1.362	1.124	0.831	0.831	0.126	1.729	1.391	1.057	0.659	0.328	0.126
Standardabweichung (n-1)	1.594	1.364	1.126	0.833	0.833	0.126	1.732	1.393	1.059	0.660	0.328	0.126
Variationskoeffizient	-2.485	-2.390	-2.255	-2.503	-2.503	-3.132	-1.394	-1.464	-1.523	-1.518	-1.772	-3.132
Schiefte (Pearson)	0.377	0.284	0.130	-0.140	-0.140	2.961	0.346	0.289	0.194	0.015	0.072	2.961
Schiefte (Fisher)	0.379	0.285	0.131	-0.141	-0.141	2.974	0.347	0.290	0.195	0.015	0.072	2.974
Schiefte (Bowley)	-0.054	-0.044	-0.168	-0.287	-0.287	-0.482	0.001	-0.136	-0.185	-0.340	-0.577	-0.482
Kurtosis (Pearson)	-0.292	-0.324	-0.397	-0.435	-0.435	31.301	-0.480	-0.461	-0.474	-0.360	1.523	31.301
Kurtosis (Fisher)	-0.279	-0.311	-0.385	-0.424	-0.424	31.774	-0.469	-0.450	-0.464	-0.348	1.562	31.774
Standardabweichung	0.086	0.073	0.060	0.045	0.045	0.007	0.093	0.075	0.057	0.035	0.018	0.007
untere Grenze des Mittelwertes (95%)	-0.809	-0.714	-0.617	-0.420	-0.420	-0.053	-1.424	-1.097	-0.806	-0.504	-0.220	-0.053
Obere Grenze des Mittelwertes (95%)	-0.472	-0.426	-0.380	-0.244	-0.244	-0.027	-1.058	-0.803	-0.583	-0.365	-0.150	-0.027
Standardabweichung (Schiefe (Fisher))	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131
Standardabweichung (Kurtosis (Fisher))	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261
Mittlere absolute Abweichung	1.286	1.099	0.906	0.677	0.677	0.074	1.450	1.160	0.884	0.558	0.271	0.074
Mediane absolute Abweichung	1.102	0.939	0.807	0.595	0.595	0.032	1.256	1.045	0.820	0.491	0.164	0.032

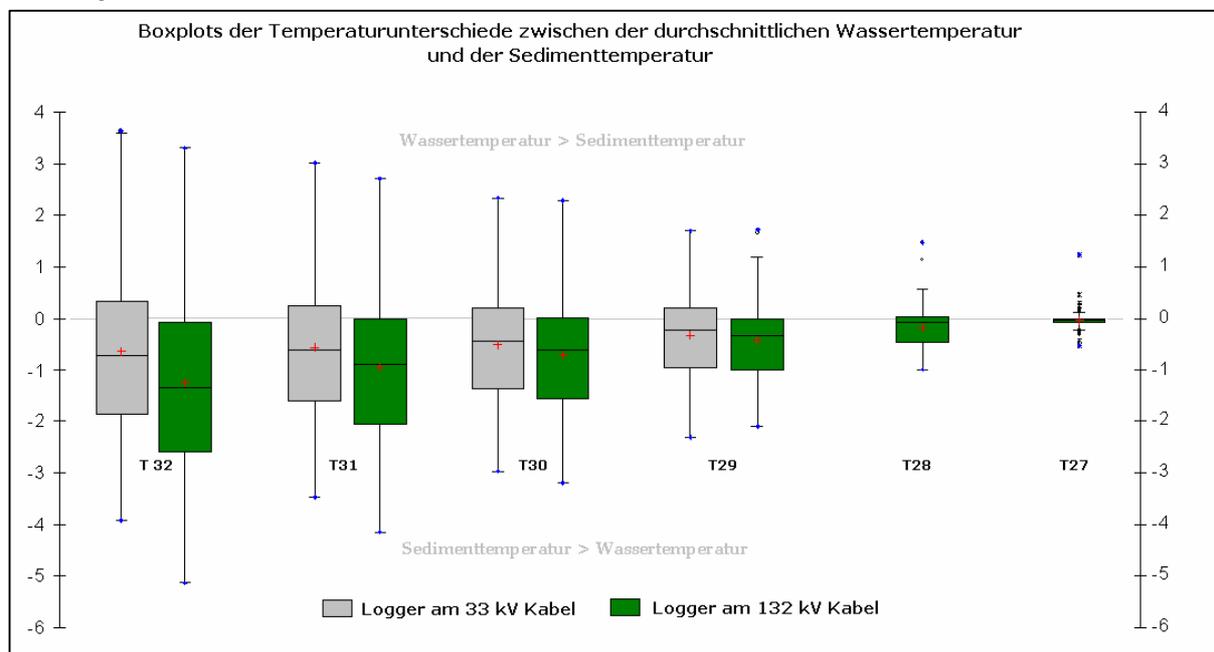
Aufgrund der Berechnung bedeuten negative Zahlen, dass die Sedimenttemperatur über der Wassertemperatur lag, positive Zahlen bedeuten das Gegenteil

**Tab. 7: Deskriptive Statistik der Temperaturdifferenzen (°C) zwischen Wasser und Sediment (= durchschnittliche Wassertemp. - Sedimenttemp.) bei den Temperatursensoren der Sonde 1 (in 30cm Entfernung von dem Kabels) bei 1.) dem 33-kV-Kabel und 2.) dem 132-kV-Kabel**

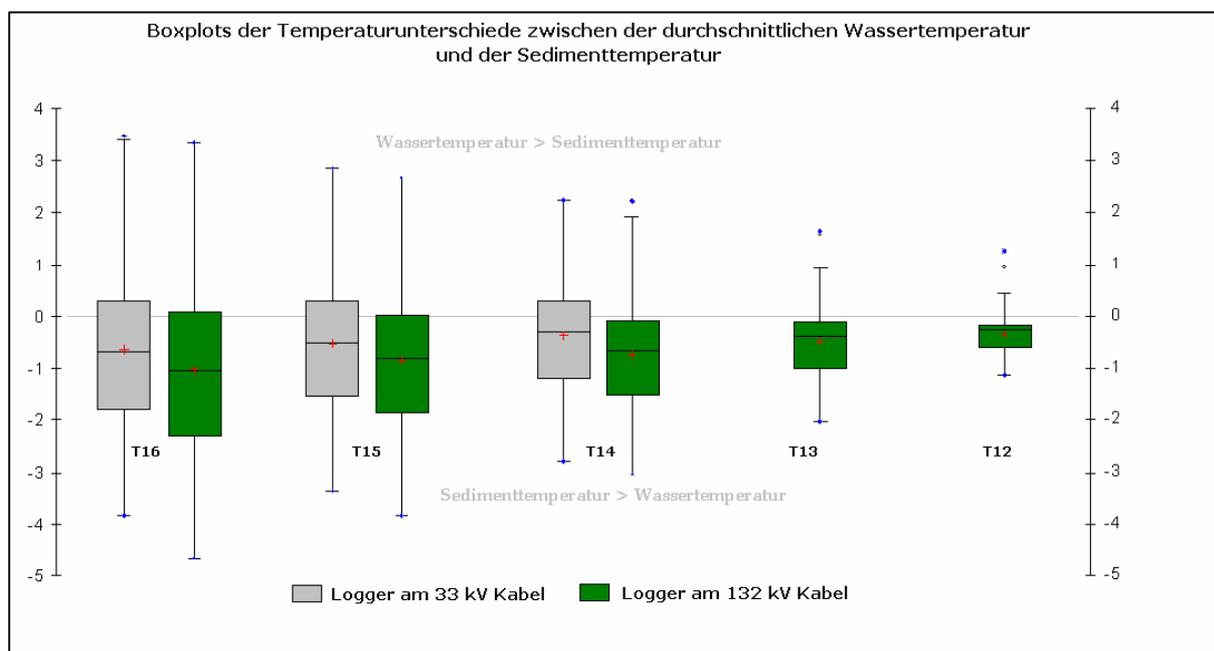
Statistik	1. Sonde 1 (30 cm vom 33 kV Kabel entfernt)						1. Sonde 1 (30 cm vom 132 kV Kabel entfernt)					
	KV 32 T16	KV 32 T15	KV 32 T14	KV 32 T15	KV 32 T14	KV 32 T16	KV 132 T16	KV 132 T15	KV 132 T14	KV 132 T13	KV 132 T12	
Anz. der Beobachtungen	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	
Minimum	-3.836	-3.359	-2.790	-2.790	-2.790	-4.663	-3.827	-3.072	-2.038	-1.128	-1.128	
Maximum	3.473	2.847	2.235	2.235	2.235	3.340	2.672	2.211	1.648	1.282	1.282	
Amplitude	7.309	6.206	5.025	5.025	5.025	8.003	6.498	5.283	3.686	2.410	2.410	
1. Quartil	-1.797	-1.524	-1.195	-1.195	-1.195	-2.316	-1.885	-1.508	-1.002	-0.611	-0.611	
Median	-0.680	-0.504	-0.295	-0.295	-0.295	-1.036	-0.804	-0.664	-0.388	-0.241	-0.241	
3. Quartil	0.296	0.290	0.307	0.307	0.307	0.099	0.012	-0.068	-0.095	-0.162	-0.162	
Summe	-223.355	-186.115	-129.719	-129.719	-129.719	-351.499	-297.261	-252.060	-172.888	-120.728	-120.728	
Mittelwert	-0.644	-0.536	-0.374	-0.374	-0.374	-1.013	-0.857	-0.726	-0.498	-0.348	-0.348	
Varianz (n)	2.364	1.708	1.143	1.143	1.143	2.682	1.703	0.984	0.372	0.097	0.097	
Varianz (n-1)	2.370	1.713	1.146	1.146	1.146	2.690	1.708	0.987	0.373	0.097	0.097	
Standardabweichung (n)	1.537	1.307	1.069	1.069	1.069	1.638	1.305	0.992	0.610	0.311	0.311	
Standardabweichung (n-1)	1.540	1.309	1.071	1.071	1.071	1.640	1.307	0.993	0.611	0.312	0.312	
Variationskoeffizient	-2.388	-2.437	-2.860	-2.860	-2.860	-1.617	-1.523	-1.366	-1.225	-0.895	-0.895	
Schiefe (Pearson)	0.326	0.196	0.004	0.004	0.004	0.338	0.277	0.188	0.017	0.182	0.182	
Schiefe (Fisher)	0.327	0.197	0.004	0.004	0.004	0.340	0.279	0.189	0.017	0.183	0.183	
Schiefe (Bowley)	-0.068	-0.125	-0.198	-0.198	-0.198	-0.060	-0.139	-0.172	-0.354	-0.650	-0.650	
Kurtosis (Pearson)	-0.350	-0.407	-0.486	-0.486	-0.486	-0.433	-0.424	-0.364	-0.142	2.091	2.091	
Kurtosis (Fisher)	-0.337	-0.396	-0.475	-0.475	-0.475	-0.422	-0.413	-0.352	-0.127	2.139	2.139	
Standardabweichung	0.083	0.070	0.057	0.057	0.057	0.088	0.070	0.053	0.033	0.017	0.017	
untere Grenze des Mittelwertes (95%)	-0.806	-0.675	-0.487	-0.487	-0.487	-1.186	-0.995	-0.831	-0.563	-0.381	-0.381	
Obere Grenze des Mittelwertes (95%)	-0.481	-0.398	-0.261	-0.261	-0.261	-0.840	-0.719	-0.622	-0.434	-0.315	-0.315	
Standardabweichung(Schiefe (Fisher))	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	
Standardabweichung(Kurtosis (Fisher))	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	
Mittlere absolute Abweichung	1.248	1.059	0.868	0.868	0.868	1.361	1.081	0.823	0.512	0.252	0.252	
Mediane absolute Abweichung	1.075	0.930	0.769	0.769	0.769	1.218	0.987	0.754	0.443	0.147	0.147	

Aufgrund der Berechnung bedeuten negative Zahlen bedeuten, dass die Sedimenttemperatur über der Wassertemperatur lagen, positive Zahlen bedeuten des Gegenteil

Wie aus den folgenden Abbildungen 20 und 21 ersichtlich wird, lagen die Mittelwerte (rote Kreuze) der Sedimenttemperaturen über den ganzen Untersuchungszeitraum gesehen über dem Mittelwert der Wassertemperatur. Erkennbar ist auch, dass dieser Wert am 132-kV-Kabel größer ist als am 33-kV-Kabel.



**Abb. 20:** Boxplots der Temperaturunterschiede Wasser und Sediment (Messsonde direkt oberhalb des Kabels). Dargestellt ist die Differenz aus Wassertemperatur abzüglich Sedimenttemperatur. Die Wassertemperatur ist definiert durch die 0°-Linie. Bei Peaks oberhalb dieser Linie war die Wassertemperatur größer als die des Sediments, bei Ausschlägen nach unten war es umgekehrt.



**Abb. 21:** Boxplots der Temperaturunterschiede Wasser und Sediment (hier Messsonde in 30cm Entfernung vom Kabel). Dargestellt ist die Differenz aus Wassertemperatur abzüglich Sedimenttemperatur. Die Wassertemperatur ist definiert durch die 0°-Linie. Bei Peaks oberhalb dieser Linie war die Wassertemperatur größer als die des Sediments, bei Ausschlägen nach unten war es umgekehrt.

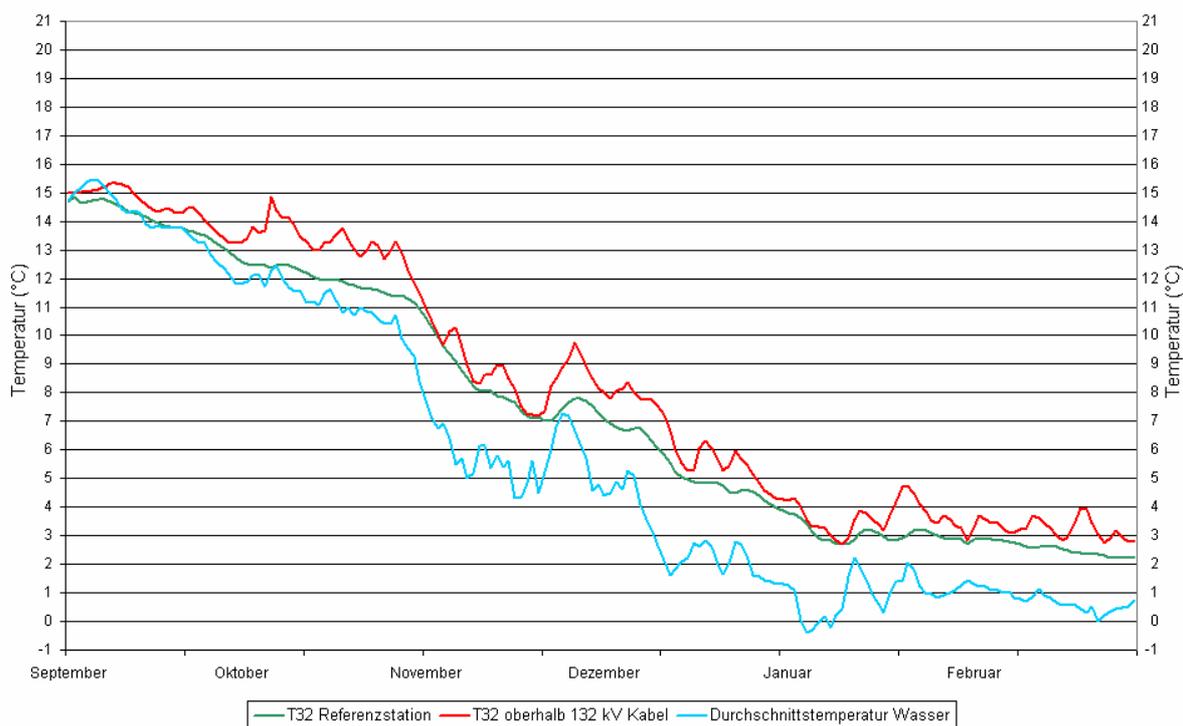
In Abbildung 22 wird dargestellt, inwieweit sich die Sedimenttemperaturen am 33-kV-Kabel und am 132-kV-Kabel direkt oberhalb der Kabel (etwa in 50 bis 60cm Tiefe und ungefähr 25cm oberhalb der Kabel) unterschieden. Deutlich wird, dass die Sedimenttemperaturen am 132-kV-Kabel fast immer über denen des 33-kV-Kabels lagen. Die Darstellung in dieser Abbildung erstreckt sich nur bis zum 20.09.2005, da die Messstation am 33-kV-Kabel anschließend als Referenzstation für die 132kV Messeinheit verwendet wurde.

Vergleicht man die Sedimenttemperaturen des 132-kV-Kabels mit denen der Referenzstation (siehe Abb. 23) zeigt sich das gleiche Bild. Auch hier lagen die Sedimenttemperaturen direkt oberhalb des stromführenden Kabels höher als die bei der unbeeinflussten Referenzstation in einer vergleichbaren Tiefe.

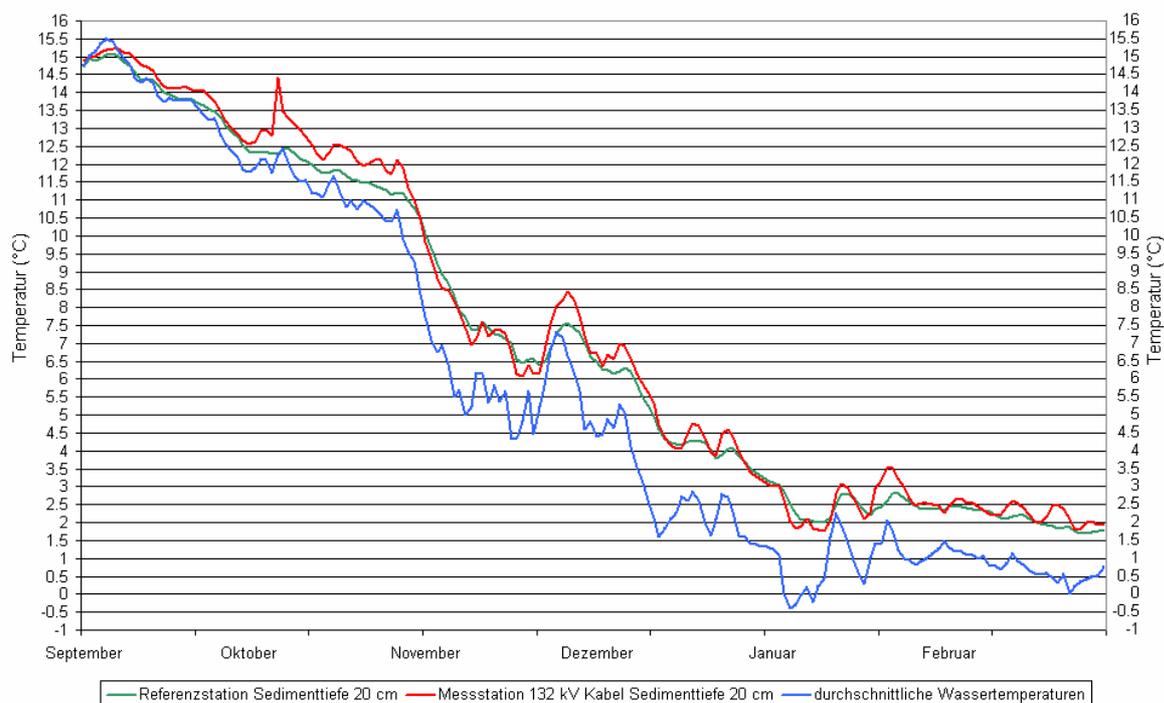


**Abb. 22:** Vergleich der Sedimenttemperaturen direkt oberhalb der Kabel gemessen (Abstand zum Kabel = 25cm) bei a) 33-kV-Kabel und b) 132-kV-Kabel. Desweiteren ist die durchschnittliche Temperatur der Wassersäule dargestellt (Zeitraum hier nur bis zum 20.09.2005.)

Nach der Vorgabe des Bundesamtes für Naturschutz, dem so genannten 2K-Kriterium, ist eine Temperaturerhöhung von 2K in einer Sedimenttiefe von 20cm unterhalb der Sedimentoberfläche tolerabel. Vergleicht man bei Mess- und Referenzstation die Sedimenttemperatur in dieser Tiefe, liegt die Differenz zwischen beiden nur bei weniger als einem Prozent der beobachteten Tage oberhalb dieses 2K-Bereiches. Bei 44% der Daten liegen die Werte bei der Messstation sogar unterhalb der Referenzstation (Jahreszeit). In etwa 75% liegen die Werte an dem Stromkabel zwischen 0 und 1K über denen der Referenzstation (siehe Tab. 8, Tab. 9 sowie Abb. 23, 24).



**Abb. 23:** Vergleich der Sedimenttemperaturen am 132-kV-Kabel (Abstand zum Kabel = 25cm) und einer Referenzmessung in derselben Sedimenttiefe (Messungszeitraum ab 20.09.2005). Auch hier ist zusätzlich die durchschnittliche Wassertemperatur angezeigt.



**Abb. 24:** Vergleich der Temperaturen in einer Sedimenttiefe von 20cm (von der Sedimentoberfläche gemessen) bei a) dem 132-kV-Kabel und b) der Referenzmessung.

**Tab. 8: Temperaturdifferenzen zwischen Messstation (132-kV-Kabel) und Referenzstation in einer Sedimenttiefe von 20cm**

Untergrenze	Obergrenze	Häufigkeit	Relative Häufigkeit
-2	-1	0	0.000
-1	0	44	0.243
0	1	135	0.746
1	2	1	0.006
2	3	1	0.006
3	4	0	0.000

**Tab. 9: Vergleich der Temperaturendifferenzen zwischen Sediment und Wassersäule (=Sedimenttemperatur – Wassertemperatur) der Sedimenttiefe 20cm unter Sedimentoberfläche bei a) Referenzstation und b) der Messstation über dem 132-kV-Kabel**

Statistik	Sedimenttiefe 20 cm Referenzstation	Sedimenttiefe 20 cm Messstation 132 kV Kabel
Anz. der Beobachtungen	180	180
Minimum	-0.422	-0.285
Maximum	2.971	3.197
Amplitude	3.393	3.482
1. Quartil	0.567	1.018
Median	1.294	1.530
3. Quartil	1.829	1.912
Summe	219.873	261.783
Mittelwert	1.222	1.454
Varianz (n)	0.653	0.470
Varianz (n-1)	0.657	0.473
Standardabweichung (n)	0.808	0.686
Standardabweichung (n-1)	0.810	0.688
Variationskoeffizient	0.661	0.472
Schiefe (Pearson)	0.010	-0.301
Schiefe (Fisher)	0.010	-0.304
Schiefe (Bowley)	-0.152	-0.144
Kurtosis (Pearson)	-0.813	-0.104
Kurtosis (Fisher)	-0.802	-0.072
Standardabweichung	0.060	0.051
untere Grenze des Mittelwertes (95%)	1.102	1.353
Obere Grenze des Mittelwertes (95%)	1.341	1.555
Standardabweichung(Schiefe (Fisher))	0.181	0.181
Standardabweichung(Kurtosis (Fisher))	0.360	0.360
Mittlere absolute Abweichung	0.668	0.537
Mediane absolute Abweichung	0.661	0.423

Aufgrund der hier angestellten Berechnung bedeuten negative Zahlen, dass die Wassertemperatur höher als die Sedimenttemperatur ist, positive Zahlen bedeuten das Gegenteil.

### **Auswertung der statistischen Analysen**

Wie aus Tabelle 5 des multiplen Determinationskoeffizienten erkennbar, ist der multiple Determinationskoeffizient bei jeder Sedimenttiefe größer als jeweils die beiden einzelnen einfachen Determinationskoeffizienten. Deshalb wird die Varianz der Sedimenttemperaturen statistisch immer besser erklärt, wenn beide Variablen, also Wassertemperatur und Stromstärke berücksichtigt werden. Deutlich ist aber auch die geringe Differenz zwischen dem multiplen Ansatz und der einfachen Determination (Sedimenttemperatur und Wassertemperatur) zu erkennen. Das bedeutet, dass der Großteil der Varianz der Sedimenttemperatur durch die Wassertemperatur statistisch erklärt wird. Der Anteil der Varianz der Sedimenttemperatur der allein durch die Lastzustände des Kabels (Stromstärke) erklärt wird, ist dagegen eher gering.

Ein vergleichbares Ergebnis liefert auch die partielle Korrelationsrechnung (siehe Tab. 2). Die Korrelation zwischen Sedimenttemperatur und Wassertemperatur (unter Ausschaltung des Einflusses der Lastzustände im Kabel) betrug minimal 0,982 und maximal sogar 0,999, was also einen sehr hohen Wert auf. Annähernd gleich hoch waren auch die Korrelationen zwischen Wassertemperatur und Sedimenttemperaturen bei der Referenzmessung an den verschiedenen Temperatursensoren (Tab. 2). Dagegen waren die partiellen Korrelationen zwischen Sedimenttemperaturen und Stromstärke im Kabel (unter Ausschaltung des Einflusses der Wassertemperatur) sehr niedrig. Dieser betrug in einem Abstand von 25cm zum Kabel (d.h. bei etwa 50 bis 60cm Sedimenttiefe, Sensor T32) nur 0,14 und nahm mit zunehmender Entfernung vom Kabel rapide ab. Ab 45cm Entfernung zum Kabel (T30, entspricht hier etwa 30 bis 40cm Sedimenttiefe) war keine positive partielle Korrelation zwischen der Stromstärke und der Temperatur des Sedimentes mehr festzustellen.

Unter Verwendung der multiplen linearen Regression lassen sich Prognosen erstellen, die aufgrund der partiellen Regressionskoeffizienten der Variablen Wassertemperatur und Stromstärke die Sedimenttemperatur berechnen. Wie aus den Abbildungen 13 bis 14 ersichtlich, ist die Prognosegüte in den oberen Sedimentschichten erstaunlich gut, nimmt mit zunehmender Tiefe, d.h. mit zunehmender Nähe zum Kabel hin ab. Aber auch die Prognose für den Sensor in direkter Kabelnähe (T32) ist noch von ausreichender Qualität, wie auch aus Tab. 4 zu entnehmen ist. Zum Vergleich wurde daneben auch eine Prognose der Sedimenttemperatur erstellt, die auf der zweidimensionalen linearen Regression zwischen Sedimenttemperatur und Wassertemperatur beruht (Tab. 4). Wie ersichtlich ist, ist die Qualität der Prognose der multiplen linearen Regression immer jener der zweidimensionalen linearen Regression (zwischen Wassertemperatur und Sedimenttemperatur) überlegen. Aber auch hier sind die Unterschiede wieder sehr gering, was die oben genannten Ergebnisse bestätigt.

Damit zeigt sich, dass die Stromstärke einen zwar schwachen, aber dennoch statistisch nachweisbaren Einfluss auf die Sedimenttemperatur hat. Für die Sedimenttiefe von 20cm gemessen von der Oberfläche konnte mit diesen statistischen Verfahren hinsichtlich des Zusammenhangs der Sedimenttemperatur und der Nutzlast im Kabel (Stromstärke) keine positive partielle Korrelation festgestellt werden. Die Temperaturunterschiede zwischen

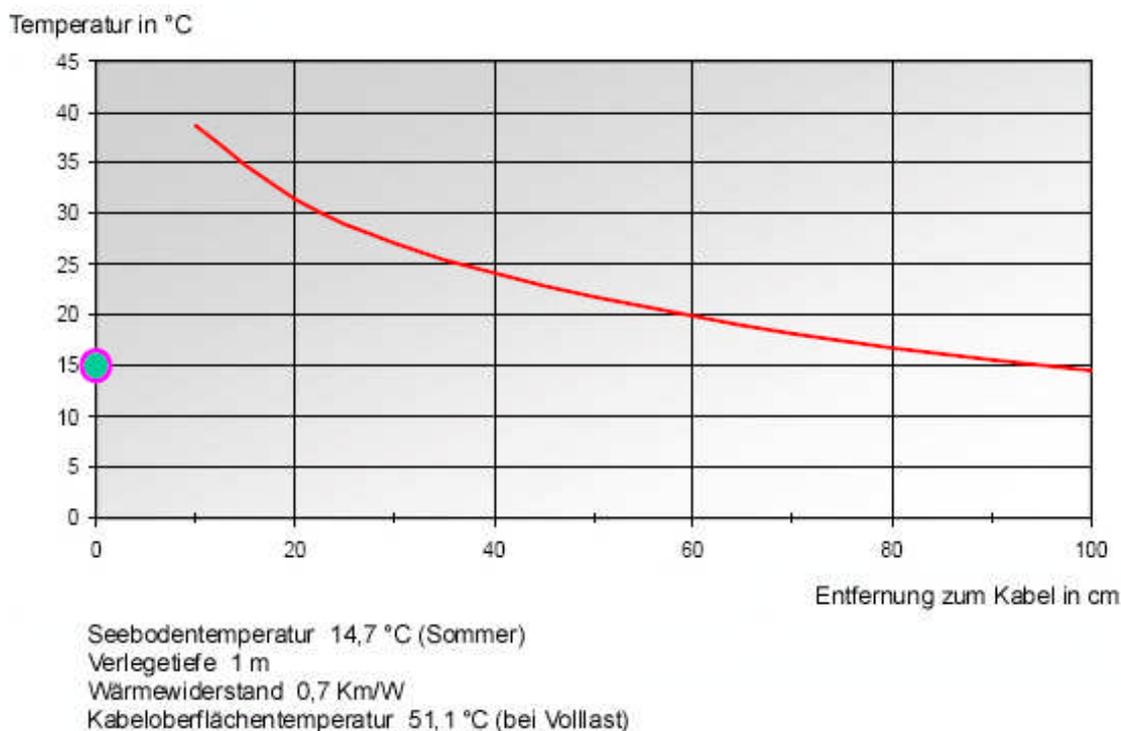
Messstation und Referenzstation überschreiten in dieser Tiefe in nur weniger als einem Prozent des Beobachtungszeitraumes das 2K-Kriterium des Bundesamtes für Naturschutz für diese Tiefe (Tab. 8).

## 2.4 Zusammenfassende Diskussion

Die Messungen der Seebodentemperatur im Offshore-Windpark Nysted Havmøllepark sollten einen Beitrag zur Diskussion der Kabelwärme-Problematik liefern. Diese Diskussion war in Deutschland im Zusammenhang mit der Förderung des Ausbaus der Nutzung der Windenergie, verbunden mit der Errichtung von Windparks auf dem Meer, entstanden. Im Rahmen der Genehmigungsverfahren für die einzelnen Windpark-Projekte in Nord- und Ostsee wurden Studien vorgelegt, in denen die voraussichtliche Erwärmung des Meeresbodens, verursacht durch eine Wärmeemission der elektrischen Kabel, untersucht wurde (z.B. Impact of submarine cables on the marine environment – a literature review – 2006, IfAÖ im Auftrag BfN). Ein Beispiel für das Ergebnis aus einer solchen Studie ist in der Abbildung 25 dargestellt.

Für den Nahbereich des Kabels (20cm Distanz, also 80cm unter der Sedimentoberfläche) wird hier eine Temperaturerhöhung von etwa 17K prognostiziert, 40cm unter der Sedimentoberfläche könnte der Temperaturanstieg bei 5K liegen und bei 20cm Sedimenttiefe werden noch etwa 2K Temperaturdifferenz vorausgesagt. Dieses Ergebnis deckt sich in der Grundaussage mit Berechnungen anderer Autoren: in Kabelnähe können hohe Temperaturen auftreten, in größerer Nähe zur Sedimentoberfläche überschreitet der Temperaturanstieg einen Wert von 2K nicht (z.B. Eos Offshore AG 2003, Worzyk & Böngeler 2003, Offshore Wind Technology GmbH 2004). Brakelmann (2006) argumentiert, dass die Ergebnisse der Modellierungen als sehr konservative Schätzungen anzusehen sind, da in den meisten Fällen von mehrtägigen Volllastphasen ausgegangen wurde. Solche Phasen traten nach Quellen Brakelmans (Geo mbH) nicht häufig auf. So zitiert Brakelmann (2006), dass zwei aufeinander folgende Volllasttage in den Jahren 1994 bis 2003 an einem Offshore-Standort vor Sylt maximal 10mal pro Jahr auftraten (im betrachteten Zeitraum nur im Jahr 2002), im Durchschnitt rund 7mal. Drei aufeinander folgende Volllasttage traten im betrachteten Zeitraum im Mittel zweimal im Jahr auf, im Jahr 1994 allerdings 7mal. Vier, fünf oder sechs aufeinander folgende Volllasttage sind seltene Ereignisse und konnten maximal einmal pro Jahr beobachtet werden. Somit sollte in der Konsequenz die Meeresbodentemperatur an der großen Mehrzahl der Tage im Jahr unter denen in den Berechnungen ermittelten Werten liegen.

Die Ergebnisse der Messungen in Nysted scheinen die Aussagen Brakelmans zu bestätigen. Die mittels Modellierung vorausgesagten Sedimenttemperaturen für verschiedene Windparkprojekte in Nord- und Ostsee wurden im Havmøllepark Nysted im Untersuchungszeitraum nicht im vergleichbaren Rahmen erreicht.



**Abb. 25:** Beispiel für eine Modellierung der Temperatur im Seeboden für die parkinterne Verkabelung (Mittelspannung, Wechselstrom) eines Offshore-Windparks mit großer Leistung (nach Pöhler 2006).

Insgesamt kann ausgeführt werden, dass durch die Ergebnisse des Vorhabens zum ersten Mal reale Messdaten an einem Elektrokabel im marinen Bereich geliefert werden konnten. Bei den Daten handelt es sich um kontinuierlich gemessene Langzeitdaten, die in Abhängigkeit von der Entfernung vom Kabel und an Referenzen ermittelt wurden.

Nachgewiesen werden konnte ein statistisch abgesicherter enger Zusammenhang zwischen Sediment- und Wassertemperatur. Die Sedimenttemperatur war, wenn auch in geringerem Maße, auch vom Lastzustand (also Wärmeproduktion) beeinflusst. Der Zusammenhang war abhängig von der Jahreszeit. Generell war zu beobachten, dass die Seebodentemperaturen im Einflussbereich des Kabels im Frühjahr und Herbst meist höher waren als die Temperaturen des Wasserkörpers. Im Sommer hingegen überstiegen die Wassertemperaturen in der Regel die Temperaturen im Substrat. So lagen in den Monaten Mai, Juli, August und z.T. auch noch Anfang September die Wassertemperaturen i.d.R. über den Sedimenttemperaturen. In den Monaten März bis einschließlich Anfang Mai dagegen lagen die Sedimenttemperaturen über den Wassertemperaturen. Innerhalb kurzer Perioden (Zeiträume von 3 bis 6 Tagen) ließ sich dieses auch in den Monaten Juli und August beobachten. Ab Mitte September befanden sich dann - von sehr kurzen Unterbrechungen abgesehen - die Wassertemperaturen immer oberhalb der Sedimenttemperaturen (vgl. Abb. 19).

Die Sedimenttemperaturen senkrecht über dem Kabel waren höher als die Sedimenttemperaturen, die in 30cm (seitlicher) Entfernung gemessen wurden. Die maximale Temperaturdifferenz zwischen den Sensoren T32 (senkrecht) und T16 (in 30cm Entfernung) am 132-kV-Kabel betrug 0,5K, bei dem 33-kV-Kabel lag diese Differenz bei 0,2K. Die Mediane unterscheiden sich aber nur um 0,3K (132kV) bzw. um 0,04K (33kV).

Eine weitere Abhängigkeit des Einflusses der Kabeltemperatur auf die Sedimenttemperatur zeigte sich von der Sedimenttiefe. Mit zunehmender Entfernung vom Kabel nimmt die durch das Kabel bedingte Temperaturdifferenz schnell ab. Dieses zeigte auch die statistische Auswertung. Eine positive partielle Korrelation zwischen Stromstärke und Sedimenttemperatur zeigte sich nur bis eine Entfernung von 20cm vom Kabel, d.h. bis zu einer Sedimenttiefe von maximal 30cm unterhalb der Sedimentoberfläche.

So war die Temperatur in einer Sedimenttiefe von 20cm unterhalb der Sedimentoberfläche bei der Messstation am 132-kV-Kabel bei 75% des Beobachtungszeitraums nur maximal 1K erhöht im Vergleich zu der unbeeinflussten Referenzstation. Bei 24% des Zeitraums lag die Temperatur sogar unterhalb der Referenzstation, was aber jahreszeitlich bedingt war. In nur einem Prozent des Beobachtungszeitraums lag die Temperaturerhöhung in dieser Sedimenttiefe oberhalb der 2K-Vorgabe des Bundesamtes für Naturschutz.

Insgesamt muss bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden, dass die Messungen in recht grobem Substrat durchgeführt wurden, welches die Wärme vergleichsweise schnell in den überstehenden Wasserkörper ableiten kann. Zum anderen war die Kabel überdeckende Sedimentschicht mit 65-80cm recht gering, so dass die Temperatur des Wasserkörpers auch für kabelnahe Seebodenbereiche eine wichtige Einflussgröße darstellte. Die Windparkbetreiber weisen zudem auf die in Hinblick auf die zu erwartende Kabellast konservativ gewählten Kabelspezifikationen im windparkinternen Kabelnetz hin (DONG Energy and SEAS, pers. comm.). Außerdem muss bei der Diskussion der Messergebnisse im Bereich des 132-kV-Kabels die vergleichbar geringe Kapazität des Windparks für die Stromproduktion (166MW) berücksichtigt werden. Offshore-Projekte im deutschen Küstenmeer und in der deutschen AWZ planen Kapazitäten zwischen 500 und 600MW. Die Abführung der Leistung aus Offshore-Parks dieser Größenordnung wird neue technische Lösungen erfordern. Dies könnten neue leistungsfähigere Kabel sein, die höhere Übertragungsleistungen garantieren. Auch belegen die aktuellen Planungen, dass in einigen Gebieten die Kabel verschiedener Windparks in gemeinsamen Trassen zusammengeführt werden. Möglicherweise entstehen dadurch Bedingungen, die eine stärkere Erwärmung des Meeresbodens fördern.

Die Ergebnisse liefern erste konkrete Informationen zu Langzeitmessungen der Temperatur im Bereich eines Elektrokabels und in Vergleichsedimenten. Damit liegt eine gute Grundlage für weitere Messkampagnen vor, die an anderen Leitungen für Windparks durchgeführt werden, damit dann insgesamt verlässliche, vergleichbare und verallgemeinbare Daten zur Verfügung stehen. Beachtet werden muss, dass die Temperatur für ein Ökosystem eine wichtige „Größe“ darstellt. Sie kann nicht nur die Fauna und Flora in den ersten

---

Sedimentschichten beeinflussen, sondern auch in tieferliegenden Sedimentbereichen können Temperaturveränderungen zu physikalischen und biochemischen Veränderungen führen, die wiederum Änderungen in der Biologie auf unterschiedlichen Organisationsstufen induzieren können. Das kann sowohl bereits auf der Ebene der Mikroorganismen bis hin zu Interaktionen mit dem Makrozoobenthos stattfinden.

### 3 Biomarker als diagnostische Indikatoren für Umweltstress

Vor dem Hintergrund potenzieller Wirkungen von im Meeresboden verlegten Seekabeln auf die benthische Infauna und Epifauna wurden Laboruntersuchungen an ausgewählten benthischen wirbellosen Organismen durchgeführt. Dabei wurden biologische Endpunkte (Biomarker) betrachtet, die geeignet sind biologische Effekte von EMF und thermischer Belastung anzuzeigen. Als Begleitparameter wurden biometrische Daten der untersuchten Tiere wie Kondition, Proteingehalt und Reproduktionsstatus ermittelt.

#### 3.1 Biomarker-Ansatz

Organismen aquatischer Ökosysteme können in ihrem Lebensraum verschiedenen natürlichen und anthropogen bedingten Stressfaktoren ausgesetzt sein und dadurch eine Beeinträchtigung ihres Gesundheitszustandes erfahren. Neben der oftmals im Vordergrund der Betrachtung stehenden chronischen Belastung mit diversen „chemischen Schadstoffen“ können selbstverständlich auch physikalische Stressfaktoren wie z.B. UV-Strahlung und ionisierende Strahlung sowie die in dieser Studie betrachteten Faktoren „Temperaturstress“ und „Elektromagnetische Felder“ negative biologische Effekte hervorrufen.

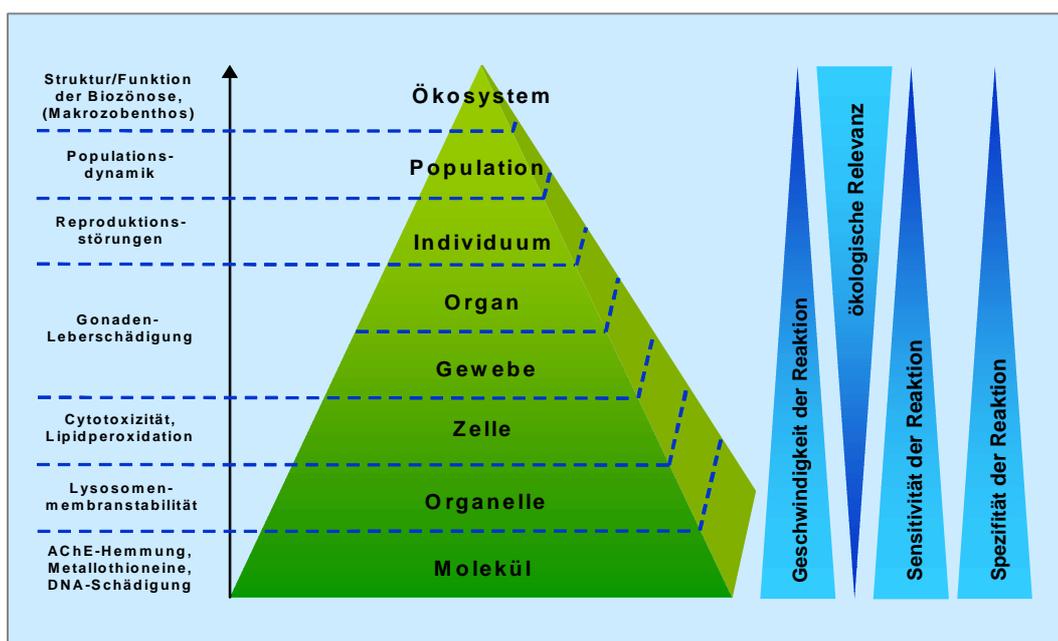
Überschreitet die Intensität bzw. Dosis eines Reizes in Verbindung mit der Belastungsdauer (Exposition) eine bestimmte Schwelle, kommt es zunächst zu Veränderungen auf der molekularen und biochemischen Ebene bei Strukturen wie z.B. Enzymen, Membranen oder der DNA. Diese Interaktion kann zu Effekten auf höheren biologischen Ebenen wie der Gewebe und Organe führen und sich letztendlich in Beeinträchtigungen von Leistungen beim Individuum manifestieren. Genannt seien hier chronische Wirkungen auf das Immunsystem, Wachstum und Entwicklung sowie die Fortpflanzung. Derartige Stresseffekte können sich auch potentiell bis auf Populationen und Lebensgemeinschaften auswirken (Fent, 1998) (Abb. 26). Es führt aber nicht jeder Kontakt mit einem schädlichen Stoff auch zu einem nachweisbaren Effekt. Mit Hilfe von Schutz- und Adaptationsmechanismen versucht der Körper zunächst seine Homöostase aufrechtzuerhalten. Erst wenn die Kompensation überfordert ist, tritt eine Schädigung ein (Adams, 2002).

Das Paradigma der stufenweisen Ausbildung von Stresseffekten auf den verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation ist untrennbar mit dem Biomarker-Konzept verbunden. Darunter versteht man die spezifischen biologischen Endpunkte, die im Rahmen biologischer Effektuntersuchungen betrachtet werden. Die Auswahl an Biomarkern erfolgt im Allgemeinen so, dass Stresseffekte auf den unterschiedlichen biologischen Organisations-ebenen erfasst werden.

Das National Research Council der USA definiert Biomarker als „auf biochemischer und zellulärer Ebene messbare Indikatoren, die Hinweise auf Einwirkungen von Schadstoffen geben“ (NRC, 1999). Nach der weiter gefassten Definition von Depledge et al. (1995) sind ökotoxikologische Biomarker biochemische, zelluläre, physiologische oder verhaltensmäßige Veränderungen, die in einer Körperflüssigkeit, einem Gewebe oder auf dem Niveau des Individuums gemessen werden können und eine Evidenz für eine Exposition und/oder einen

Effekt eines oder mehrerer Schadstoffe darstellen. Im vorliegenden Bericht werden unter dem Begriff „Biomarker“ Endpunkte betrachtet, die auf allen Ebenen der biologischen Organisation auf Stressfaktoren reagieren.

Im Rahmen des biologischen Effektmonitoring dienen Biomarker dazu, Stress- und Schadstoffeffekte an Organismen im Freiland zu ermitteln (Gercken & Sordyl, 2007). Unter definierten Laborbedingungen sind Biomarker bestens dazu geeignet, im Sinne eines Frühwarnsystems, biologische Wirkungen einzelner Stressfaktoren auf der Ebene von Zellen und Organen nachzuweisen.



**Abb. 26** Ausbildung von Stress- und Schadstoffeffekten auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation und im zeitlichen Verlauf. (Abb. mod. nach Burkhardt-Holm, 2001)

Beim Monitoring von anthropogenen Umweltbelastungen ist weltweit ein Trend zu einem mehr ökosystemaren Ansatz zu verzeichnen. Biomarker fungieren dabei als Schnittstelle zwischen der chemischen Umweltanalytik und Parametern auf der Ökosystemebene. Diese wichtige Funktion können Biomarker auch einnehmen, wenn es um die Bewertung der Folgen von physikalischem Stress wie z.B. UV-Strahlung, EMF und thermischer Belastung geht (Downs et al., 2000; Downs et al., 2001).

Vor diesem Hintergrund finden sich in der Literatur der letzten Jahre vermehrt Publikationen, welche die wichtige Rolle von Biomarkern im Rahmen einer integrierten Umweltüberwachung bzw. Risikoanalyse hervorheben (Hagger et al., 2006; Handy et al., 2003; Moore et al., 2004). Dabei wird auch auf den notwendigen Einsatz von Biomarkern bei der Umsetzung von Richtlinien bzw. Verordnungen der EU wie z.B. der Wasserrahmenrichtlinie und der Natura-2000-Richtlinie (Apitz et al., 2006; Hagger et al., 2006) und bei der Erfüllung der mit den OSPAR- und HELCOM-Übereinkommen eingegangenen Verpflichtungen (Hagger et al., 2006; ICES, 2004; ICES, 2006) eingegangen.

## **3.2 Zur Bedeutung der ausgewählten Biomarker**

In den Teilprojekten zu Wirkungen von thermischer Belastung und von EMF auf die Miesmuschel wurden verschiedene Biomarker als Indikatoren für biologischen Stress ausgewählt. Im Folgenden wird die Bedeutung dieser Biomarker kurz vorgestellt.

### **3.2.1 Stressproteine (Heat Shock Proteins)**

Als Reaktion auf unterschiedliche Arten von Stresseinwirkungen reagieren Organismen mit der Produktion von Schutzproteinen, die zur Gruppe der Stressproteine gezählt werden. Diese Proteine wurden ursprünglich als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet, da sie erstmalig als Stressreaktion auf eine thermische Belastung beschrieben wurden. Mittlerweile sind neben Hitze weitere Stressoren bekannt, die zur Hsp-Expression führen, so dass man heute allgemein von Stressproteinen spricht. Beispiele für Stressfaktoren sind metallische und organische Schadstoffe, UV-Strahlung und EMF (Kültz, 2003).

Stressproteine zählen zu den im Verlauf der Evolution am höchsten konservierten Proteinen und kommen auf allen Ebenen biologischer Organisation (Bakterien, Pflanzen, Tiere) vor. Sie sind konstitutiver Bestandteil vieler Zellkompartimente wie z.B. Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien. Entsprechend ihrer Molmasse werden sie in Stressprotein-Familien aufgeteilt: Hsp90 (90 kDa), Hsp70, Hsp60 und kleiner molekulare Hsp (Kültz, 2003). Die Hsp70-Familie ist die größte und am besten untersuchte Stressproteinfamilie.

Hsp sind für die Integrität der Zelle von essentieller Bedeutung. Sie sind an der korrekten Faltung und Stabilisierung neu gebildeter Proteine, an deren Transport durch Membranen und an der Bildung oligomerer Proteinstrukturen beteiligt (Chaperon-Funktion). Ihre „Hilfestellung“ bei der korrekten Faltung von Proteinen kommt auch zum Tragen, wenn es um die Reparatur fehlgefalteter und teilweise denaturierter Proteine geht. Ist die Schädigung so stark, dass eine korrekte Rückfaltung nicht mehr möglich ist, sind Hsp auch an der „Aussortierung“ betroffener Proteine beteiligt, damit deren Abbau in den Lysosomen erfolgen kann (Mayer & Bukau, 2005; Sørensen et al., 2003).

Da chemische und physikalische Stressfaktoren häufig eine denaturierende Wirkung auf Proteine ausüben, wird dadurch auch die Schutzfunktion der Hsp aktiviert (Stressreaktion). Eine verstärkte Expression von Hsp gilt daher auch als Effekt einer proteotoxischen Wirkung. Ihr Reaktionsvermögen auf zellulären Stress macht Hsp zu einem häufig genutzten Biomarker im Rahmen von physiologischen und ökotoxikologischen Fragestellungen (Bierkens, 2000; Sanders, 1993).

In der vorliegenden Studie stellte die Analyse der Expression von Hsp70 nach thermischer Belastung oder nach einer 50Hz-EMF-Befeldung von Miesmuscheln einen Schwerpunkt der Biomarker-Untersuchung dar. Auf diesbezügliche Literatur wird am Beginn der Darstellung dieser Teilprojekte eingegangen.

### 3.2.2 Comet-Assay

Der Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) ist ein sensitives Verfahren zum Nachweis genotoxischer Veränderungen an der DNA. Mit ihm lassen sich DNA-Schäden, die als Strangbrüche oder alkalilabile Stellen vorliegen, an einzelnen Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops quantifizieren (Deventer, 1999; Mitchelmore et al., 1998; Singh et al., 1988). Bei Untersuchungen an der Miesmuschel werden zumeist die Hämocyten (Blutzellen) eingesetzt. Hierfür werden die Zellen zunächst in Agarose eingebettet und auf einem Objektträger ausgestrichen. Darauf folgte eine Lyse der Zellen in Detergens und anschließend eine Elektrophorese. Dabei wandert geschädigte DNA im elektrischen Feld in Richtung Anode aus dem Zellkern aus und bildet eine Art „Kometenschweif“ (Wanderungsbereich der DNA). Nach Anfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff lässt sich der Grad der DNA-Schädigung (Schweifbildung) an einer Stichprobe von Hämocyten mit einem Fluoreszenzmikroskop in Verbindung mit einer bildanalytischen Software quantifizieren.

Am Institut für Angewandte Ökologie GmbH wird der Comet-Assay seit mehreren Jahren im Rahmen von Biomarker-Untersuchungen an der Miesmuschel eingesetzt (Gercken & Sordyl, 2003; Zorn, 2000).

### 3.2.3 Metallothionein-Induktion

Metallothioneine [MT] sind intrazelluläre, metallbindende Proteine, die im gesamten Organismenreich verbreitet sind (Hamer, 1986). Sie nehmen eine zentrale Funktion beim Stoffwechsel von Spurenelementen ein. So binden sie die essentiell benötigten Metalle Kupfer und Zink und vermitteln deren Verteilung und Übertragung auf metallhaltige Enzyme. MT stellen damit Spurenmetalle für Synthesen zur Verfügung, ohne dass die Metalle als freie, toxische Ionen Schäden im Körper anrichten.

Die Bedeutung der MT als Biomarker liegt darin begründet, dass sie auch zu den Proteinen zählen, die infolge von Stress induziert werden können. In erster Linie ist hier ihre Induktion durch verschiedene Schwermetalle zu nennen. Die vermehrte Bildung von MT stellt damit eine Entgiftungsreaktion des Körpers dar. Wird die Entgiftungskapazität der MT bei einer hohen Schwermetallbelastung überfordert, kann die Zelle durch freie Metallionen geschädigt werden (Viarengo, 1989; Viarengo & Nott, 1993).

Bei der Miesmuschel wird der MT-Gehalt in der Mitteldarmdrüse nicht allein von Metallen, sondern auch von weiteren Stressfaktoren, wie beispielsweise freien Radikalen (oxidativer Stress), Infektion und Hunger beeinflusst (Viarengo et al., 1999). Hinsichtlich der Induzierbarkeit durch oxidativen Stress besteht auch ein Bezug zu einer durch Temperaturstress gesteigerter Stoffwechselaktivität. Dass die Umgebungstemperatur den MT-Gehalt in Organismen beeinflussen kann, ist am Beispiel eines Plattfisches (Kliesche) gezeigt worden (Lacorn, 1999). Bei der Miesmuschel erfolgt die Bestimmung des MT-Gehaltes im Allgemeinen in homogenisierten Mitteldarmdrüsen. Dabei hat sich das von Viarengo et al. (1997) entwickelte photometrische Nachweisverfahren bewährt.

### 3.2.4 Acetylcholinesterase-Hemmung

Der Biomarker AChE-Hemmung zählt zu den „klassischen“ Parametern zum Nachweis von neurotoxischen Schadstoffwirkungen. Eine Hemmung der AChE-Aktivität in Organen weist auf erhöhte Pestizidkonzentrationen in der Umwelt hin. Es gibt auch neuere Befunde, die auf eine Hemmung der AChE durch bestimmte Metalle hinweisen. Da es sich bei der AChE um ein Enzym handelt, ist ein Einfluss von erhöhter Temperatur auf die Aktivität zu erwarten.

Bei den gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der AChE-Aktivität handelt es sich zumeist um Modifikationen der ursprünglich von Ellman et al. (1961) publizierten Methode. Sie beruht auf der AChE-vermittelten Spaltung des spezifischen Substrats Acetylthiocholinjodid in Thiocholin und Essigsäure. Thiocholin bildet in Gegenwart von DTNB (Dithiobisnitrobenzoat) ein gelbes Reaktionsprodukt, das sich photometrisch quantifizieren lässt. Die Ellman-Methode wurde an die Verwendung von Mikrotiterplatten angepasst und hat dadurch eine breite Anwendung beim biologischen Effektmonitoring gefunden (Galgani & Boquene, 1991; Bocquene & Galgani, 1998).

### 3.2.5 Lipidperoxidation

Sauerstoffatmende Organismen produzieren ständig und unvermeidbar zellschädigende reaktive Sauerstoffverbindungen als Nebenprodukte ihres normalen Atmungsstoffwechsels. Sie verfügen daher über antioxidative Abwehrmechanismen, die sie vor den schädlichen Folgen der Radikale schützen. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen. Unter dem Einfluss verschiedener Formen von Stress kann sich die Bildungsrate der Radikale so weit erhöhen, dass die Schutzkapazität des Organismus nicht mehr ausreicht. Es kommt zum sog. „oxidativen Stress“ und der damit verbundenen Schädigung von zellulären Strukturen (Ahmad, 1995; Josephy et al., 1997; Kelly et al., 1998).

Zu den toxischen Konsequenzen von oxidativem Stress gehören auf subzellulärer Ebene die oxidative Schädigung von Proteinen und DNA sowie die Lipidperoxidation von Membranen. Bei der Lipidperoxidation sind die in den Zellmembranen vorhandenen ungesättigten Fettsäuren der Angriffspunkt der oxidativen Kettenreaktion. Ein Abbauprodukt dieser Peroxidasereaktion ist das Malondialdehyd [MDA] (Josephy et al., 1997; Kelly et al., 1998). MDA und weitere Degradationsprodukte von Membranen wirken aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit anderen Zellkomponenten toxisch. Die photometrische Bestimmung des MDA in einem Gewebehomogenat ist eine gebräuchliche Methode zur Quantifizierung der abgelaufenen Lipidperoxidation und somit ein Indikator für oxidative Prozesse (Buege & Aust, 1978).

### 3.2.6 Stabilität der Lysosomenmembran (Neutralrot-Test)

Lysosomen sind polymorphe Zellorganellen, die vielfältige intra- und extrazelluläre Aufgaben besitzen. Bei Muscheln ist der stark entwickelte Lysosomenkomplex der Mitteldarmdrüse für die intrazelluläre Verdauung der Nahrung zuständig. Andere Funktionen betreffen u.a. das Recycling von Proteinen, die zelluläre Abwehr (Adema et al., 1991), Zellentgiftung und Resorption von Gameten (Bayne et al., 1978). Die aggressiven Hydrolasen in den Lysosomen können jedes biologische Material abbauen und sind daher potenziell auch für die Zelle gefährlich. Diese Enzyme werden daher vorwiegend in einer inaktiven Form in den mit einer dicken Membran ausgestatteten Lysosomen gespeichert.

Zahlreiche chemische, physikalische und Umweltstressoren führen zu einer Destabilisierung der Lysosomenmembran. Zu den Faktoren, die bekanntermaßen die Stabilität der Lysosomenmembran von Bivalviern labilisieren können zählen die Temperatur (Moore, 1976), Reproduktion (Bayne et al., 1976) sowie Hunger und schnelle Änderungen der Salinität (Bayne et al., 1976). Lysosomen sind auch von Bedeutung für die Homöostase von Metallen, indem sie die metallbindenden Metallothioneine aufnehmen und speichern (Viarengo et al., 1987). Die Veränderung der Membranstabilität ist eine der Hauptreaktionen der Lysosomen gegenüber einem breiten Spektrum von Schadstoffen. Im Rahmen des biologischen Monitoring gilt dieser Endpunkt daher auch als Biomarker für eine allgemeine Reaktion auf Stressfaktoren (z.B. Bayne et al., 1982; Domouhtsidou et al., 2004; Moore, 1988; Regoli, 1992). Die Anwendungsmöglichkeit als Biomarker wurde durch Untersuchungen an transplantierten Muscheln (Nasci et al., 2000; Regoli et al., 1993; Stien et al., 1998; Viarengo & Canesi, 1991) und in Laborversuchen (Harrison & Berger, 1982; Viarengo et al., 1987) bewertet.

Eine weit verbreitete Methode zum Nachweis einer Schädigung der lysosomalen Membran ist der von Borenfreund und Puerner (1984) entwickelte Neutralrot-Test. Er beruht auf der Aufnahme und Speicherung von Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in den Lysosomen von Zellen. Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der über Diffusion in das Zellplasma gelangt und dort durch Bindung an die lysosomale Matrix in den Lysosomen akkumuliert. Liegt eine Schädigung der lysosomalen Membran vor, führt dies zu einer verringerten Farbstoffretention in den Lysosomen und zur Rücklösung im Cytoplasma.

Zur Durchführung des Tests werden Hämocyten zusammen mit einer Neutralrot-Lösung für einen definierten Zeitraum in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Nach dem Entfernen der Neutralrot-Lösung wird das in den Hämocyten verbliebene Neutralrot extrahiert und die Extinktion der Färbung mit einem Spektralphotometer gemessen (Parry & Pipe, 2004).

### 3.2.7 Phagozytose-Aktivität

Die Fähigkeit zur Phagozytose, d.h. zur Aufnahme und Vernichtung von Krankheitserregern durch spezialisierte Zellen, zählt zu den Schlüsselfunktionen des Immun- und Abwehrsystems. Bei Wirbeltieren sind die Monocyten und Granulocyten aus dem Blut und weitere Zelltypen des Immunsystems zur Phagozytose fähig. Bei wirbellosen Tieren spielt die von

Immunzellen (Hämocyten) vermittelte Phagozytose eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern.

Zur Bestimmung der Phagozytose-Aktivität gibt es unterschiedliche methodische Ansätze. In der vorliegenden Untersuchung wurde den Hämocyten der Miesmuschel Neutralrot-gefärbte Hefezellen zur Phagozytose angeboten. Nach dem Ende einer definierten Inkubationszeit wurden die Hämocyten lysiert und die Phagozytose-Aktivität anhand des im Überstand gelösten Neutralrots photometrisch ermittelt (Hagger et al., 2005).

### **3.2.8 Histologische Untersuchung**

Histopathologische Veränderungen sind ein Indikator für die Manifestation von Stresseffekten auf der Organebene. Sie integrieren Wirkungen auf einem höheren Niveau biologischer Organisation, da sie auf physiologischen und biochemischen Veränderungen beruhen (Hinton et al., 1992).

Bei der Miesmuschel werden im Allgemeinen die Mitteldarmdrüse (Hepatopankreas) [MDD], Kieme und Gonade als „Indikatororgane“ betrachtet. An diesen Organen lassen sich pathologische Effekte besonders gut nachweisen und strukturelle Veränderungen relativ leicht erfassen. Die MDD ist von zentraler Bedeutung im Stoffwechsel und ist dadurch im besonderen Maße den Wirkungen von Stressfaktoren ausgesetzt.

Wegen seiner Bedeutung für die Reproduktion besitzt auch das Gonadengewebe ebenfalls eine relevante Indikatorfunktion. Oftmals reagieren die Keimzellen besonders sensibel auf adverse Umweltveränderungen (Gercken & Sordyl, 2003).

## 4 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Beprobung und Zwischenhälterung von Miesmuscheln sowie die Methoden der Biomarker-Untersuchungen in den Teilprojekten zur EMF- und thermischen Exposition beschrieben. Die Versuchsanlage für die EMF- und Temperatur-Exposition wird im Zusammenhang mit der Präsentation der Versuchsergebnisse beschrieben.

### 4.1 Testorganismus und Untersuchungsmaterial

Die Miesmuschel (*Mytilus edulis*) ist in den Küstengewässern von Mecklenburg-Vorpommern ein dominierendes Element der Benthoslebensgemeinschaft. Obwohl sie bevorzugt Hartsubstrate besiedelt, kommt sie auf sandigem Boden, angeheftet an Steinen und Schill oder auch lose als Muschel-Aggregate vor. Auch auf schlickigen Böden der stark eutrophierten inneren Küstengewässer ist *Mytilus edulis* zu finden. Der Reproduktionszyklus der getrenntgeschlechtlichen Tiere beginnt mit der Entwicklung des Gonadengewebes im Spätherbst und Winter. Mit dem Beginn der Frühjahrsplanktonblüte findet dann eine schnelle, abschließende Reifung der Gameten statt. In Abhängigkeit von Temperatur und Nahrungsangebot erstreckt sich die Laichzeit dann auf den Zeitraum April bis Mitte Juni, wobei die Hauptlaichaktivität zu Beginn der Laichzeit auftritt (Gercken & Sordyl, 1999; Gercken & Sordyl, 2003).

### 4.2 Probenmaterial und Zwischenhälterung

Die Miesmuschelproben für die Durchführung der EMF-Befeldungen und die thermische Exposition wurden im Bereich des Seekanals Rostock-Warnemünde gesammelt. In diesem Bereich stand ganzjährig ausreichend Probenmaterial für die häufigen Probenahmen zur Verfügung. Die Muscheln wiesen eine gute Kondition bzw. Fitness auf. Da sie an unbehandelten Spundwänden angeheftet waren, bestand kein direkter Kontakt zu möglicherweise belastetem Sediment.

Die gesammelten Muscheln wurden in Umgebungswasser zum IfaÖ gebracht und dort in künstlichem Meerwasser (Sera, Heinsberg) bis zu Versuchsbeginn gehältert. Der Salzgehalt und die Wassertemperatur wurden so eingestellt, dass sie den Verhältnissen am Beprobungsort entsprachen. Die Temperatur wurde über eine an einem Kühlaggregat (ProfiCool Genius, National Lab, Mölln) angeschlossene Kühlschlange reguliert und die Belüftung des Wassers erfolgte mit einer Aquariumpumpe.

### 4.3 Entnahme von Gewebeproben für einzelne Untersuchungen

Nach einer EMF-Befeldung oder Temperatur-Exposition wurden die Miesmuscheln seziiert und Gewebeproben für die Messung der einzelnen Parameter entnommen. Für Untersuchungen an den Hämocyten wurde vor der eigentlichen Sektion Hämolymphe aus dem hinteren Schalenschließmuskel mittels einer Kanüle in eine Spritze aufgezogen. Da Hämocyten *ex vivo* stark zur Aggregation neigen, wurde in der Spritze etwas eisgekühlter TBS-EDTA-Puffer vorgelegt, um das Verklumpen der Zellen zu unterbinden.

Mit den einzelnen Gewebeproben wurden folgende Tests durchgeführt:

- Hämocyten: Hsp70-Expression; Neutralrot-Test, Phagozytose-Assay, Comet-Assay
- Mitteldarmdrüse: Lipidperoxidation, Metallothionein-Gehalt
- Kieme: AChE-Aktivität, Hsp70-Expression

#### **4.4 DNA-Schädigung (Comet-Assay)**

Der Comet-Assay wurde eingesetzt, um das potenzielle Auftreten einer DNA-Schädigung an den Hämocyten der Miesmuschel zu überprüfen. Die bei der Sektion entnommene Hämolymphe wurde in gekühlter *Mytilus*-Ringerlösung aufgenommen. Die Ermittlung der Zelldichte erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde gleichzeitig die Zellvitalität nach der Trypanblau-Methode ermittelt.

Für die Durchführung des Comet-Assays wurden zunächst Objektträger (76x26 mm, Fa. Menzel) nach Singh et al. (1988) und Zorn (2000) mit einem Agarose-Gel beschichtet. Anschließend wurden 30µl Hämocyten-Suspension mit 90µl 0,7% LMA (Low Melting Agarose) in PBS bei 40°C vermischt und auf Agarose-beschichtete Objektträger blasenfrei mit einem Deckglas aufgetragen. Nach Erstarren der Agarose bei 4°C wurde der Ansatz für mindestens 1,5 Stunden in eine vorgekühlte alkalische Lyselösung gestellt, wodurch eine Aufwindung der DNA in den Zellen bewirkt wird. Anschließend wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gewaschen, horizontal in einer eisgekühlten Elektrophoresekammer (MWG–Biotech) angeordnet und mit gekühltem, alkalischen Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese wurde für 20min bei 300mA und 25V durchgeführt. Zum Abschluss der Präparation wurden die Objektträger in Tris-Puffer (0,4M) neutralisiert und die Kern-DNA durch Überschichten des Objektträgers mit jeweils 50µl Ethidiumbromid (20µg/ml) fluoreszenzmarkiert.

Die Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten Hämocyten-Kerne erfolgte mit einem Mikroskop (Olympus BH-2) bei Fluoreszenzanregung (510-560nm) und 400facher Vergrößerung. Pro Objektträger wurde die DNA von 100 Zellen mit Hilfe der Software Kinetic Imaging Comet 4.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool) bildanalytisch ausgewertet. Für die Darstellung der DNA-Schädigung wurde der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Tail%DNA) zugrunde gelegt.

#### **4.5 Nachweis des Stressproteins-70 (Hsp70)**

##### **4.5.1 Nachweis der Hsp70-Expression mit der Durchflusszytometrie**

Mit der Methode der Durchflusszytometrie lassen sich Einzelzellen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften und der Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen unterscheiden. Die in Suspension vorliegenden Zellen werden hydrodynamisch in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl fokussiert, so dass sie einzeln in einer Messküvette einen Laser durchqueren. Anhand der dabei auftretenden Lichtstreuung lassen sich Zellpopulationen

hinsichtlich Größe und intrazellulärer Granularität unterscheiden. Durch das Laserlicht (z.B. Argonlaser  $\lambda=488\text{nm}$ ) werden auch die zum Nachweis zellulärer Antigene eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zur Fluoreszenz angeregt. Dabei ist die Stärke der gemessenen Fluoreszenz proportional zur Expression des Antigens in der Zelle. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung von mehreren tausend Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraums.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um die Expression von Hsp70 in den Hämocyten der Miesmuschel nach Exposition im EMF oder nach thermischer Belastung zu analysieren.

Für die Messungen wurden immer Hämolymp-Probenn von mehreren Muscheln ( $n=5-9$ ) zu einer Sammelprobe (Poolprobe) vereinigt. Damit nicht zu große Unterschiede hinsichtlich des Hämocyten-Anteils einzelner Tiere in einer Sammelprobe entstanden, wurde von Hämolymp-Probenn mit einer hohen Hämocyten-Konzentration weniger Volumen verwendet als von Probenn mit einer geringeren Zelldichte. Nach Zentrifugation erfolgte eine Resuspendierung der gepoolten Hämocyten in TBS-EDTA-Puffer und deren Fixierung in 10ml kaltem Methanol. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Detektion von Hsp70 in den Hämocyten wurden diese zunächst mit einem Hsp70-spezifischen Primärantikörper (monoclonaler Anti-Hsp70 Antikörper aus der Maus; BD Biosciences) inkubiert. Um die gebundenen Maus-Antikörper mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren, erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt mit einem gegen Maus-Antikörper gerichteten FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG; Sigma-Aldrich). Es wurden immer zwei Parallelproben mit dem Primär- und Sekundärantikörper markiert. Eine dritte Parallelprobe diente als Negativkontrolle. Sie wurde nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, um die durch eine potenzielle unspezifische Bindung dieses Antikörpers verursachte Fluoreszenz zu ermitteln.

Die durchflusszytometrische Messung der Hsp70-fluoreszenzmarkierten Zellen wurde anfangs am Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik der Universität Rostock und gegen Ende des Projektes am Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), Abteilung Reproduktionsbiologie, in Dummerstorf durchgeführt. Bei den Durchflusszytometern handelte es sich um ein Coulter Epics Altra bzw. Coulter Epics XL-MLC (Beckman Coulter, Krefeld). In der Regel wurden von jeder Hämocyten-Probenn 10.000 Ereignisse registriert.

Die Auswertung der als Rohdaten (List-Mode-Files) gespeicherten Messwerte erfolgte im Institut für Angewandte Ökologie GmbH mit Hilfe des Programms „WinMDI 2.9“ (Trotter, 2000). Anhand von Punktwolkendiagrammen und Histogrammen ließ sich der Prozentsatz Hsp70-positiver Hämocyten sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) analysieren.

#### 4.5.2 Quantifizierung von Hsp70 mittels Elektrophorese und Western Blot

Zum semiquantitativen Nachweis des Stressproteins Hsp70 im Kiemengewebe der Miesmuschel nach thermischer Belastung wurde das Western Blot-Verfahren mit einer anschließenden densitometrischen Auswertung der immundetkierten Hsp70-Banden angewendet. Dieses Verfahren wird üblicherweise zur Bestimmung Hsp70 in Gewebematerialien verwendet (Lewis et al., 1999).

Zu Beginn wurden die Gewebeproben homogenisiert und die Proteine mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli [1970]) aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteinbanden nach dem Semidry-Blot-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Nitrocellulosemembran.

Zur Immunodetektion der auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Hsp70-Bande wurde eine sequentielle Inkubation mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität durchgeführt. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen mit einem Magermilch-Tween-TBS-Puffer erfolgte zunächst eine Inkubation mit einem Hsp70-spezifischen monoklonalen Primärantikörper (Maus IgG1 [BD Biosciences]). Daran schloss sich eine Inkubation mit einem mehrfach biotinylierten Anti-Maus-IgG-Antikörper (Ziege-anti-Maus [Sigma]) an. An das Biotin des sekundären Antikörpers banden sich im dritten Inkubationsschritt mehrere Moleküle eines Streptavidin-Myeloperoxidase-Konjugates, wodurch eine Signalverstärkung resultierte. Im abschließenden Schritt der Immunodetektion wurde der gebundenen Myeloperoxidase der Farbstoff DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid dargeboten. Durch das bei der Enzymreaktion entstandene braune Reaktionsprodukt wurden die Hsp70-Banden, an die der Hsp70-Antikörper gebunden hatte, sichtbar gemacht.

Das auf der Nitrocellulosemembran angefärbte Hsp70-Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und als Tif-Format gespeichert. Zur Quantifizierung der Hsp70-Banden wurde die Bildanalysesoftware ImageJ (NIH, USA) verwendet. Dabei wurde die Stärke der Banden in Flächenäquivalente umgewandelt, so dass ein Vergleich von Proben anhand von numerischen Werten möglich wurde.

Bei den ersten Anwendungen der Western Blot-Methode wurden Proben gleichen Proteingehalts in der SDS-PAGE eingesetzt, so dass ein semiquantitativer Vergleich des Hsp70-Gehaltes ermöglicht wurde. Um die Genauigkeit der Hsp70-Bestimmung zu verbessern erfolgte später eine gemeinsame Immunodetektion von Hsp70 und von  $\alpha$ -Tubulin (monoklonaler anti-  $\alpha$ -Tubulin-AK aus der Maus; Sigma-Aldrich). Da dieses Protein in annähernd konstanter Konzentration in den Zellen vorkommt (Housekeeping-Funktion), diente es zur Normierung der Hsp70-Werte im Verlauf der bildanalytischen Auswertung.

#### 4.6 Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test basiert auf der ursprünglich von Borenfreund und Puerner (1984) publizierten Methode. Für die hier erfolgte Anwendung an Hämocyten von *Mytilus edulis*

wurde eine für den Einsatz von Mikrotiterplatten [MTP] modifizierte Version der Methode verwendet (Coles et al., 1995; Grundy et al. 1996).

In die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde jeweils 200µl einer Hämocytensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) pipettiert und den Zellen 45min Zeit zur Adhärenz an den Boden der MTP gegeben. Dann wurde die Pufferlösung abgesaugt und stattdessen jeweils 200µl Neutralrotlösung hinzugefügt. Nach 3h Inkubation der MTP im Dunkeln auf einer Kühlplatte (10°C) wurde die Neutralrotlösung entfernt und die Hämocyten 5min in TBS-Ca-Puffer inkubiert. Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Zellen durch Zugabe von 200µl Eisessig-Ethanol pro Vertiefung lysiert und das in den Lysosomen verbliebene Neutralrot durch Schütteln freigesetzt. Abschließend wurde die Absorption mit einem Mikrotiterplattenfotometer (Spectra Thermo, Tecan, Crailsheim) bei 550nm quantifiziert. Von jeder Probe wurden vier Parallelansätze gemessen.

#### 4.7 Phagozytose-Aktivität

Zur Bestimmung der Phagozytose-Aktivität von Hämocyten wurden Neutralrot-gefärbte Hefezellen als Testpartikel verwendet. Ähnlich wie beim Neutralrot-Test wurde dadurch eine fotometrische Messung der Phagozytose-Aktivität möglich (Blaise et al., 2002; Coles et al., 1995; Harry & Pipe, 2004).

In die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde jeweils 50µl einer Hämocytensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) gegeben und 30min später 50µl einer NR-Hefe-Suspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml) zugefügt. Nach 1h Inkubation erfolgte die Zugabe von 100µl Bakers-Fomalin-Calzium-Lösung. Die Fixierung wurde nach 10min durch Absaugen der Flüssigkeit und 3-maliges vorsichtiges Spülen der adhärenierten Hämocyten beendet. Abschließend wurde der mit den Hefezellen aufgenommene Farbstoff durch Zugabe von 100µl Eisessig-Ethanol pro Vertiefung aus den Hämocyten freigesetzt und die Absorption von Neutralrot mit einem Mikrotiterplattenfotometer (Spectra Thermo, Tecan, Crailsheim) bei 550nm quantifiziert. Von jeder Probe wurden mindestens vier Parallelansätze gemessen.

#### 4.8 Metallothionein-Bestimmung

Zur Bestimmung des Metallothionein-Gehaltes [MT] in der Mitteldarmdrüse von *Mytilus edulis* wurde die spektrophotometrische Methode von Viarengo et al. (1997) angewandt. Bei diesem Verfahren wird mit Hilfe von Ethanol/Chloroform vorgereinigtes MT aus dem Mitteldarmdrüsen-Homogenat (30.000g-Fraktion) ausgefällt. Dabei wird das während der Homogenisation und MT-Fällung notwendige reduzierende Milieu durch die Anwesenheit von Mercaptoethanol gewährleistet. Der MT-Gehalt der Probe wird dann über die photometrische Erfassung der in den MT zahlreich gebundenen SH-Gruppen (Cystein-Gehalt 20-30%) in Anwesenheit von Ellman's Reagenz (DTNB) bestimmt.

Für die quantitative Berechnung der MT-Konzentration wurde eine Glutathion-Standardkurve als Referenz benutzt. Mit Hilfe von Umrechnungsfaktoren, die den molekularen Aufbau von Muschel-Metallothionein berücksichtigen, lässt sich dann aus dem mit der Standardkurve ermittelten Wert die MT-Konzentration der Probe in ng/g Feuchtwicht errechnen (UNEP/

RAMOGE, 1999). Die MT-Bestimmung erfolgte an Sammelproben von jeweils 10 Mitteldarmdrüsen. Im Jahr 1999 wurden jeweils drei Proben und in den folgenden Jahren jeweils neun Proben von einer Station gemessen.

#### 4.9 Lipidperoxidation

Die Messung der Lipidperoxidation in der Mitteldarmdrüse (MDD) der Miesmuschel wurde nach der Methode von Buege & Aust (1978) durchgeführt. Dabei wird Malondialdehyd [MDA], das als Degradationsprodukt beim oxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren entsteht, in einer Reaktion mit Thiobarbiturat bei einer Wellenlänge von 535nm photometrisch quantifiziert.

Einzelne MDD wurden 1:4 (G/V) in Phosphatpuffer (pH 7,2) mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Mixers in Eppendorf-Reaktionsgefäßen homogenisiert und anschließend 15min bei 10.000g und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Fa. Hereus) zentrifugiert. Zu 100µl Homogenatüberstand wurde 1ml TTH-Reagenz (15% Trichloressigsäure; 0,375% Thiobarbitursäure; 0,25N HCL) gegeben und der Ansatz 20min in siedendem Wasser erhitzt. Das dabei entstandene weiße Präzipitat wurde nach Abkühlen in einem Eisbad für 10min bei 10.000g abzentrifugiert. Abschließend erfolgte die Messung der Extinktion im Überstand mit einem Spektralphotometer (Cadas 100, Fa. Dr. Lange) bei einer Wellenlänge von 535nm. Aus dem Extinktionsmesswert und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon=1,56/\mu\text{mol}/\text{cm}$  wurde die Konzentration von Malondialdehyd bezogen auf das Feuchtgewicht errechnet.

#### 4.10 AChE-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7 [AChE]) wurde an Kiemengewebe durchgeführt (Boquene & Galgani, 1998). Die paarig angelegten Kiemen wurden freipräpariert, in Phosphatpuffer gespült und auf Filterpapier kurz abgetrocknet. Bis zur Messung der Enzymaktivität lagerten die Gewebeproben bei -70°C in einer Kühltruhe.

Zu Beginn der Enzymbestimmung wurde das Kiemengewebe mit vier Volumina 0,02M Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7), dem 0,1% Triton-X100 zugefügt war, versetzt. Dann wurden die Proben mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Mixers homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10.000g, 20min, 4°C). Die Messung der Enzymaktivität in den Homogenaten erfolgte in Mikrotiterplatten (MTP). Hierzu wurden in jede Kavität einer MTP 330µl Phosphatpuffer (ohne Triton-X100) und 20µl DTNB (Dithiobisnitrobenzoesäure in 0,1M Tris-Puffer, pH 8) vorgelegt und jeweils 20µl Gewebehomogenat zugegeben. Nach Schütteln und einer 5-minütigen Inkubation erfolgte abschließend die Zugabe von jeweils 10µl ACTC-Substrat (0,1M Acetylthiocholinjodid in *A. demin.*). Der Verlauf der Enzymreaktion wurde als Zunahme der Extinktion im Verlauf von 10min mit einem Mikrotiterplatten-Fotometer (Spectra Thermo, Fa. TECAN) bei 405nm gemessen. Aus der durchschnittlichen Extinktionszunahme pro Minute und dem Extinktionsquotienten für DTNB ( $\lambda_{412}=1,36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) wurde die AChE-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt berechnet.

#### 4.11 Histologische Untersuchungen

Für die histopathologische Beurteilung der Mitteldarmdrüse (MDD) und Gonade von *Mytilus edulis* wurde der Weichkörper 2 bis 3 Tage in Bouin'scher Lösung fixiert. Anschließend wurde die Probe in 70%-Ethanol überführt und darin bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Vor der Einbettung in Technovit-7100-Kunstharz (Heraeus Kulzer, Wehrheim) wurde das Gewebe stufenweise in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Darauf folgten Inkubationen in einer 100%-Ethanol-Monomerlösung (1:1, V:V) und einer 100%-Monomerlösung. Nach Überführung der Gewebestücke in Einbettformen aus Kunststoff erfolgte die Einbettung in frischer Monomerlösung, der ein Katalysator zum Start der Polymerisationsreaktion zugefügt worden war. Mit einem motorgetriebenen Mikrotom (Microm HM-360, Walldorf) wurden von den Gewebestücken 3µm dicke Schnitte angefertigt. Als Standardfärbung wurde eine Färbung mit Hämalaun-Eosin und eine Färbung mit Toluidinblau durchgeführt (Romeis, 1989).

## 5 Wirkung thermischer Belastung auf marine Invertebraten

### 5.1 Biologische Wirkungen von thermischem Stress

In marinen Ökosystemen zählt die Temperatur zu den wichtigsten abiotischen Faktoren. Sie hat einen wesentlichen Einfluss auf die räumliche Verteilung der Organismen und deren physiologischen Zustand. Je nach Art reagieren Organismen mehr oder weniger tolerant auf Schwankungen der Temperatur und anderer Umweltbedingungen (z.B. Salinität, Sauerstoffgehalt) in ihrem Lebensraum.

Bei der Erforschung der Gründe für die unterschiedliche Toleranz von Organismen auf Umweltstress, richtet sich das Augenmerk vieler Forscher auf die Stress- bzw. Hitzeschockproteine. Wie bereits allgemein an früherer Stelle (3.2.1) ausgeführt, haben Vertreter dieser Proteinfamilien eine zentrale Funktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase indem sie die Zelle vor den Wirkungen von proteotoxischem Stress schützen.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen von ökophysiologischen Feldstudien die Expression von Stressproteinen bei Muscheln besonders intensiv untersucht, um die Gründe für eine unterschiedliche Verbreitung der Tiere, z.B. in der Küstenzone, auf der molekularen und zellulären Ebene zu erforschen (Hofman & Somero, 1995; Helmuth & Hofman, 2001; Hofman, 2005). Dabei ist, im Vergleich zu anderen marinen Invertebraten, die Modulation der Hsp-Expression durch Temperaturveränderungen bei den weit verbreiteten Arten der Gattung *Mytilus* besonders intensiv untersucht worden (Buckley et al., 2001; Dahlhoff, 2004; Helmuth & Hofmann, 2001; Roberts et al., 1997).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Reaktion der Hsp-Expression auf die Umgebungstemperatur grundsätzlich eine große Plastizität und Komplexität aufweist. Muscheln aus dem Tidenbereich einer Felsenküste sind, je nachdem welchen Tiefenbereich sie besiedeln, regelmäßig unterschiedlich starken Temperaturveränderungen ausgesetzt. Diese Umweltbedingungen auf der Mikrohabitat-Ebene spiegeln sich auch in der Expression von Stressproteinen wieder (Halpin et al., 2004; Helmuth & Hofman, 1995; Hofman, 2005).

Die Reaktion auf tägliche Temperaturschwankungen wird zusätzlich durch die jahreszeitlichen Temperaturänderungen moduliert. Besonders im Sommer kann es beispielsweise bei im Tidenbereich lebenden *Mytilus trossulus* bereits unter normalen Umweltbedingungen zu einer Schädigung von Proteinen und einem starken Anstieg der Produktion von Stressproteinen kommen (Hofman & Somero, 1995). Dabei kann die Denaturierung von Proteinen so stark sein, dass sie nicht mehr von Hitzeschockproteinen „gerettet“ werden können, sondern zum Abbau in den Lysosomen aussortiert werden.

Einen starken Einfluss der Saisonalität auf die Expression von Stressproteinen wurde auch von Minier et al. (2000) bei einer monatlichen Beprobung in den Kiemen und der Mitteldarmdrüse von *M. galloprovincialis* beobachtet.

Auch unter natürlichen Umweltbedingungen wird für eine thermisch induzierte Produktion von Stressproteinen ein zusätzlicher zellulärer Energiebedarf notwendig. Der Energiebedarf für die Reparatur geschädigter Proteine und der Aufrechterhaltung einer zellschützenden Konzentration von Stressproteinen verbraucht Energie, die anderfalls für Wachstum und Reproduktion verwendet werden könnte. Möglicherweise trägt dieser Sachverhalt auch dazu bei, die Verbreitung eines Organismus im Lebensraum zu begrenzen (Hofman & Somero, 1995; Hofman, 2005).

Insgesamt betrachtet bleibt festzuhalten, dass die Toleranz eines Organismus gegenüber Temperaturstress eng mit der Expression von zellulären Stressproteinen korreliert ist. (Chapple et al., 1998; Hofman & Somero, 1995; Piano et al., 2002).

Die Kinetik der thermisch induzierten Hsp70-Expression verläuft sehr variabel. Sie ist wesentlich von der Höhe und Dauer des Temperaturstress sowie der anschließenden Erholungsphase abhängig. Letzendlich bestimmt die zuvor erworbene Thermotoleranz wie die Stressreaktion eines Organismus auf Temperaturstress hinsichtlich Stärke und Dauer verläuft. Insofern unterliegt die Stressreaktion einem starken saisonalen Einfluss (Chapple et al., 1998; Encomio & Chu, 2005; Hamer et al., 2004; Rajagopal et al., 2005).

Verschiedentlich wurden die Stressproteine von Muscheln auch als Biomarker für einen biologischen Schadstoffstress untersucht (Hamer et al., 2004; Lanning et al., 2006; Piano et al., 2002; Porte, 2005; Snyder et al., 2001; Werner & Hinton, 1999). Tedegren et al. (1999) fanden, dass die Kinetik der Reaktion von *Mytilus edulis* auf Cadmium-Stress von der Temperatur beeinflusst wird.

Die Befunde zur Expression von Hsp70 bei Muscheln wurden methodisch zumeist anhand von Immunoblots gewonnen. Dabei zeigte sich das die hauptsächlichen Hsp70-Isoformen in Abhängigkeit von der Saison unterschiedlich auf eine thermische Belastung reagieren (Chapple et al., 1998; Hamer et al., 2004; Piano et al., 2002).

Grundsätzlich führt ein Temperaturanstieg - insbesondere bei wechselwarmen Organismen - zu einer Erhöhung der Stoffwechselaktivität. Damit verbunden tritt auch eine Steigerung der Atmungsaktivität auf, die zugleich die Gefahr des Auftretens von oxidativem Stress beinhaltet. Oxidativer Stress kann zu einer direkten Schädigung der DNA und von Zellmembranen führen. Mit dem Einsatz des Comet-Assays sowie der Messung der Lipidperoxidation und des Metallothionein-Gehaltes sollten diese potenzielle genotoxische Schäden bzw. Zellmembranschäden infolge von Hitzestress erfasst werden. Die histopathologische Untersuchung von Mitteldarmdrüse und Gonade der Miesmuschel ermöglichte eine Bewertung thermisch induzierter Veränderungen auf Organniveau.

## 5.2 Versuchsanlage zur thermischen Exposition mariner Invertebraten

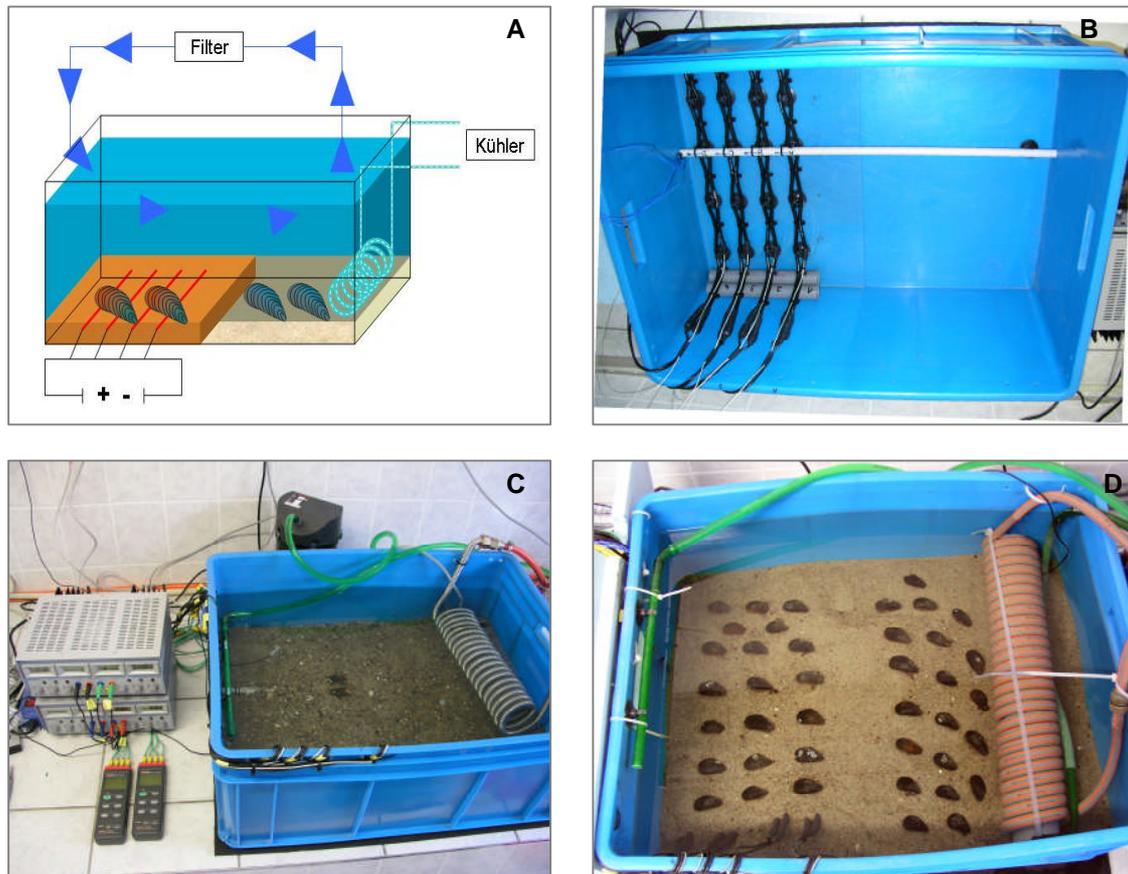
Die Versuchsanlage zu den Wirkungen von thermischen Stress auf das Migrationsverhalten des Schlickkrebse *Corophium volutator* und des Borstenwurms *Marenzelleria neglecta* (5.4) sowie auf Biomarker-Reaktionen der Miesmuschel *Mytilus edulis* (5.5) wurde so konzipiert, das sie im Wesentlichen die Temperaturexposition, wie sie potenziell im Freiland oberhalb eines im Meeresboden befindlichen Seekabels vorliegt, widerspiegelte. Dies bedeutete, dass die exponierten Tiere nur dem erwärmtem Bodensediment ausgesetzt sein durften, während die Temperatur des darüber befindlichen Hälterungswassers möglichst konstant bleiben sollte.

Abbildung 27 zeigt ein Schema und Fotos der Versuchsanlage für die thermische Exposition von Miesmuscheln. Auf ungefähr einem Drittel der Bodenfläche waren Heizkabel angebracht, deren Leistung sich mit einer Stromquelle individuell regeln ließ. Die Temperatur in unmittelbarer Nähe eines Heizkabels wurde durch Messfühler registriert. An einer Seite des Beckens befand sich eine Kühlschlange, durch die permanent eine Kühlflüssigkeit strömte. Zur Zirkulation, Belüftung und Filterung des Wassers diente ein Aquarienfilter, der in einer gekühlten Wanne stand, um eine Erwärmung des Hälterungswassers zu vermeiden. Das Wasser wurde auf der Seite der Kühlschlange angesogen und auf der gegenüberliegenden Seite über ein Rohr mit mehreren Löchern ausgestoßen.

In der für die Versuche mit Miesmuscheln benutzten Versuchsanlage bestand das Bodensediment aus gewaschenem Sand, der sich, wie eine Korngrößenanalyse ergab, aus 10% Fein-, 70% Mittel- und 20% Grobsand zusammensetzte. Durch das Fehlen von organischer Substanz konnte es zu keiner durch mikrobielle Tätigkeit verursachten Sauerstoffzehrung kommen. Außerdem waren für eine längere Nutzung der Versuchsanlage lediglich Wasserwechsel notwendig.

Die mit diesem Versuchsbecken erfüllten Anforderungen, den thermischen Stress nur über das Sediment erfolgen zu lassen, ermöglichte es auch, die Kontrolltiere im selben Becken auf einer benachbarten Bodenfläche zu halten. So war sichergestellt, dass sich die Versuchsbedingungen nur hinsichtlich des Stressfaktors „Temperatur“ unterschieden, während die sonstigen Hälterungsbedingungen für beide Versuchsgruppen gleich waren. Auf der „Expositionsfläche“ und der Kontrollfläche ließen sich jeweils maximal ungefähr 24 Tiere (4-5,5cm Schalenlänge) exponieren. Während eines Versuches wurde die Temperatur an der Oberfläche des Sediments mit einem an der Spitze eines feinen Drahtes befindlichen Temperaturfühlers (Fa. Conrad) in regelmäßigen Abständen gemessen.

Bei den im folgenden Abschnitt zunächst beschriebenen Versuchen zum Migrationsverhalten des Schlickkrebse *Corophium volutator* und des Borstenwurms *Marenzelleria neglecta* unter den Bedingungen von thermischem Stress wurde eine modifizierte Variante der beschriebenen Versuchsanlage für die Exposition von Miesmuscheln verwendet. Die Einzelheiten sind dort im Text beschrieben.



**Abb. 27:** A: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage.  
B: Anordnung der Heizkabel zur Sedimenterwärmung. Am hellen Kunststoffstab sind  
Temperaturmessfühler angebracht.  
C: Versuchsbecken mit Netzgeräten und Temperaturmessgeräten.  
D: Versuchsbecken mit Muscheln auf der Expositionsfläche (links) und Kontrollfläche.

## **5.3 Biomarker-Untersuchung an der Miesmuschel *Mytilus edulis* nach Exposition auf erwärmtem Sediment – Ergebnisse und Diskussion**

### **5.3.1 Zur Konzeption und Methodik der Temperatur-Versuche**

Im Rahmen dieses Teilprojektes wurden Vorversuche durchgeführt, in denen Miesmuscheln einem starken Hitzestress ausgesetzt wurden, um die Reaktion der Biomarker zu testen. Dabei wurden die Tiere entweder für 24h in erwärmtem Wasser gehältert oder auf deutlich erwärmtem Sediment exponiert. Da die Miesmuschel unter realen Feldbedingungen niemals diesem starkem Temperaturstress ausgesetzt sein würde, lag der Schwerpunkt der Arbeit in der Untersuchung der Biomarker-Reaktionen bei einer Exposition der Tiere auf einer schwach erwärmten Sedimentfläche. Dass allenfalls mit einer sehr geringen Erwärmung des Oberflächensediments bei einem in Betrieb befindlichen Seekabel zu rechnen ist, hatten die begleitenden Feldmessungen im Windpark Nystedt gezeigt. Da die Laborversuche an der epibenthischen Miesmuschel erfolgten musste in der Hälterungsanlage jedoch eine messbare Erhöhung der Temperatur an der Sedimentoberfläche im Vergleich zum Hälterungswasser vorliegen. Die gewählte Temperaturdifferenz betrug ca. 2 bis 3K. In diesem Bereich wurde eine homogene Erwärmung der Sedimentoberfläche gemessen. Im Sommer konnte es durch die Sedimenterwärmung auch zu einer geringen Erwärmung (ca. 1K) des über dem Sediment zirkulierenden und gekühlten Hälterungswassers kommen. Da sich aber die exponierten Tiere und die Kontrollgruppe im selben Wasser befanden, wurde davon ausgegangen, dass Unterschiede in der Reaktion der Biomarker auf der Exposition auf erwärmtem Sediment beruhen.

Die Dauer mehrtägiger Hälterungsversuche wurde auf zehn Tage begrenzt. Bei einer längeren Versuchsdauer hätte die Gefahr bestanden, dass auch die Kontrolltiere einem merklichen Hälterungsstress ausgesetzt gewesen wären. Im Verlauf des Jahres war auch eine unterschiedliche Anfälligkeit der Miesmuscheln gegenüber den Hälterungsbedingungen zu beobachten. So mussten im Hochsommer (August) mehrfach Versuche abgebrochen werden, da es zu größeren Verlusten bei exponierten Tieren und auch der Kontrollgruppe kam. Dass Miesmuscheln nach dem Ende der Laichzeit eine Phase der konditionellen Schwäche durchlaufen ist aus saisonalen Untersuchungen des IfAÖ an Miesmuscheln aus dem Seegebiet bei Warnemünde bekannt (Gercken & Sordyl, 1999 und 2003).

Während der gesamten Zeit der Zwischenhälterung und Versuchsdauer wurden die Tiere nicht gefüttert.

### 5.3.2 Reaktion des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten

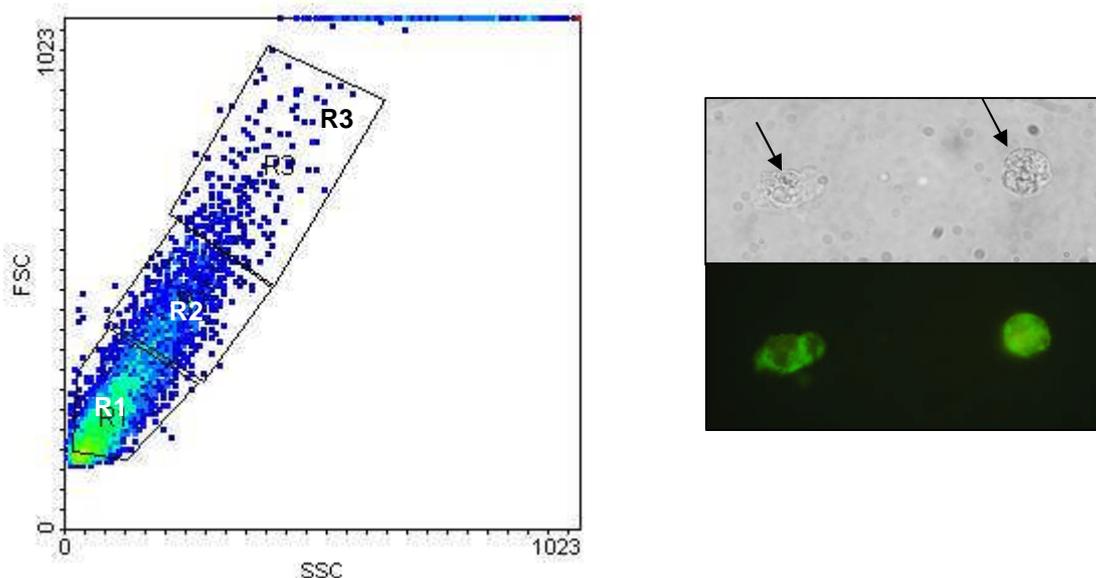
Bei der Untersuchung der Wirkungen von thermischer Belastung auf Miesmuscheln kam dem Biomarker „Hitzeschockprotein Hsp70“ eine besondere Bedeutung zu. Die Expression von Hsp70 nach einer Exposition auf erwärmtem Sediment wurde in den Hämocyten (Immunzellen) und im Kiemengewebe der Muschel gemessen. Für die Quantifizierung in Hämocyten wurden die immunfluoreszenzmarkierten Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Der Nachweis in Kiemengewebe erfolgte mittels Immunoblot (Western Blot).

#### 5.3.2.1 Streulichtcharakterisierung der untersuchten Hämocyten

Neben der Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen bietet die Durchflusszytometrie auch die Möglichkeit, verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften zu unterscheiden. Dabei repräsentiert das Vorwärtsstreulicht (FSC, „forward scatter“) die Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC, „side scatter“) die intrazelluläre Granularität und Membranbeschaffenheit einer Zelle. Zu Beginn der Analyse von durchflusszytometrischen Daten wird üblicherweise geprüft, ob sich in der Probe anhand der Streulichteigenschaften verschiedene Zellpopulationen differenzieren lassen.

Die Hämocyten-Proben von *Mytilus edulis* wiesen typischerweise das in Abb. 28 dargestellte Streulichtbild auf. Wie es zeigt, waren die Proben bezüglich Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen sehr heterogen zusammengesetzt. Distinkte Hämocyten-Subpopulationen ließen sich aber nicht eindeutig abgrenzen. Die Darstellung der Zellhäufigkeitsdichte (density-plot) verdeutlicht, dass die Proben einen großen Anteil kleiner Zellen mit gering strukturiertem Zellkörper besaßen (Abb. 28; Region 1; grün). Daneben gab es einen weniger homogenen Anteil von Hämocyten, mit weiterem Größenspektrum und stärker strukturiertem Zellplasma (Region 2). Ereignisse in der Region 3 wurden nicht in die Analyse einbezogen, da es sich bei ihnen u.a. mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellaggregate handeln dürfte. Im Gegensatz zu Säugerzellen besitzen *Mytilus*-Hämocyten eine starke Tendenz zur Aggregation nach der Entnahme aus der Muschel.

Da die mit dem Durchflusszytometer untersuchten Sammelproben immer Hämocyten von unterschiedlichen Individuen enthielten, waren auch die Streulichtbilder einer gewissen Variabilität unterworfen. Grundsätzlich war aber immer ein größerer Anteil kleinerer und ein geringerer Anteil größerer Hämocyten mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften vertreten. Die Befeldung mit 50Hz-Magnetfeldern, seien sie kurz (1h) oder lang (16h) erfolgt, hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung der Hämocyten im Streulichtdiagramm.



**Abb. 28:** links: repräsentativer Density-Plot von *Mytilus*-Hämocyten. Anhand der inhomogenen Verteilung lassen sich Zellen mit kleinem FSC/SSC (Region 1) und Zellen mit größerem FSC/SSC (Region 2) unterscheiden. Die diffuse Verteilung in Region 3 könnte z.T. auf eine Aggregatbildung zurückzuführen sein.  
rechts: Mikroskopisches Bild von Hämocyten im Durchlicht (oben). Nach Fluoreszenz-anregung weisen die mit dem anti-Hsp70-Antikörper markierten Zellen ein grünes Fluoreszenzlicht auf.

Obwohl das Streulichtdiagramm keine distinkten Hämocyten-Subpopulationen ausweist, spiegelt es doch die bekannte Heterogenität der Hämocyten (Immunocyten) von Miesmuscheln wieder. Bei Miesmuscheln (*Mytilus spec.*) lassen sich aufgrund morphologischer Merkmale die kleineren, abgerundeten „Hyalinocyten“ von den größeren „Granulocyten“ mit stärker strukturiertem Zellplasma unterscheiden (Carballal et al., 1997; Renwantz, 1990). Aufgrund dieser Eigenschaften ist zu erwarten, dass es sich bei den Zellen mit kleinem FSC/SSC (Region 1) vorwiegend um Hyalinocyten und bei Hämocyten mit größerem FSC/SSC um Granulocyten handeln dürfte.

Ähnliche Streulichtbilder wurden auch bei der durchflusszytometrischen Analyse von Hämocyten anderer Mollusken gefunden (Cossarizza et al., 2005; Fournier et al., 2002).

Im vorliegenden Bericht werden nur Befunde präsentiert, die sich auf die Analyse der Hsp70-Expression bei der gesamten Hämocyten-Population beziehen. Durch Setzen eines „Gates“ wurden Ereignisse mit sehr kleinem und großem FSC/SSC (Zelldebris bzw. Aggregate) von der Analyse ausgeschlossen. Bei stichprobenhaften Auswertungen an Hämocyten aus der „Hyalinocyten“- und „Granulocyten“-Region wurden Unterschiede bezüglich der Häufigkeit Hsp70-positiver Hämocyten und deren Fluoreszenzintensität festgestellt. Grundsätzlich ergab der Vergleich von Kontrollmuscheln und exponierten Muscheln aber denselben Befund wie bei der Analyse der gesamten Hämocyten-Population.

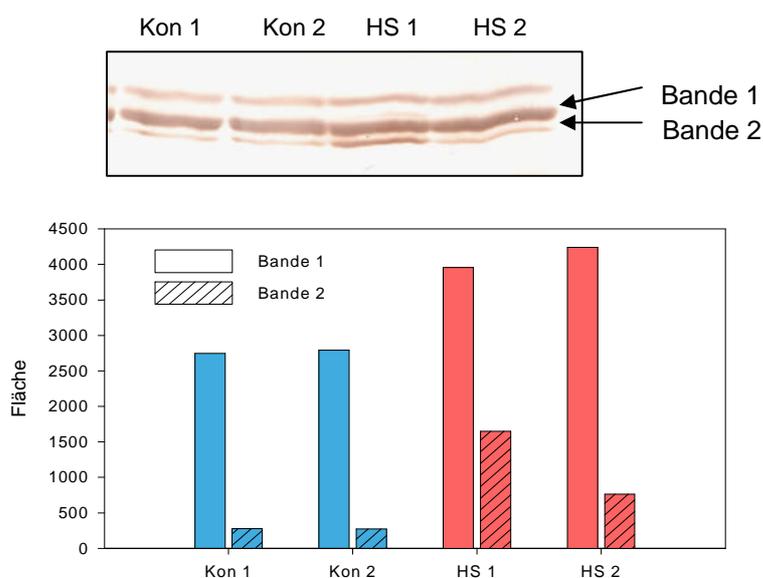
### 5.3.2.2 Nachweis von Hsp70 in Hämocyten mittels Immunoblot

Im Rahmen der Vorversuche zur Expression des Stressproteins Hsp70 nach starker Temperaturerhöhung wurden die normalerweise nur mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysierten Hämocyten auch mit dem Western Blot Verfahren untersucht.

Die Muscheln wurden für 24h in einem Becken gehältert, dessen Wasser eine 10°C höhere Wassertemperatur aufwies als das Kontrollbecken. Am Ende der Exposition wurden Hämolympfproben entnommen und jeweils die Hämocyten von fünf Tieren zu einer Sammelprobe vereinigt. Jeweils zwei Proben von HS- und Kontrolltieren wurden auf den gleichen Proteingehalt eingestellt und in der SDS-PAGE aufgetrennt und Hsp70 im Immunoblot als markierte Banden nachgewiesen.

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Hsp70-Anfärbung im Immunoblot und die daran erfolgte bildanalytische Auswertung. Die Balken in der Grafik geben die Intensität der angefärbten Banden als Flächenäquivalente wieder. Die stärkere Expression von Hsp70 in den Hämocyten der Hitzestress-behandelten Muscheln ist deutlich zu erkennen.

Es fällt auf, dass der monoklonale Hsp70-Antikörper mehrere Proteine im Bereich von 70kDa markiert. Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen anderer Untersucher, die - wie eingangs erwähnt - ebenfalls mehrere Hsp70-Banden im Immunoblot gefunden hatten. Bei der starken Bande 1 in Abbildung 29 handelt es sich um das konstitutiv exprimierte Hsp70 während die schwächere Bande 2 das induzierte Hsp70 darstellt. Die Grafik zeigt, dass beide Hsp70-Isoformen als Reaktion auf Hitzestress exprimiert wurden.



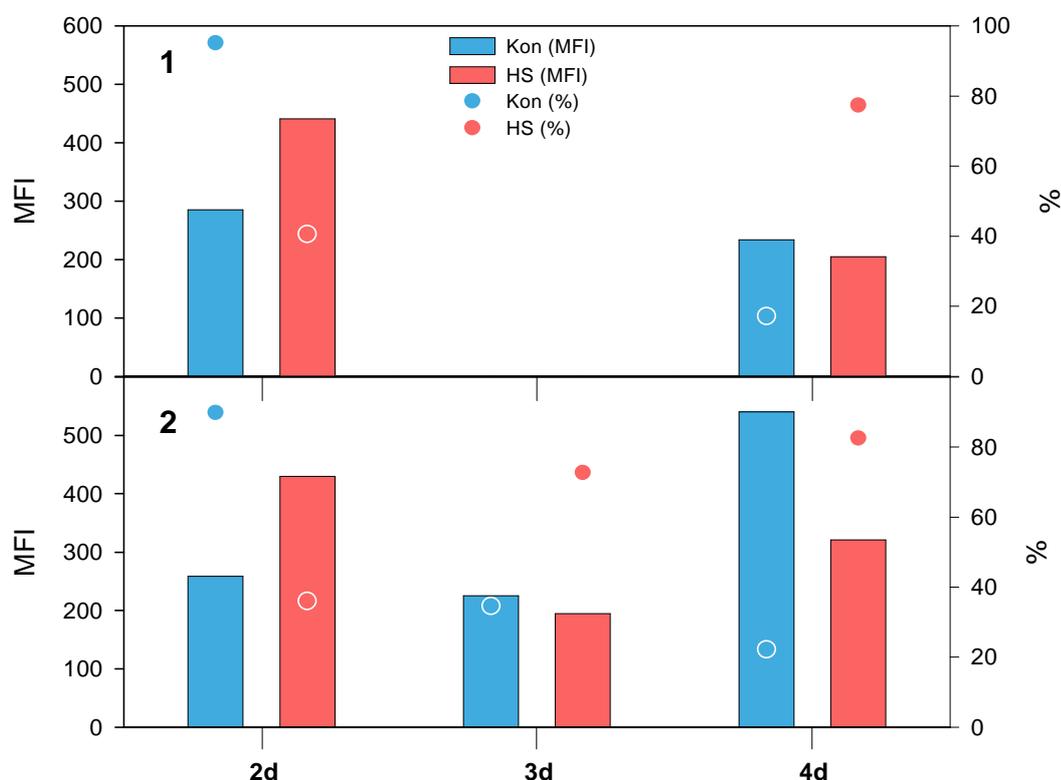
**Abb. 29** Nachweis der Hsp70-Expression Hämocyten mittels Immunoblot (oben) und Grafik erstellt nach bildanalytischer Auswertung des Immunoblots (unten).

Mit der Methode der Durchflusszytometrie erfolgte keine Differenzierung, da der verwendete Hsp70-Antikörper alle Hsp70-Isoformen gleichermaßen fluoreszenzmarkierte. Andererseits ermöglichte die Durchflusszytometrie, im Vergleich zur semiquantitativen Auswertung von Immunoblots, eine schnellere und genauere Quantifizierung der Gesamt-Hsp70-Expression.

### 5.3.2.3 Hsp70-Expression in Hämocyten bei starker thermischer Belastung

Bei den ersten Versuchen zur Analyse der Hsp70-Expression mittels Durchflusszytometrie wurde *Mytilus edulis* einer starken Erhöhung der Sedimentbodentemperatur von ca. 10K ausgesetzt.

Abbildung 30 zeigt das Ergebnis von zwei 4-tägigen Expositionen in grafischer Form. Am zweiten Tag wiesen die Hsp70-positiven Hämocyten der thermisch gestressten Muscheln eine stärkere Hsp70-Expression auf als die Hämocyten der Kontrollgruppe. Andererseits war der Prozentsatz Hsp70-positiver Hämocyten geringer als bei der Kontrolle. Im Verlauf der Hälterung nahm der Anteil Hsp70-positiver Hämocyten bei Temperaturstress zu und bei ungestressten Tieren ab. Am vierten Tag wurde bei dem einem Versuch (2) eine deutlich geringere Hsp70-Fluoreszenz nach Hitzestress im Vergleich zur Kontrolle gemessen, während beim anderen Versuch kaum ein Unterschied auftrat.



**Abb. 30:** Expression des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten von *Mytilus edulis* nach mehrtägiger Exposition auf stark erwärmtem Sediment ( $\Delta T=10K$ ) und bei der Kontrollgruppe. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen. Die Balken stellen die Stärke der Hsp70-Expression (mittlere Fluoreszenzintensität [MFI]) dar und die Kreise den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen).

#### 5.3.2.4 *Hsp70-Expression in Hämocyten bei schwacher thermischer Belastung*

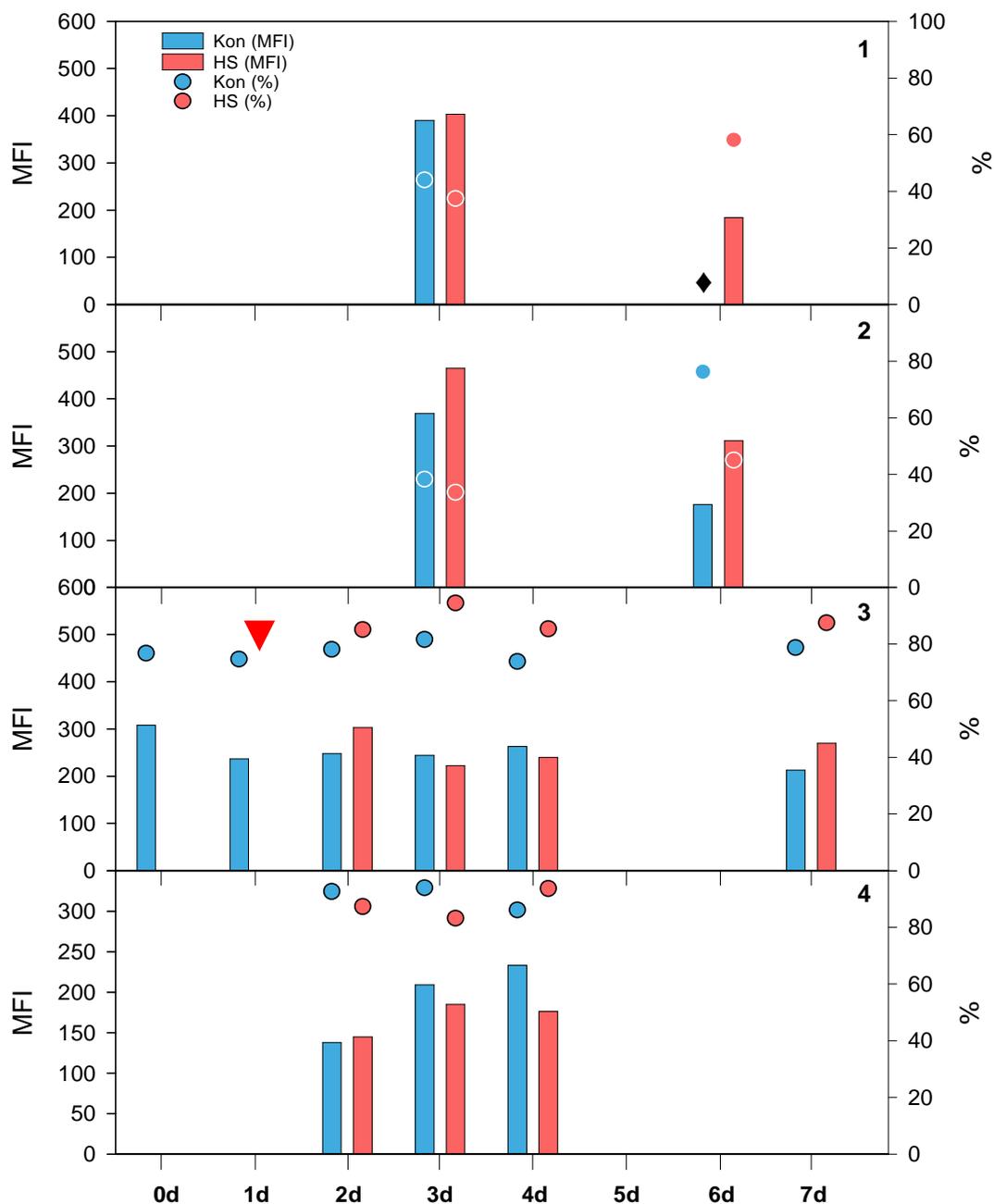
Wie bereits erwähnt wurde die Mehrzahl der Versuche zur Reaktion von Stressprotein Hsp70 bei einer schwachen thermischen Belastung durchgeführt. Diese Hälterungen dauerten dann in der Regel mehrere Tage.

In der Abbildung 31 ist das Ergebnis der Bestimmung von Hsp70 in Hämocyten bei vier Versuchen grafisch dargestellt. Es wird deutlich, dass der schwache thermische Stress die Hsp70-Stressreaktion der Hämocyten im Vergleich zu den Kontrollen unterschiedlich stark moduliert. Sowohl in Bezug auf den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen als auch deren Intensität der Hsp70-Expression (MFI) wurden nach unterschiedlicher Expositionsdauer aber meistens nur relativ geringe Unterschiede ermittelt.

Bei den ersten beiden Versuchen (1, 2) wurde eine geringe Zunahme des Anteils Hsp70-positiver Zellen vom 3. zum 6. Tag der Hälterung bei den thermisch exponierten Muscheln gemessen. Gleichzeitig nahm der mittlere Gehalt an Hsp70 (MFI) in diesen Zellen ab. Die Kontrollen des 2. Versuchs zeigten ein grundsätzlich ähnliches Verhalten.

Am Beispiel des 3. Versuchs ist die Hsp70-Expression bei den Kontrolltieren im Verlauf der 7-tägigen Hälterung anhand mehrerer Messungen zu erkennen. Vom Start (0d) bis zum Ende des Versuchs wurde Hsp70 immer bei 70-80% der Hämocyten detektiert. Die Intensität der Expression nahm nach einem Tag Hälterung etwas ab, um dann auf einem einheitlichen Niveau zu verbleiben. Bei diesem Versuch wurde das Sediment erst ab dem zweiten Versuchstag (1d) erwärmt, so dass die ermittelte Zunahme der Hsp70-Expression bei den exponierten Tieren (2d) offensichtlich auf diesen Stressor zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf der Hälterung (3d, 4d) wurde keine verstärkte Hsp70-Expression im Vergleich zu Kontrollproben beobachtet. Lediglich der Anteil Hsp70-positiver Hämocyten lag etwas über dem der Kontrollen. Am letzten Versuchstag (= 6 Tage Temperaturstress) wies die Probe der thermisch exponierten Muschel bezüglich Anteil und MFI-Intensität etwas höhere Werte als die Kontrolle auf.

Im 4. Versuch wurde ein Anstieg der Hsp70-Expression bei Kontrollen und exponierten Tieren im Verlauf der 4-tägigen Hälterung gemessen. Der Anstieg fiel aber bei der Kontrolle stärker aus als bei thermisch belasteten Muscheln. Bei allen Proben lag der Anteil Hsp70-positiver Zellen über 80%.

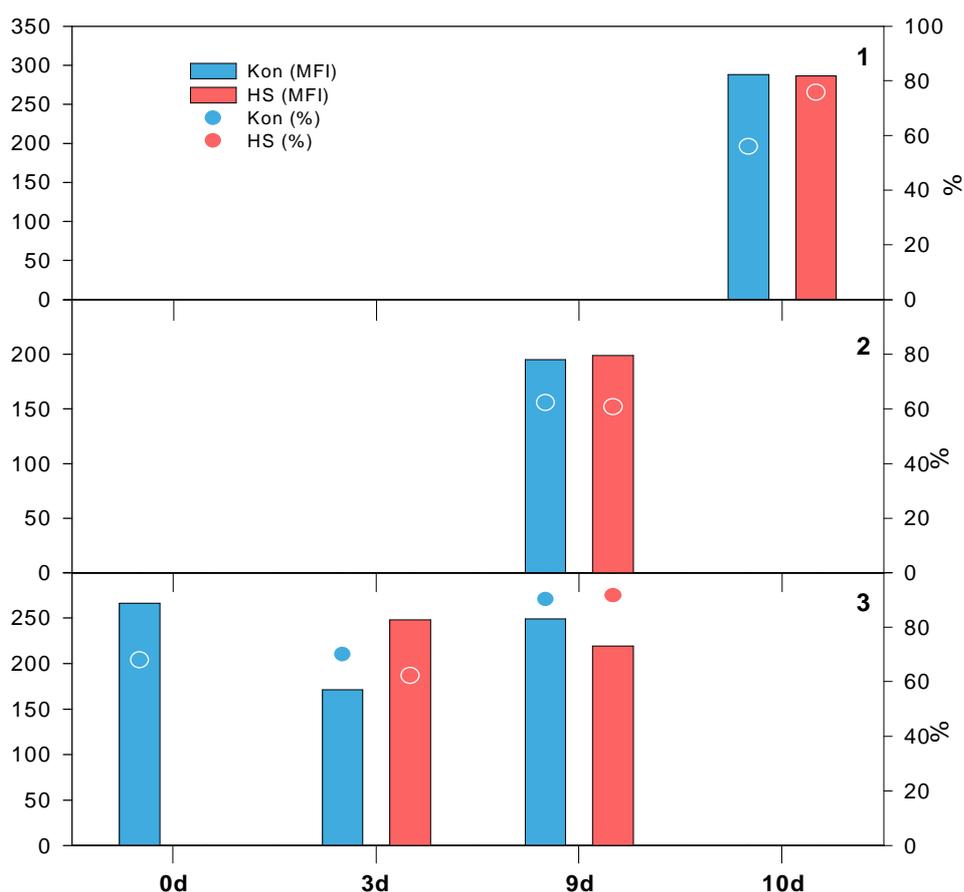


**Abb. 31:** Expression des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten von *Mytilus edulis* nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T = 2-3K$ ) und bei der Kontrollgruppe. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen. Die Balken stellen die Stärke der Hsp70-Expression (mittlere Fluoreszenzintensität [MFI]) dar und die Kreise den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen.

◆ = Wert fehlt (Versuch 1), ▼ = Beginn der Sedimentenerwärmung (Versuch 3)

Abbildung 32 zeigt das Resultat von drei noch länger durchgeführten Expositionen bei geringer thermischer Belastung. In Versuch 1 wurde am Versuchsende, nach 10 Tagen, bei den Hämocyten der Kontrolle und der exponierten Muscheln die gleiche Hsp70-Expression ermittelt. Allerdings besaßen exponierte Tiere mehr Hsp70-positive Zellen als die Kontrolltiere. Beim zweiten Versuch trat nach neun Tagen kein Unterschied zwischen Kontrolle und exponierten Tieren auf.

Beim dritten Versuchsansatz wurde die Expression des Stressproteins zu Beginn und am 3. und 9. Versuchstag bestimmt. Am 3. Versuchstag wiesen die Kontrolltiere den gleichen Prozentsatz Hsp70-positiver Hämocyten auf wie am Versuchsbeginn. Die Stärke der Expression hatte aber abgenommen. Bis zum 9. Tag der Hälterung nahm der Hsp70-Gehalt der Hämocyten bei fast allen Zellen wieder zu. Bei den thermisch belasteten Muscheln wurde am 3. Tag im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Hsp70-Expression beobachtet. Am Versuchsende wiesen nahezu alle Hämocyten der HS-behandelten Muscheln Hsp70 auf. Die Stärke der Expression lag aber etwas unter derjenigen der Kontrollprobe.

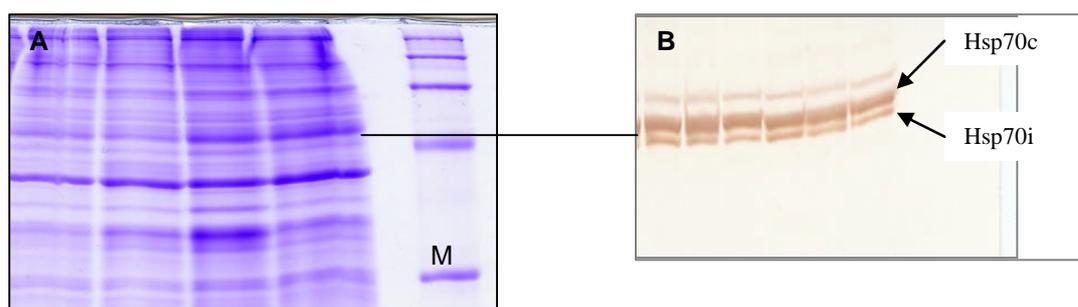


**Abb. 32:** Expression des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten von *Mytilus edulis* nach einer Exposition von maximal 10 Tagen auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ) und bei der Kontrollgruppe. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. Die Balken stellen die Stärke der Hsp70-Expression (mittlere Fluoreszenzintensität [MFI]) dar und die Kreise den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen).

### 5.3.2.5 Hsp70-Expression im Kiemengewebe

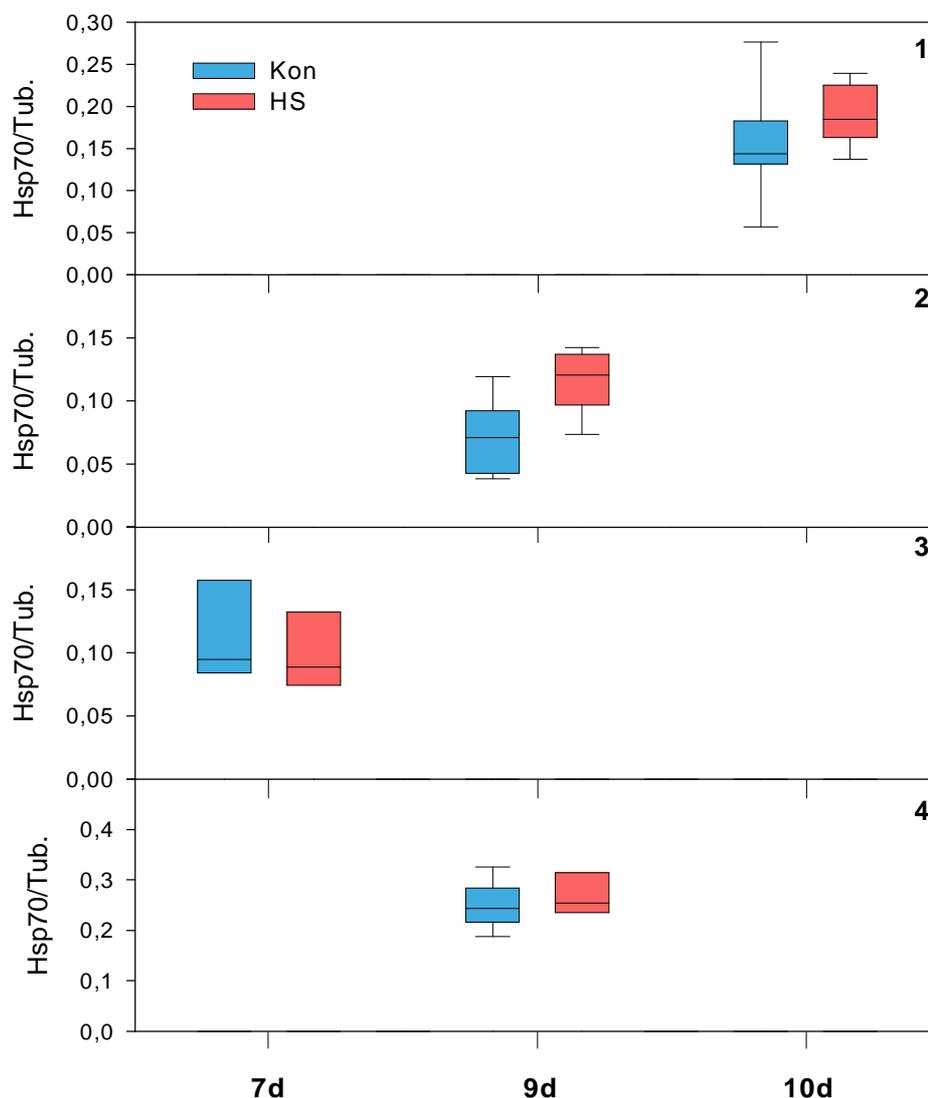
Wie bereits ausgeführt gibt es eine Reihe von Publikationen, welche die Induktion von Hsp70 als Reaktion auf einen Temperaturstress bei Muscheln der Gattung *Mytilus* beschreiben. Am häufigsten wurde dabei das Kiemengewebe der Muscheln mittels Western Blot (Immunoblot) untersucht. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Studie angewendet.

Der Nachweis von Hsp70 im Immunoblot ergab typischerweise das in Abbildung 33 dargestellte Bild. Der Hsp70-spezifische monoklonale Antikörper markierte zwei Banden im Bereich von 70kDa. Es handelt sich dabei um Isoformen von Hsp70, die sich geringfügig in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Bei dem Protein mit einem Molekulargewicht von 72kDa handelt es sich um die konstitutiv vorhandene Isoform Hsp70c, während das im Allgemeinen schwächer ausgeprägte 70kDa-Protein die induzierte Isoform (Hsp70i) repräsentiert (Chapple et al., 1998). Die Auftrennung der Hsp70-Isoformen im Immunoblot bietet prinzipiell die Möglichkeit, beide Banden separat mittels Bildanalyse semiquantitativ zu erfassen. Häufig erschienen die Banden in der Bildanalyse aber nicht sauber voneinander getrennt, so dass auf eine separate Auswertung verzichtet wurde und stattdessen beide Banden als Gesamt-Hsp70-Expression bestimmt wurden.



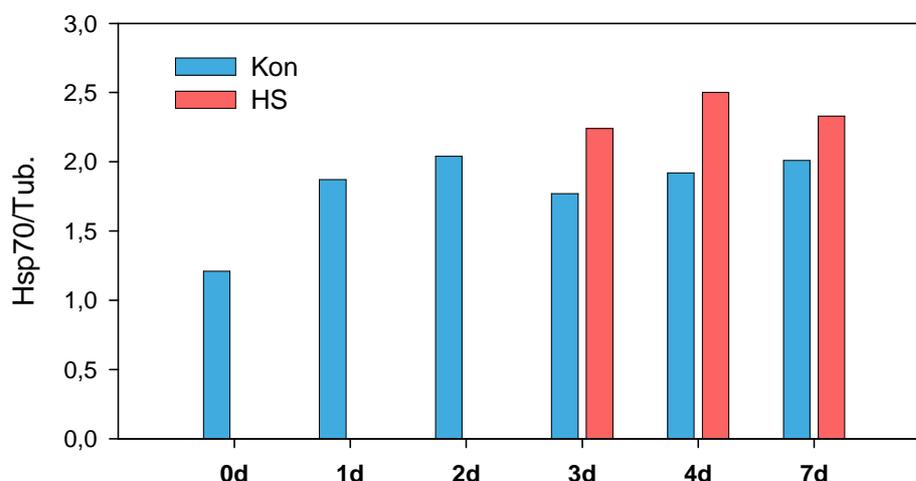
**Abb. 33:** Elektrophorese von Kiemengewebe und Nachweis von Hsp70 im Immunoblot.  
A: Elektrophoretische Auftrennung von Kiemenhomogenaten (Coomassie-Färbung). In der rechten Spalte sind Molekulargewichtsmarker aufgetrennt (M).  
B: Nachweis von konstitutivem Hsp70c und induziertem Hsp70i im Immunoblot.

In der folgenden Abbildung 34 ist die Hsp70-Expression in der Kieme nach einer mehrtägigen Hälterung von *Mytilus edulis* auf schwach erwärmtem Boden im Vergleich mit Kontrolltieren gezeigt. In Versuch 1 und 2 wurde ein tendenziell erhöhter Hsp70-Gehalt am Ende der 10- bzw. 9-tägigen Exposition ermittelt. Beim 3. und 4. Versuch wiesen Kontrolle und HS-Muscheln eine vergleichbare Konzentration des Stressproteins auf.



**Abb. 34:** Hsp70-Gehalt in Kiemengewebe nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T = 2-3K$ ). Die Box-Plots repräsentieren die Werte von jeweils 7 bis 10 Muscheln.

In einem anderen Versuch wurden die Kiemen mehrerer Muscheln nach unterschiedlichen Zeiten der Hälterung zu Sammelproben ( $n=6$ ) vereinigt und nach der Elektrophorese als Immunoblot ausgewertet. Die grafische Darstellung des Ergebnisses zeigt eine Zunahme der Hsp70-Konzentration bei der Kontrolle im Verlauf des ersten Tages der Hälterung (Abb. 35). In den folgenden Tagen traten nur relativ geringe Schwankungen des Stressproteingehaltes auf. Die auf erwärmtem Sediment liegenden Muscheln besaßen am 3., 4. und 7. Tag des Versuches etwas höhere Hsp70-Gehalte als die Kontrolle.



**Abb. 35:** Hsp70-Gehalt in Kiemengewebe nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T = 2-3K$ ).

Werden die Ergebnisse der Hsp70-Bestimmungen insgesamt betrachtet, kann zunächst festgestellt werden, dass die Hälterung bei geringer Sedimenterwärmung ( $\Delta T = 2-3K$ ) von den exponierten Miesmuscheln als Stress auf der zellulären Ebene wahrgenommen wurde. Dies galt sowohl für Hämocyten als auch für das Kiemengewebe.

Allerdings ergaben die einzelnen Versuche kein einheitliches Bild bezüglich der Hsp70-Expression bei exponierten Muscheln und der Kontrolle. Ein wesentlicher Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Versuche zu unterschiedlichen Jahreszeiten erfolgten und die Tiere daher wegen der Temperatur-Adaptation, die sie zuvor im Freiland erfahren hatten, unterschiedlich auf den thermischen Reiz reagierten (Chapple et al., 1998; Hofman & Somero, 1995). Außerdem schienen auch die Kontrolltiere z.T. auf die Hälterungsbedingungen mit einer Hsp70-Produktion zu reagieren.

Hervorzuheben ist, dass die thermische Exposition nicht zu einer kontinuierlichen Zunahme der Hsp70-Expression führte. Bei längerer Exposition deutete sich vielmehr eine Abnahme des Hsp70-Gehaltes an. Messungen nach kurzer Expositionsdauer weisen darauf hin, dass aber zunächst eine schnelle Induktion von Hsp70 im Vergleich zu nicht exponierten Tieren erfolgte.

Man kann spekulieren, dass die Abnahme von Hsp70 möglicherweise auf einem erhöhten Verbrauch des Stressproteins bei der Reparatur geschädigter Proteine beruht, so dass sich der zelluläre Spiegel an Hsp70 letztendlich erniedrigt. Um diese Hypothese zu prüfen müssten detaillierte Bestimmungen zur Induktion von Hsp70 auf der Protein- und RNA-Ebene erfolgen.

Nach Werner und Hinton (1999) kann sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme von Hsp70 als Indikator für Umweltstress angesehen werden.

Für eine zusätzliche Produktion von Stressproteinen zum zellulären Schutz wird grundsätzlich Energie benötigt. Muscheln, die in ihrem Lebensraum stark wechselndem Temperaturstress ausgesetzt sind, können weniger Energie für die Fortpflanzung und andere Lebensfunktionen aufbringen (Hofman & Somero, 1995; Hofman, 2005).

Um diesen potenziellen nachteiligen Effekt einer Meeresbodenerwärmung zu überprüfen, müssten längerfristige Freilandversuche an exponierten Muscheln erfolgen (aktives Monitoring).

### 5.3.3 Biomarker für Effekte von oxidativem Stress

Anhand der Biomarker „Lipidperoxidation“ und „Metallothionein“ wurde untersucht, ob thermischer Stress zu zellulären Reaktionen führt, die auf die Anwesenheit von oxidativem Stress hinweisen. Eine verstärkte Lipidperoxidation tritt dann auf, wenn Zellmembranen als Folge einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oxidativ geschädigt werden. Ein Hauptabbauprodukt von Membranen ist das Malondialdehyd (MDA), dessen Gehalt in der Mitteldarmdrüse (MDD) von *Mytilus edulis* als Indikator für das Ausmaß der Lipidperoxidation ermittelt wurde. Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der Bestimmung der Lipidperoxidation nach mehrtägiger schwacher thermischer Exposition ( $\Delta T = 2-3K$ ) der Miesmuscheln eingegangen.

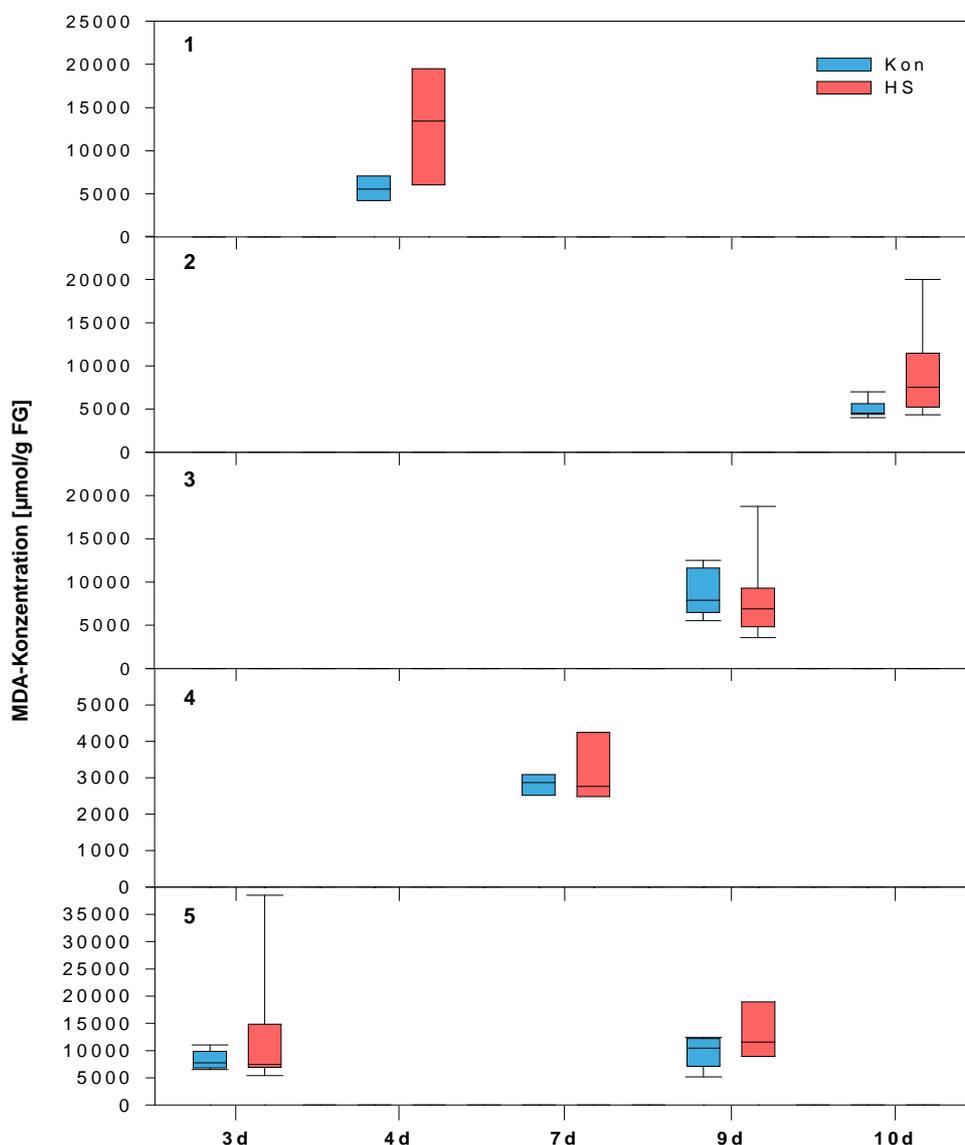
Die Messungen erfolgten im Verlauf mehrerer Versuche nach unterschiedlich langer Hälterungsdauer. Bei drei von fünf in Abbildung 36 grafisch dargestellten Versuchsergebnissen war eine tendenzielle Erhöhung der Lipidperoxidation in der MDD thermisch belasteter Tiere festzustellen. Wegen der großen Variabilität der Messwerte und der relativ geringen Stichprobengröße besaßen diese Unterschiede aber keine statistische Signifikanz.

Als zweiter Indikator für oxidativen Stress wurden Metallothioneine [MT] gewählt. Sie zählen zu den antioxidanten Schutzproteinen, die dazu beitragen, Zellen vor den schädlichen oxidativen Wirkungen von ROS zu schützen. Die Konzentration von MT wurde in der MDD von *Mytilus edulis* bestimmt.

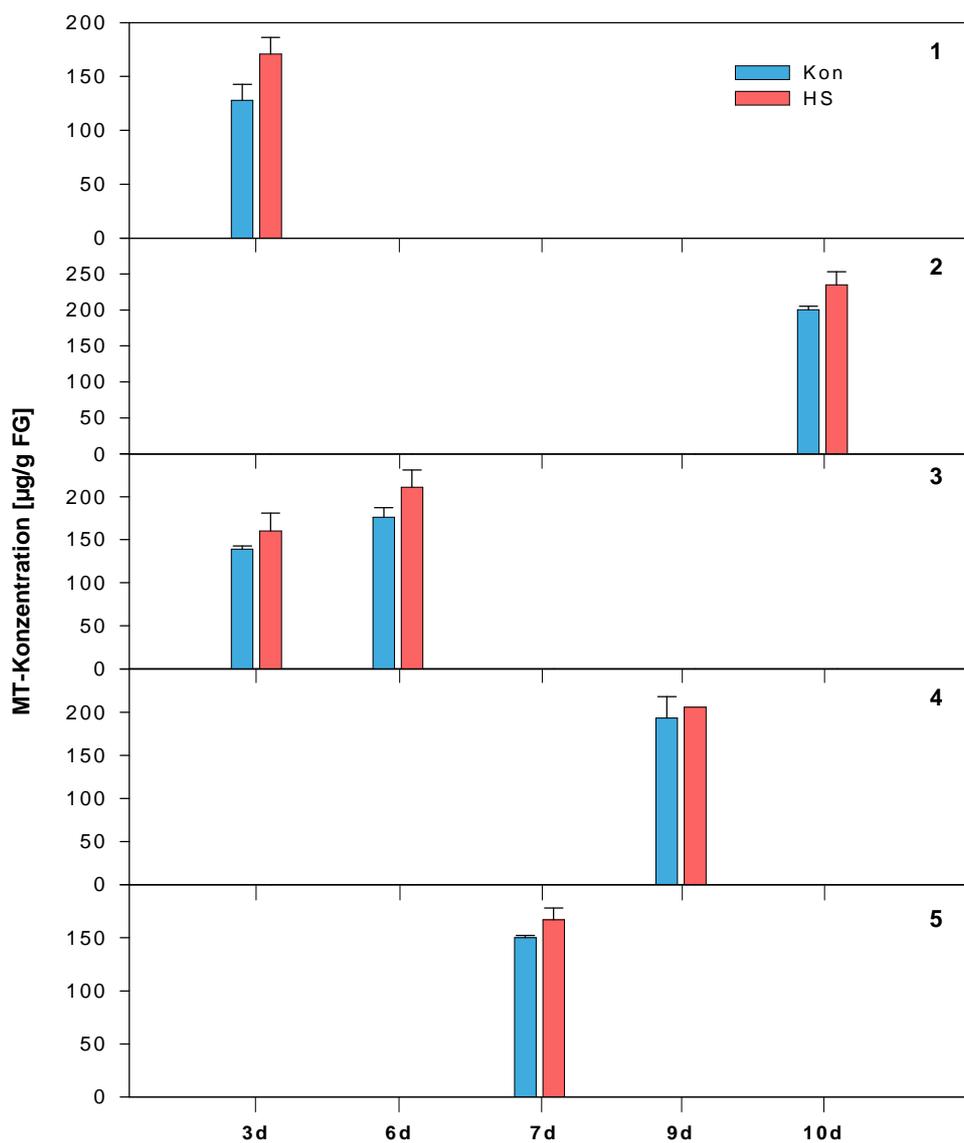
Wie im Fall der Lipidperoxidation werden hier die Befunde nach schwacher thermischer Belastung der Miesmuscheln dargestellt. Abbildung 37 zeigt, dass bei allen durchgeführten Vergleichsmessungen die MDD-Sammelproben der thermisch belasteten Tiere einen mehr oder weniger ausgeprägten höheren Gehalt an MT aufwiesen als die Proben der Kontrolle. Dieser Befund galt für alle untersuchten Expositionszeiten, war aber besonders deutlich nach vergleichsweise kurzer thermischer Belastungszeit (3d, 6d).

Untersuchungen von Serafim et al. (2002) an *Mytilus galloprovincialis* haben gezeigt, dass auch die Temperatur einen Einfluss auf die MT-Konzentration in der Kieme ausübt. Mit zunehmender Temperatur traten höhere MT-Gehalte in der Kieme auf. Dieser Befund deckt

sich mit dem vorliegenden Ergebnis eines tendenziellen Anstiegs von MT in der MDD nach schwachem Temperaturstress. In Abhängigkeit von der Temperatur kann sich auch die Fähigkeit der MT zur Bindung von Metallen verändern und damit Schutzfunktionen beeinflussen (Baykan et al., 2006; Serafim et al., 2002).



**Abb. 36:** Lipidperoxidation in der Mitteldarmdrüse von Miesmuscheln nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ). Die Grafik zeigt die Ergebnisse von fünf verschiedenen Versuchen.

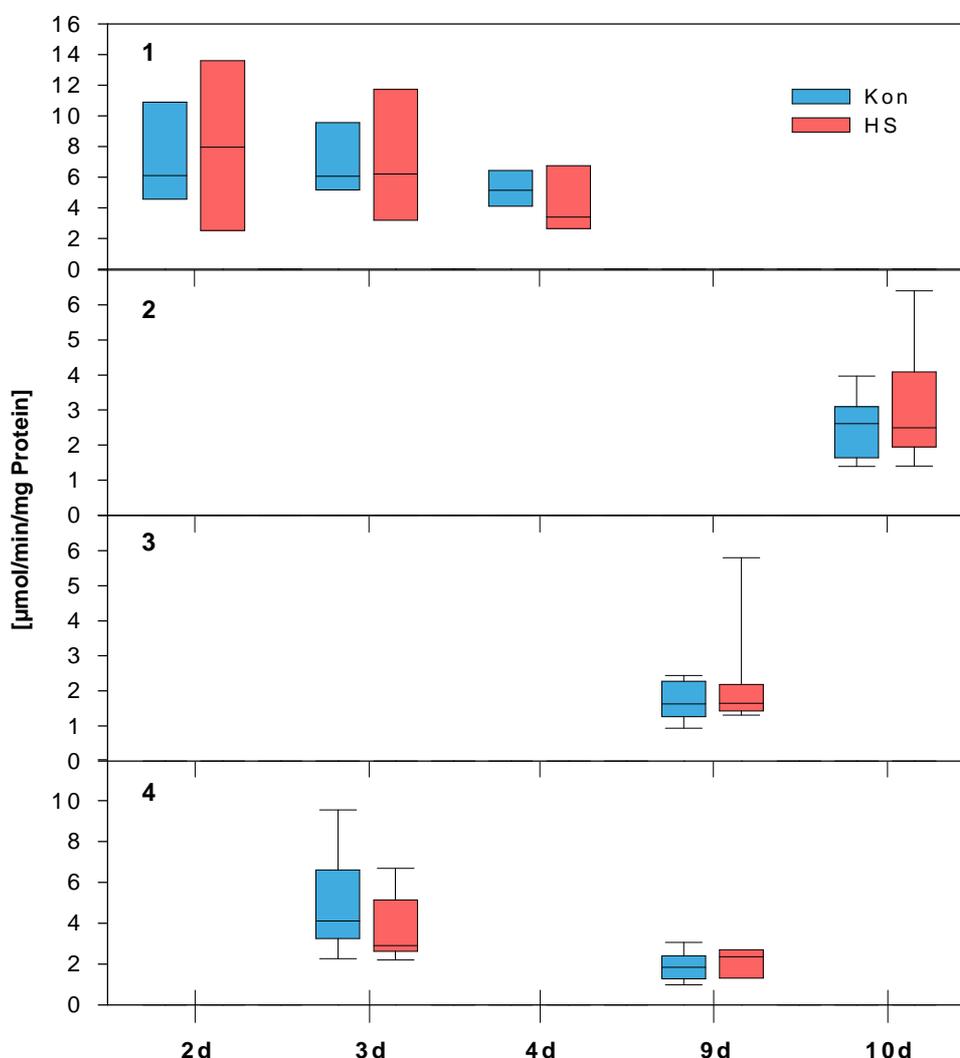


**Abb. 37** MT-Konzentration in der Mitteldarmdrüse von Miesmuscheln nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T = 2-3K$ ). Die Grafik zeigt die Ergebnisse von fünf verschiedenen Versuchen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Parallelbestimmungen an Sammelproben ( $n = 8-10$ ) von MDD mit der Standardabweichung.

### 5.3.4 AChE-Aktivität im Kiemengewebe

Im Rahmen eines auf Schadstoffe ausgerichteten Monitorings wird häufig die Aktivität der Acetylcholinesterase als Biomarker zum Nachweis biologischer Effekte von Pestiziden untersucht. Da es sich um ein Enzym handelt, konnte man vermuten, dass die Aktivität auch durch Temperatureinfluss beeinflusst wird.

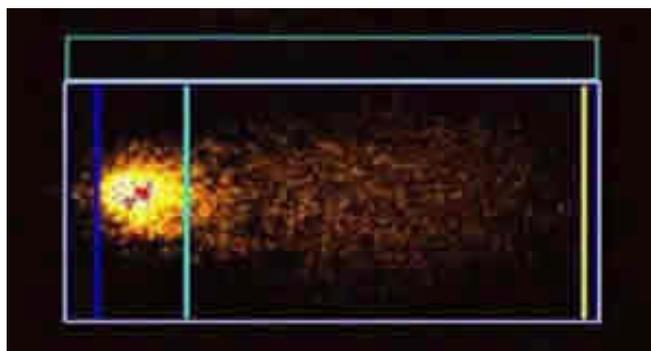
Wie Abbildung 37 zeigt, wurden nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ) keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen beobachtet. Es trat keine Zunahme der Enzymaktivität im Verlauf der Exposition auf. In einem Versuch (4) kam es am Ende der Hälterung (9d) sogar zu einer Abnahme der Enzymaktivität bei beiden Versuchsgruppen im Vergleich zum 3. Tag.



**Abb. 37:** AChE-Konzentration in der Kieme von Miesmuscheln nach mehrtägiger Exposition auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ). Die Grafik zeigt die Ergebnisse von vier verschiedenen Versuchen.

### 5.3.5 Gentoxische Schädigung

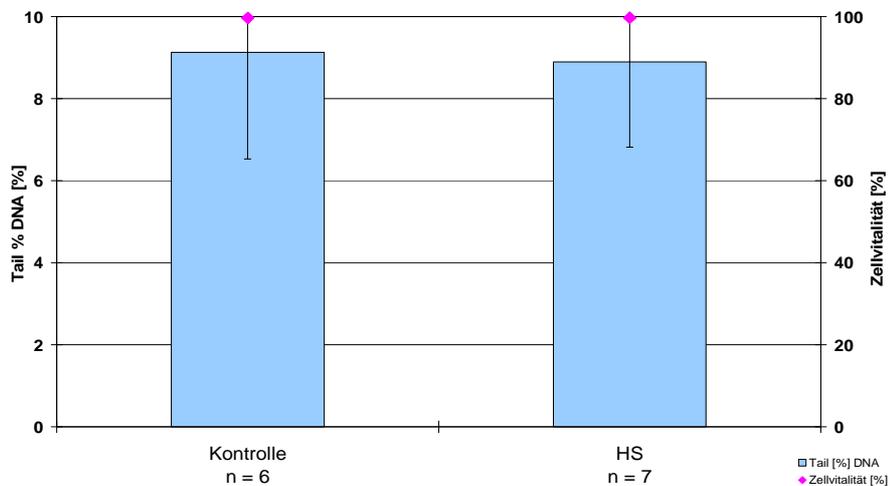
Der Comet-Assay ist ein Testverfahren, mit dem sich genotoxische Effekte von Substanzen oder physikalischen Stressoren, die sich als DNA-Strangbrüche oder alkalilabile Stellen manifestieren, quantifizieren lassen (Abb. 38). Da für den Comet-Assay einzelne suspendierte Zellen benötigt werden, wurden die Hämocyten von *Mytilus edulis* als Indikatorzellen einer gentoxischen Schädigung gewählt. Im Rahmen einer früheren Untersuchung des IfAÖ wurde der Comet-Assay bereits erfolgreich mit den Hämocyten der Miesmuschel durchgeführt (Zorn, 2000).



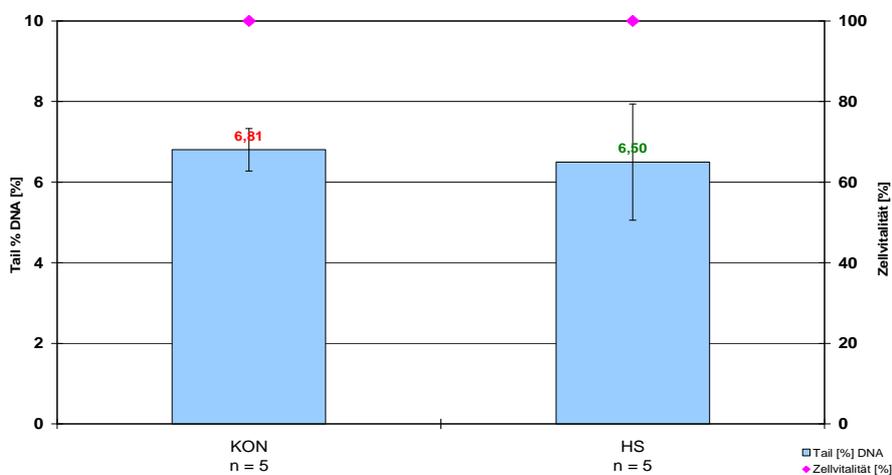
**Abb. 38:** Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines geschädigten Zellkerns. Im elektrischen Feld wandert die fragmentierte DNA aus dem Bereich des Zellkerns heraus und bildet einen Schweif („Kometen“).

Beim ersten Versuch wurden die Miesmuscheln einem starken Temperaturstress ausgesetzt, indem sie für 24h komplett in erwärmtem Wasser ( $\Delta T = 10K$ ) gehältert wurden. Anschließend erfolgte die Entnahme der Hämolymphe und die Durchführung des Comet-Assay an den Hämocyten. Bei der Auswertung der fluoreszierenden Zellkerne mittels Bildanalyse wurde kein Unterschied hinsichtlich der DNA-Schädigung (Tail%DNA) von exponierten Tieren und der Kontrolle ermittelt (Abb. 39).

In der Abbildung 40 ist das Ergebnis eines Comet-Assay an Miesmuscheln dargestellt, die für drei Tage auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T = 2-3K$ ) exponiert worden waren. Auch bei diesem Versuchsansatz trat keine Zunahme der DNA-Schädigung bei den thermisch belasteten Muscheln auf.



**Abb. 39** DNA-Schädigung (Tail%DNA) von Hämocyten nach 24h-Exposition von Miesmuscheln gegenüber starkem Temperaturstress ( $\Delta T=10K$ ).



**Abb. 40** DNA-Schädigung (Tail%DNA) von Hämocyten nach 3-tägiger Exposition von Miesmuscheln auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ).

#### 5.5.4 Histologische Untersuchungen

In Ergänzung der Untersuchungen zur Wirkung von thermischem Stress auf zelluläre Biomarker wurden auch histologische Befunde an der Mitteldarmdrüse (MDD) und der Gonade von *Mytilus edulis* nach einem Temperaturstress durchgeführt. Die MDD ist das zentrale Stoffwechselorgan der Muscheln und diesbezüglich mit der Leber von Wirbeltieren vergleichbar. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Aufnahme und Verdauung von Nahrung sowie ihrer Entgiftungsleistung spielt die Unversehrtheit der MDD eine zentrale Rolle für den Gesundheitszustand der Miesmuschel.

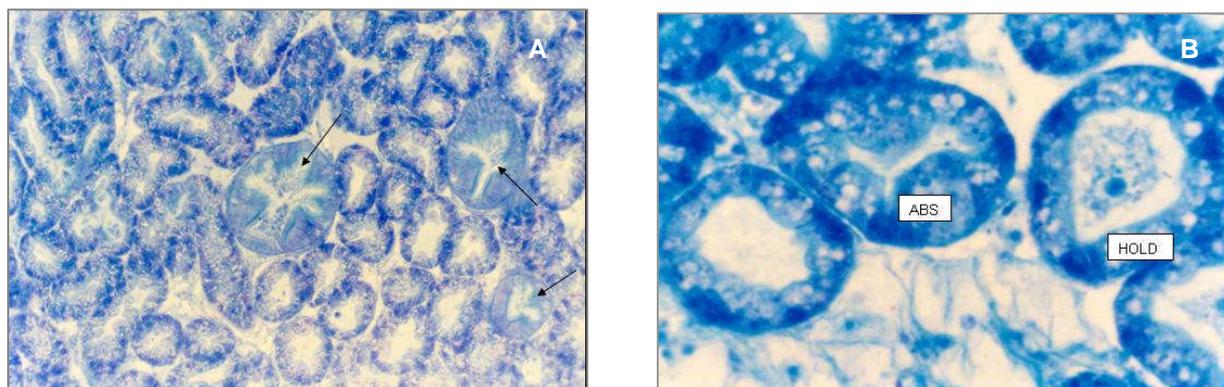
Als Reproduktionsorgan verdient der histologische Zustand der Gonade ebenfalls eine besondere Aufmerksamkeit. Das männliche und weibliche Gonadengewebe entwickelt sich im Verlauf des Reproduktionszyklus vorwiegend im Mantelgewebe, das beiden Schalenhälften auf der Innenseite anliegt.

Im Rahmen der vorliegenden Temperaturversuche wurde die MDD und Gonade von Miesmuscheln untersucht, nachdem die Tiere für 10 Tage auf schwach erwärmtem Sediment ( $\Delta T=2-3K$ ) exponiert waren. Zum Vergleich wurden die Organe einer im selben Becken gehaltenen, aber nicht-exponierten Kontrollgruppe histologisch untersucht.

##### MDD

Die große, bräunlich oder olivgrün gefärbte Mitteldarmdrüse (MDD) besteht aus einer Vielzahl von verzweigten und blind endenden röhrenartigen Verdauungstubuli (Drüsentubuli), die in interstitielles Bindegewebe eingebettet sind. Sie stehen über weitlumige Hauptkanäle mit dem Magen in Verbindung, der dadurch durchlöchert erscheint. Die Drüsentubuli sind der Ort, an dem die intrazelluläre Verdauung von Nahrungspartikeln stattfindet. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung ist ein einschichtiges Epithel aus zylindrischen Verdauungszellen und basophilen, dreieckförmigen Pyramidenzellen zu erkennen. Verdauungszellen sind an der Absorption und intrazellulären Verdauung von Nahrungsstoffen beteiligt, während basophile Zellen eine sekretorische Aufgabe besitzen (Abb. 41).

In beiden Proben befanden sich die Verdauungstubuli der MDD vorwiegend im aktiven (ABS-Stadium) Zustand oder der Regenerationsphase (HOLD-Stadium). Pathologische Veränderungen wurden weder bei den thermisch exponierten Tieren, noch bei der Kontrolle gefunden.

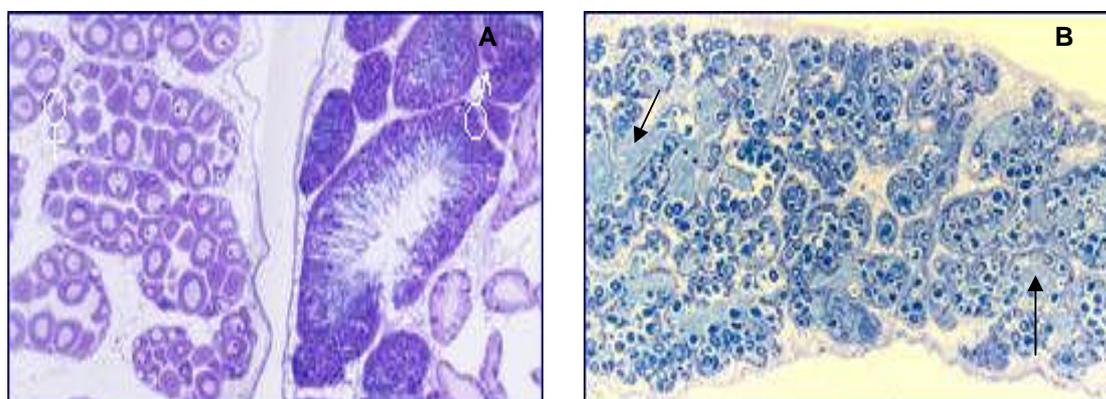


**Abb. 41:** A: Detailansicht von Verdauungstubuli im Zustand der Nahrungsresorption (ABS-Stadium). Das Verdauungsepithel setzt sich aus hellen Verdauungszellen und dunkel gefärbten Pyramidenzellen zusammen. (Toluidinblau-Färbung; Vergrößerung 400-fach)

B: Tubuli im ABS- und HOLD-Stadium. Im ABS-Stadium besitzen die Tubuli ein aktiv nahrungsresorbierendes, dickes Verdauungsepithel und ein schmales Lumen. Das HOLD-Stadium (Regenerationsphase) ist durch ein dünneres Epithel und ein erweitertes Lumen charakterisiert. (Toluidinblau-Färbung; Vergrößerung 400-fach)

### Gonade

Entsprechend dem Zeitraum der Untersuchung im April befanden sich die Gonaden der weiblichen und männlichen Tiere im reifen Zustand (Abb. 42). Bei beiden Versuchsgruppen war aber außer der dominierenden Anzahl reifer Spermien und Oocyten auch immer ein geringer Anteil nicht ausdifferenzierter Gameten vorhanden. Nur bei den Weibchen wurde eine Degeneration und Resorption von Gameten beobachtet (Abb. 42B). Dabei war das Gonadengewebe auf der Seite, die direkt auf dem erwärmtem Sediment lag, nicht stärker betroffen, als die dem Sediment abgewandte Seite der Muschel. Insgesamt bestand kein nennenswerter Unterschied bezüglich des Vorkommens degenerativer Gonadenveränderungen zwischen den thermisch exponierten Muscheln und den Kontrolltieren.



**Abb. 42** A: reifes weibliches (links) und männliches Gonadengewebe der Miesmuschel.  
B: weibliche Gonade mit Degeneration der Eizellen in den Follikeln (Pfeile).

## 5.4 Migrationsverhalten von *Corophium volutator* und *Marenzelleria neglecta* nach thermischer Exposition

### 5.4.1 Einleitung

Wie bereits an anderer Stelle ausgeführt, kann der Betrieb von im Meeresboden verlegten Stromkabeln zu einer Erwärmung des umgebenden Sediments führen. Damit ist wahrscheinlich ein Einfluss auf die benthische Fauna und Flora sowie eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften des Substrates (Prokop, 2006) verbunden. Im Rahmen dieses Teilprojektes sollten erste Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur auf das Migrationsverhalten von benthischen Organismen erhalten werden. Die Untersuchungen wurden an zwei häufig vorkommenden Arten der benthischen Infauna, dem Amphipoden *Corophium volutator* und dem Polychaeten *Marenzelleria neglecta*, durchgeführt. Es wurde vermutet, dass diese Arten wahrscheinlich aufgrund ihrer ökophysiologischen Eigenschaften unterschiedlich auf eine Sedimenterwärmung reagieren würden. Zusätzlich wurde noch der abiotische Parameter Sauerstoff untersucht (Borrmann, 2006).

### 5.4.2 Untersuchte Arten

Der Schlickkrebis *Corophium volutator* ist ein kleiner Krebs mit einer maximalen Körperlänge von bis zu 10 Millimetern (Segerstråle, 1940). Seine Verbreitung erstreckt sich innerhalb der gemäßigten Breiten, entlang den nordamerikanischen und europäischen Küsten und im Schwarzen Meer (Meißner, 2000). In der Ostsee besiedelt er vor allem Flachwassergebiete und ist dort besonders in schlickigen Sanden in sehr hohen Individuendichten zu finden. Der Krebs baut U-förmige 4 bis 5cm tiefe Röhren in das Sediment (z.B. Segerstråle, 1940; Bias, 1981), in denen er sich überwiegend aufhält. Er wird aber auch regelmäßig auf der Sedimentoberfläche oder im Wasser schwimmend angetroffen (Thamdrup, 1935).

Der Polychaet *Marenzelleria neglecta* gehört zur systematischen Gruppe der Spionidae. Die Verbreitung erfolgt entlang der nordamerikanischen Atlantikküste, der kanadischen Arktis, dem Pazifik, dem Elbeästuar der Nordsee und in der Ostsee (Sigorski & Bick, 2004). Auch *Marenzelleria neglecta* ist fähig, vertikale Röhren in das sandige oder schlammige Sediment zu bauen. Diese unverzweigten Röhren können L- oder J-förmig angelegt sein und bis zu 35cm in das Sediment reichen (Zettler et al., 1994). Diese Art ist zu den Suspensionsfressern zu zählen und somit befähigt resuspendiertes organisches Material zu konsumieren (Kube et al., 1996). *Marenzelleria neglecta* weist eine hohe Toleranz gegenüber niedrigen Salzgehalten auf.

### 5.4.3 Experimenteller Versuchsaufbau

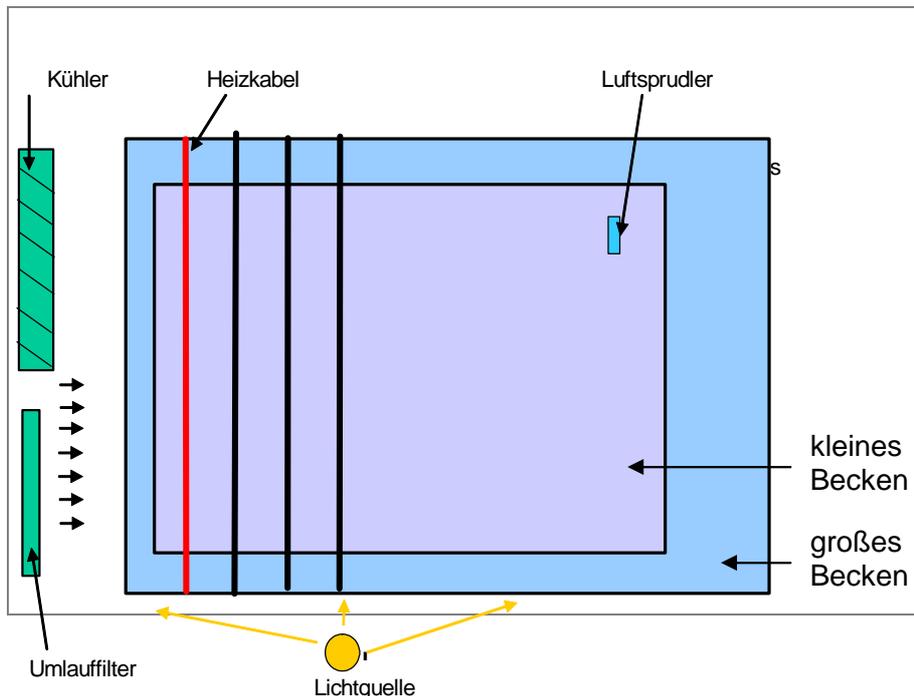
Der experimentelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 43 dargestellt. In den Wänden eines lebensmittelechten Kunststoffbeckens (Maße: 800x600x320mm) wurden Plexiglasfenster eingebracht. Mit Hilfe einer Lichtquelle konnte der Innenraum ausgeleuchtet werden. Auf den Boden des Kunststoffbeckens wurden vier Heizkabel verlegt. Die Wärmeproduktion konnte durch die unterschiedlichen Einstellungen der Stromspannungen, mittels zweier Netzgeräte, gesteuert werden. Durch diesen Versuchsaufbau ließ sich ein gewünschter Temperaturgradient im Sediment realisieren. Zusätzlich wurde eine Heizmatte unter das Kunststoffbecken gelegt, die die Erwärmung des Sedimentes unterstützte.

Die Messung der Sedimenttemperatur erfolgte durch sieben Temperaturfühler, die drei Zentimeter unterhalb der Sedimentoberfläche angebracht wurden. Der Abstand der ersten sechs Temperaturfühler betrug jeweils 5cm. Dabei waren die ersten vier Temperaturfühler ungefähr zwei Zentimeter über den verlegten Kabeln angebracht. Der siebente Temperaturfühler wurde in einer Entfernung von ca. 41cm angebracht. Die Temperatur konnte dann an digitalen 4-Kanal-Thermometern abgelesen werden.

In das größere Versuchsbecken wurde ein kleineres Becken, mit den Maßen 600x400x320mm eingelassen. Der Boden des kleineren Beckens wurde entfernt, um die Kabel nicht zu verdecken. Dieses Becken stellte nun das eigentliche Versuchsbecken dar.

Damit die Wassertemperatur konstant blieb, wurde eine Kühlschlange und zur Reinigung und Zirkulation des Wassers ein Umlauffilter angebracht. Außerdem wurde noch ein Luftsprudler in das Becken gehängt. Damit wurde verhindert, dass der Sauerstoffgehalt im Wasser zu weit absank.

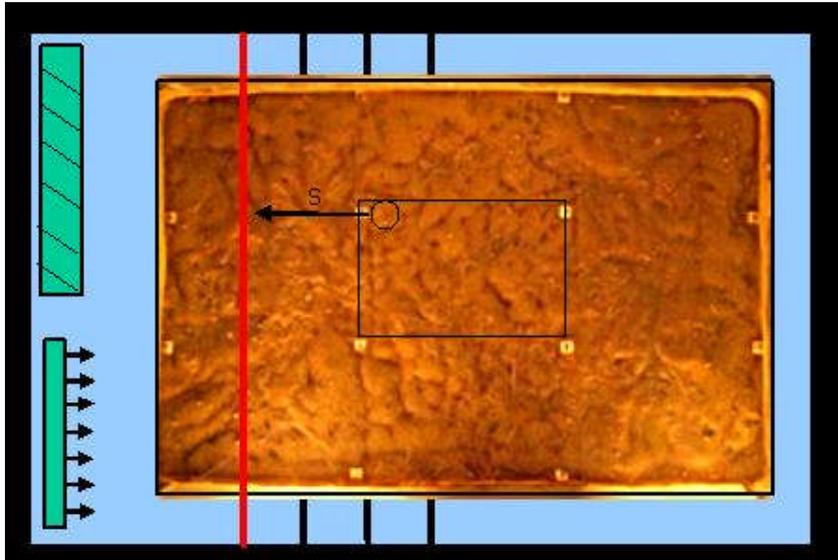
Es wurde Sediment von den jeweiligen Probenahmestandorten verwendet, um bei den einzelnen Versuchsdurchführungen eine relativ naturnahe Umgebung zu schaffen. Die Sedimenttiefe im Becken betrug bei den einzelnen Versuchen ungefähr 5,5 bis 6 Zentimeter. Weiterhin wurde bei Versuchen mit *Corophium volutator* Biotopwasser verwendet, wohingegen bei *Marenzelleria neglecta* kein Wasser vom Probenahmeort genutzt werden konnte, da es zu verschmutzt war. Stattdessen wurde Ostseewasser verwendet und der Salzgehalt so weit verringert, dass er dem am Probenahmestandort entsprach. Der Wasserstand im Versuchsbecken betrug ungefähr 19cm. Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus der Beleuchtung realisiert.



**Abb. 43:** Schematische Zeichnung des Versuchsbeckens

Die Sedimentfläche des kleinen, inneren Versuchsbeckens wurde in 9 Rechtecke unterteilt, wobei weiße Mosaiksteinchen als Begrenzung dienten (Abb. 44). Die einzelnen Rechtecke wurden mittels Digitalkamera fotografiert und die Entfernung der Bautenöffnungen zum 1. Heizkabel (Kabel mit der größten Spannung) ermittelt („s“) (Abb. 43). Dabei war jedoch nicht zu erkennen, ob in jedem Bau ein Tier saß. Somit wurde nur mit prozentualen Individuenzahlen gearbeitet. Für die Auswertung wurde das Versuchsbecken in 10 Längsstreifen unterteilt (Abb. 44).

Bevor die Tiere in das Versuchsbecken eingesetzt wurden, wurden sie mindestens zwei Wochen an die Laborbedingungen adaptiert. Die Dauer der Versuche betrug eine Woche, wobei die Bauten in einem 24h-Rhythmus fotografiert wurden. Pro Testorganismus wurden vier Versuche (Parallelen) durchgeführt.



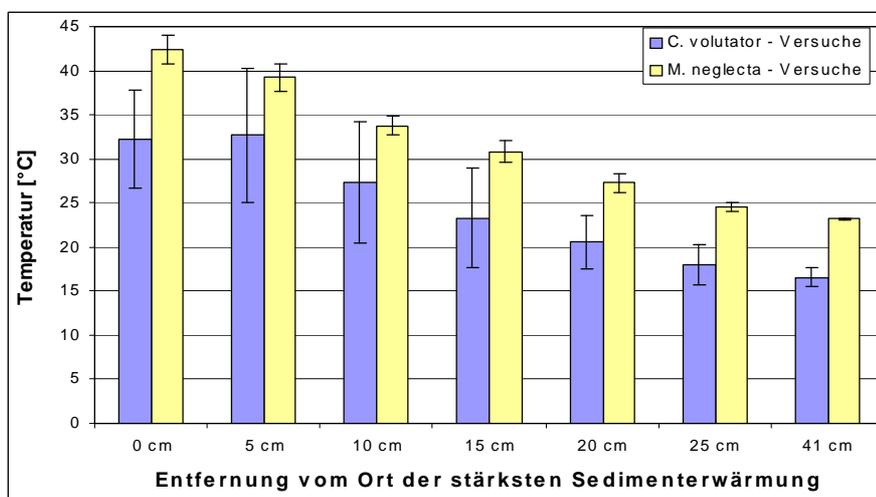
**Abb. 44:** Einteilung des Versuchsbeckens in 9 Rechtecke und Ermittlung der Entfernung ( $s$ ) der Bauten zum Kabel mit der höchsten Spannung (rot eingezeichnet).



**Abb. 45:** Einteilung des Versuchsbeckens in 10 Streifen mit einer Breite von 5cm.

## 5.4.4 Ergebnisse

### 5.4.4.1 Temperaturmessung



**Abb. 46** Messung der Sedimenttemperatur entlang des Temperaturgradienten

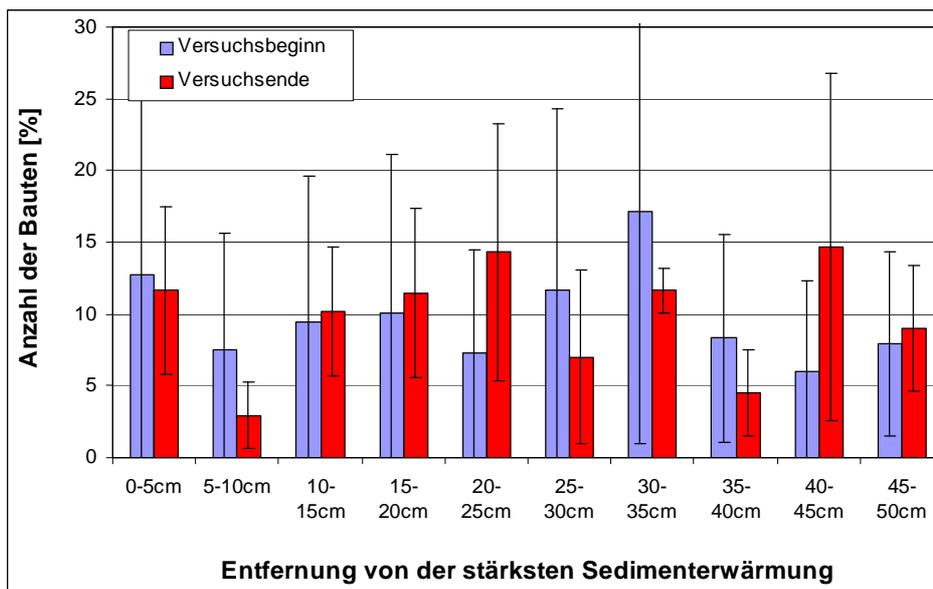
In obigem Diagramm (Abb. 46) wurden die Temperaturgradienten der 2 Versuchsreihen, von *Corophium volutator* und von *Marenzelleria neglecta*, aufgetragen. Die Versuchsreihe 2 (*Marenzelleria neglecta*) wurde im späten Sommer/frühen Herbst und die Versuchsreihe 1 (*Corophium volutator*) im Winter durchgeführt. Demzufolge ist die Temperatur der Versuchsreihe 1 im gesamten Becken geringer, als die von Versuchsreihe 2, da die Temperatur im Becken im Wesentlichen von der Ausgangstemperatur (Umgebungstemperatur) abhing. In Streifen 1 wurde für Versuchsreihe 1 eine Sedimenttemperatur von 33°C und für Versuchsreihe 2 von 43°C gemessen. In Streifen 10 lag die Sedimenttemperatur bei beiden Versuchsreihen um 20°C.

#### 5.4.4.2 Reaktionsverhalten von *Corophium volutator*

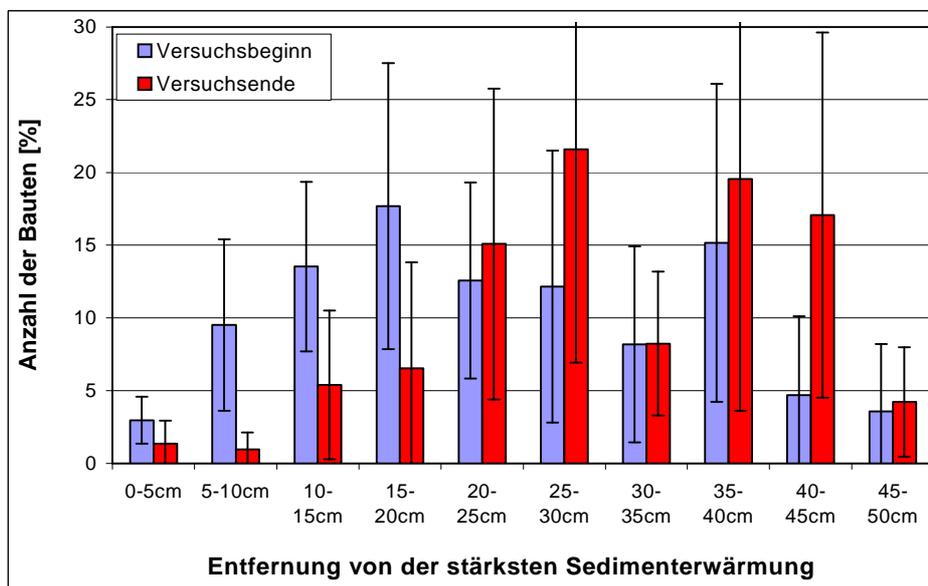
*Corophium volutator* war im gesamten Versuchsbecken gleichmäßig verteilt (Abb. 47). Es kam zu Schwankungen in den Individuenzahlen, die jedoch keine Tendenz hinsichtlich des Temperaturgradienten aufweisen. Somit lag kein gerichtetes Wanderungsverhalten in Bezug auf den Temperaturgradienten vor.

#### 5.4.4.3 Reaktionsverhalten von *Marenzelleria neglecta*

Bei den Versuchsdurchführungen mit *Marenzelleria neglecta* ist erkennbar (Abb. 48), dass zu Beginn der Experimente im Bereich zwischen null bis 15/20cm sich viele Tiere angesiedelt haben. Zum Ende der Experimente sind die meisten Tiere aus dem Wärmebereich abgewandert und haben sich im mittleren und hinteren Beckenbereich angesiedelt. Somit zeigte diese Art eine gerichtete Wanderung.



**Abb. 47:** Individuenzahl/Anzahl der Bauten von *Corophium volutator* zum Versuchsbeginn und -ende (Mittelwerte der vier Parallelen)



**Abb. 48:** Individuenzahl/Anzahl der Bauten von *Marenzelleria neglecta* zum Versuchsbeginn und -ende (Mittelwerte der vier Parallelen)

## 6 Versuche mit 50Hz-EMF – Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Biologische Wirkungen von elektromagnetischen Feldern

Elektromagnetische Felder (EMF) können molekulare Wirkungen in Zellen und Zellverbänden induzieren und somit biologische Effekte auslösen. Zur Erfassung solcher Effekte können so genannte biologische Endpunkte oder Biomarker ausgewählt werden, die wesentliche Lebensfunktionen oder –strukturen beschreiben (z.B. Nervensystem, Blutsystem, Abwehrsystem, genetische Dysfunktionen) (Simkó & Mattsson, 2004). Die Wirkung eines EMF auf einen Organismus hängt wesentlich von der Frequenz und Intensität des EMF ab. Bezüglich der Frequenz unterscheidet man gewöhnlich folgende drei Frequenzbereiche: statische Felder sowie nieder- und hochfrequente Felder.

Ein statisches Magnetfeld führt zu induktiven Wirkungen auf bewegte Ladungen, während ein statisches elektrisches Feld die Elektrisierung und Entladung eines Körpers bewirken kann. Niederfrequente Felder (bis ca. 30kHz) üben bei einer akuten Wirkung Reizwirkungen auf Sinnes-, Nerven- und Muskelzellen aus. Im hochfrequenten Spektrum (30kHz–300GHz) dominieren die thermischen Wirkungen auf Organismen.

Die potenziellen schädlichen Wirkungen von hochfrequenten EMF stehen besonders im Interesse der Öffentlichkeit (Stichwort „Handystrahlung“). Neben der thermischen Wirkung auf Gewebe sind auch weitere nicht-thermische Wirkungen beschrieben, deren Relevanz für die menschliche Gesundheit noch weitgehend unklar ist. Hochfrequente EMF sollen im Folgenden aber keine Erwähnung mehr finden, da sie für die im vorliegenden Projekt bearbeitete Fragestellung zur Emittierung von EMF durch Seekabel nicht relevant sind.

Wenn Seekabel mit Wechselstrom betrieben werden, geschieht das mit der für das deutsche und europäische Verbundnetz üblichen Frequenz von 50Hz. Bei dieser geringen, dem „extremly-low-frequency-EMF“-Bereich (ELF-EMF) zugerechneten Frequenz, sind die EMF objektgebunden bzw. leitungsgeführt. Sie befinden sich in unmittelbarer Nähe und nehmen mit der Entfernung schnell ab (CMACS, 2003).

Ein mit 50Hz-Wechselstrom betriebenes Kabel erzeugt ein Magnetfeld (MF) derselben Frequenz. Im Gegensatz zum elektrischen Feld durchdringt das Magnetfeld die meisten Materialien fast unvermindert. Eine Abschirmung lässt sich nur mit großem Aufwand unter Verwendung von Spezialwerkstoffen erreichen. Allerdings erfolgt mit zunehmender Entfernung von der Stromquelle eine deutliche Abnahme der magnetischen Feldstärke (Meißner et al., 2006). Die Stärke eines abgestrahlten MF hängt wesentlich vom Kabeltyp ab. Durch eine entsprechende Anordnung der elektrischen Leiter (3 Phasen, enge Anordnung) kann die Entstehung magnetischer Felder minimiert werden (BfS, 2005).

#### 6.1.1 Wirkungen von ELF-EMF auf Wirbeltiere

Zu den vielfältigen Wirkungen von ELF-EMF auf biologische Systeme zählen auch Effekte auf Funktionen von Immunzellen von Wirbeltieren. Beispielsweise zeigte die Arbeit von Frahm et al. (2006) an Knochenmarksmakrophagen der Maus, dass die Exposition in einem

50Hz-Magnetfeld (1000 $\mu$ T) zu einer Zunahme der Phagozytose von Latex-Partikeln führte. Außerdem erhöhte sich die Produktion von Interleukin-1 $\beta$ . Magnetische Flussdichten im Bereich von 50 $\mu$ T-1000 $\mu$ T stimulierten die Maus-Makrophagen auch zur Bildung freier Radikale.

Es wurde auch beschrieben, dass bereits relativ geringe magnetische Flussdichten (60-80 $\mu$ T) eine Induktion von Stressproteinen in humanen Zellkulturen auslösen können (Tokalov et al., 2004). Am Beispiel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* machte dieselbe Arbeitsgruppe die interessante Beobachtung, dass eine Befeldung mit einem 50Hz-EMF die Stressreaktion (Hsp70) des Tieres auf einen Temperaturstress deutlich verstärkte (Junkersdorf et al., 2000). Einen entsprechenden Befund erhielten auch Alfieri et al. (2006) nachdem sie humane Zellen in Zellkultur einem gemeinsamen EMF- und Temperaturstress ausgesetzt hatten.

### 6.1.2 Wirkungen von ELF-EMF auf wirbellose Organismen

Über Wirkungen von niederfrequenten EMF auf zelluläre Funktionen von Invertebraten sind in der wissenschaftlichen Literatur vergleichsweise wenige Angaben zu finden. In Bezug auf die im vorliegenden Projekt durchgeführten Befeldungen von Miesmuscheln in einem 50Hz-Magnetfeld sind aber die Untersuchungen einer italienischen Arbeitsgruppe von besonderem Interesse. Miesmuscheln (*M. galloprovincialis*) wurden in einem Spulensystem mit 50Hz-Magnetfeldern (MF) unterschiedlicher Flussdichte (200-1000 $\mu$ T) für 15 oder 30min. befeldet. Als Endpunkt einer potenziellen EMF-Wirkung wurde die durch einen chemotaktischen Reiz (fMLP) induzierte Formveränderung von Hämocyten bewertet. Bei MF von 300 $\mu$ T und höher trat eine Verzögerung der fMLP-induzierten Formveränderung der Hämocyten ein. Außerdem nahm die Zeit, welche die Hämocyten zur Adhäsion an eine Glasoberfläche benötigten, zu (Ottaviani et al., 2002; Gobba et al., 2003). Die Befunde deuten darauf hin, dass die Calcium- und Kalium-Ionenkanäle der Zellmembran durch MF beeinflusst werden.

Dieselbe Arbeitsgruppe führte auch Untersuchungen zur Induktion von Stressproteinen (Hsp70, Hsp90) in *Mytilus*-Hämocyten nach MF-Befeldung durch. Die Muscheln wurden in einem 50Hz-MF unterschiedlich lang exponiert (30, 2x30, 3x30min). Bei 400 $\mu$ T wurde eine zeitabhängige Zunahme der Expression des Stressproteins Hsp70 im Western-Blot ermittelt (Malagoli et al., 2004).

Von Bochert und Zettler (2004) wurde eine Langzeitexposition (3 Monate) von marinen Benthosorganismen in einem statischen Magnetfeld durchgeführt. Sie fanden keinen Unterschied bezüglich der Überlebensrate zwischen exponierten Tieren und der Kontrolle. Bei den exponierten Miesmuscheln wurde kein Einfluss des MF auf den Gonadenindex und den Konditionsindex gefunden.

Was die potenziellen Effekte der von Seekabeln emittierten EMF auf physiologische Funktionen von marinen Organismen betrifft, liegen diesbezüglich praktisch keine publizierten Daten vor. Die Abschätzungen zur Wirkung von EMF beziehen sich im

Wesentlichen auf eine mögliche Beeinflussung des Wanderverhaltens von Fischen (Diesbezüglich Literaturstudie von Gill et al., 2005).

## **6.2 Untersuchungen an Immunzellen der Maus**

(unter Mitarbeit der AG Umweltphysiologie PD. Dr. M. Simkó; FB Biologie, Universität Rostock)

Wirkungen von 50Hz-EMF auf Zellen des Immunsystems sind von besonderer Bedeutung, da sie möglicherweise die Abwehrleistung des Immunsystems schwächen. In Bezug auf Immunzellen bei Säugern liegen bereits relativ viele Befunde vor (Frahm, 2006; Lupke, 2006). Im Gegensatz dazu ist über Effekte von 50Hz-EMF auf marine Invertebraten, mit Ausnahme der vorstehend erwähnten Arbeiten einer italienischen Arbeitsgruppe, so gut wie nichts bekannt.

Nachfolgend werden zunächst Ergebnisse von Versuchen zur EMF-Befeldung von primären immunrelevante Zellen (Knochenmarksmakrophagen) der Maus vorgestellt. Diese Arbeiten wurden begleitend zu den am IfAÖ erfolgten EMF-Versuchen mit Immunzellen (Hämocyten) von Miesmuscheln an der Universität Rostock durchgeführt.

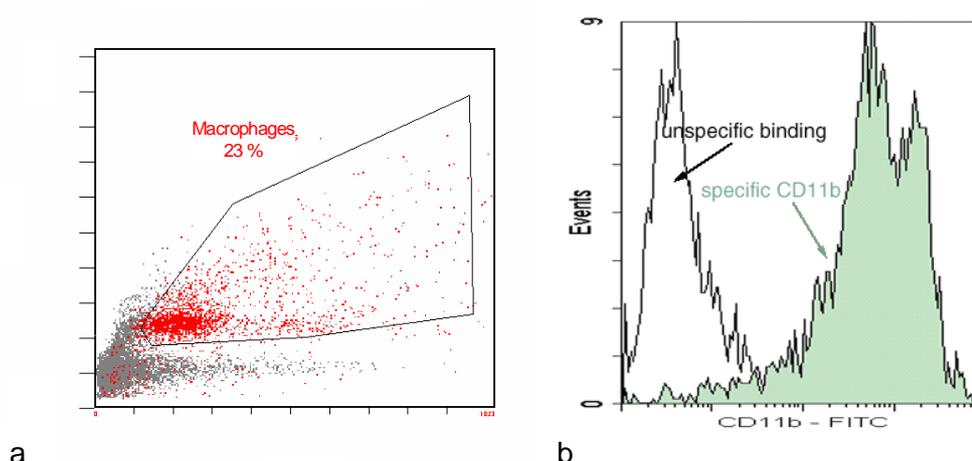
Die Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus wurden unterschiedlichen Feldstärken ausgesetzt, wobei die Feldstärken im Bereich von 50 bis 1000 $\mu$ T variierten (Grenzwert 100 $\mu$ T). Auf der Grundlage von Vorversuchen mit den Zellen wurden dann Expositionszeiten zwischen 45min und 24h verwendet.

### **6.2.1 Methoden und Ergebnisse**

Bestimmung der Produktion freier Radikale: Nach Phagozytose und/oder Zellaktivierung erhöhen Makrophagen die Ausschüttung von „reactive oxygen species“ (ROS) und Stickoxiden (NO) als zytotoxische Abwehrstoffe gegen eingedrungene Pathogene. Daher soll die Bildung von Superoxid-Radikalen sowie NO in Abwesenheit von Phagozytose während der Exposition mit elektromagnetischen Feldern ermittelt werden. Die freien Radikale können durch das Nitrotetrazoliuomblau-Assay oder mittels Durchflusszytometrie (Dihydrorhodamin 123 wird durch ROS zu Rhodamin reduziert; DHR-Assay) ermittelt werden. Die Stickoxide sollen durch das Griess-Reagenz-System nachgewiesen werden.

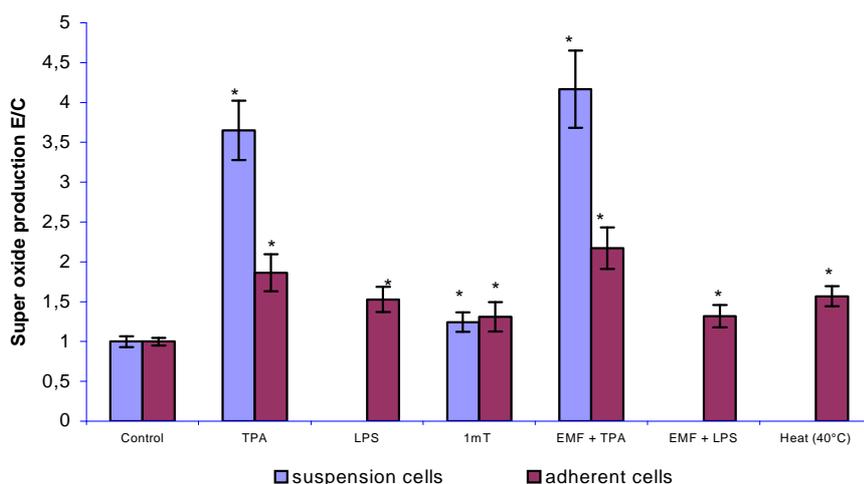
Die Maus-Knochenmarkszellen (Promonozyten) wurden wie die Makrophagen (Simkó et al., 2001) präpariert und sofort nach der Gewinnung für die Untersuchungen verwendet. Somit sind die Promonozyten primär gewonnene Suspensionszellen und können für die Durchflusszytometrie eingesetzt werden. Nach 1-6 Tagen erfolgt die Ausdifferenzierung der Zellen zu adhärent wachsenden Makrophagen (MBM-Zellen), die dann für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden. Zunächst wurde der Anteil der CD11b $\pm$ -Zellen in der isolierten Population bestimmt (Abb. 49), da das CD11b-Oberflächenantigen ein spezifischer Maus-Macrophagen-Marker ist. Nach Subtraktion der unspezifischen Bindungsstellen des Antikörpers (Abb. 49a) wurde die Größe der CD11b $\pm$ -Population direkt nach der Isolierung bestimmt (ca. 20-30%, Abb. 49b).

Die nach 1-6 Tagen ausdifferenzierten und adhärennten MBM-Zellen sowie die sich in Suspension befindenden Promonozyten wurden wie die humanen Monocyten/Macrophagen für 45min mit 1mT EMF, 1 $\mu$ M TPA, 1 $\mu$ g/ml LPS oder 40°C sowie in Kombinationen exponiert und die Bildung von Superoxid-Radikalen mit Hilfe des NBT-Assays bestimmt. Wie die Abbildung 49 zeigt induziert 1mT EMF sowohl in den MBM- als auch in den Promonozyten die 1,3fache Erhöhung der Superoxid-Produktion, während TPA in den frisch präparierten Promonozyten eine stärkere Aktivierung (3,7fach) induziert als in den MBM-Zellen (1,9fach). Interessant ist, daß die LPS- bzw. die Hitzebehandlung ähnliche Werte erreichen wie EMF. Die Koexpositionen induzieren keine zusätzlichen Effekte.



**Abb. 49:** Durchflusszytometrische Bestimmung der CD11b<sup>+</sup>-Zellen (mausspezifischer Makrophagen-Marker) direkt nach der Präparation in der Gesamtpopulation der Knochenmarkszellen aus der Maus. a) Gesamtpopulation der Zellen, wobei rot markiert die Maus-Makrophagen (23%) dargestellt sind b) spezifische und unspezifische Bindungsstellen des CD11b-Antikörpers.

Für die vergleichende Analyse wurde ebenfalls die Gesamtmenge an ROS-Produktion in den in Suspension gehaltenen Promonozyten bestimmt (Abb. 51). Hierbei bestätigt sich das gleiche Ergebnis wie bei den Monocyten/Macrophagen nämlich, daß die Gesamtmenge an ROS nach EMF-Exposition signifikant auf das 1,2fache ansteigt, während nach TPA-Behandlung der Aktivierungsgrad der Zellen ROS zu produzieren, bis auf das 44fache zu steigern ist. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die zellaktivierende Kapazität elektromagnetischer Felder, durch die spezifische Regulation von Wirkmechanismen, Superoxide zu generieren.



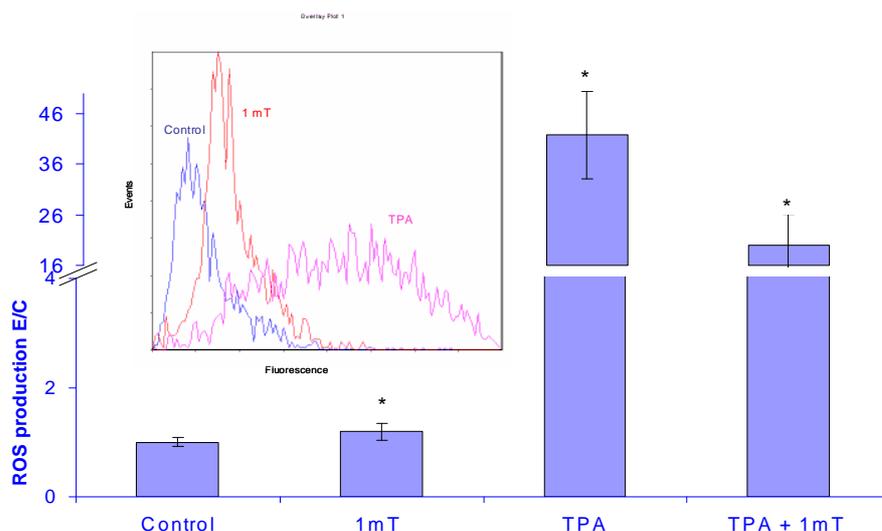
**Abb. 50:** Superoxid-Produktion (NBT-Assay) in Promonozyten (blau) und in adhärennten (rot) MBM-Zellen nach Behandlung mit 1mT EMF, 1µM TPA, EMF/TPA, 1µg/ml LPS, EMF/LPS für 45min und 40°C. Dargestellt sind die Verhältnisse (E/C) zu den entsprechenden Kontrollen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens 5 unabhängigen Experimenten und die Fehlerindikatoren die Konfidenzintervalle. \*: p < 0,01

Die Untersuchungen zur Feldstärkenabhängigkeit der ROS-Produktion wurden mit Expositionen von 50, 100, 500 und 1000µT an Mausmakrophagen durchgeführt. Wie die Abbildung 51 zeigt, konnte bereits nach 50µT Exposition (45min) eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion nachgewiesen werden. Diese steigerte sich bis zur 500µT signifikant. Da die Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionen nicht signifikant sind, aber die Werte der mit 1000µT exponierten Zellen geringere Standardabweichungen aufzeigen, wurden alle weitergehenden Untersuchungen mit 1000µT durchgeführt.

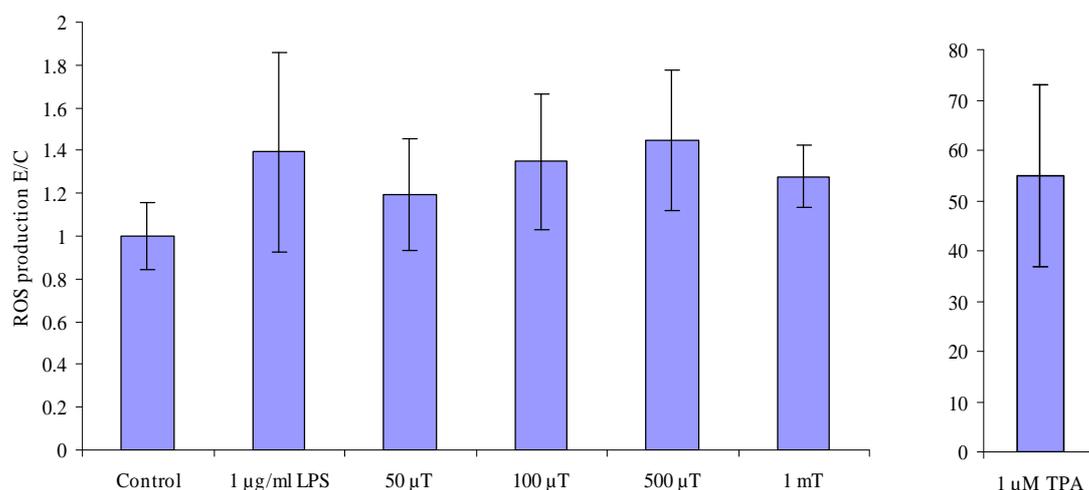
Mikrokern-Test: Die Anzahl der Mikrokerne wurde in Mausmakrophagen nach Exposition mit 1mT nach 12, 24 und 48 Stunden mikroskopisch bestimmt (Tabelle 1). Die Daten lassen erkennen, daß die Anzahl der Mikrokerne und auch der Mitosen in den Kontrollen bereits signifikant ansteigt. Die Anzahl der Mikrokerne und Mitosen in den exponierten Zellen ist zwar leicht angestiegen, diese sind jedoch statistisch nicht signifikant zu den Kontrollen. Da die Anzahl der Mikrokerne in den Kontrollen bereits angestiegen ist, ist die Aussagekraft dieses Ansatzes nicht eindeutig.

**Tab. 10: Anzahl der Mikrokerne und Mitosen in Mausmakrophagen nach 12, 24 und 48 Stunden Exposition mit 1mT. Zu jedem Zeitpunkt wurden 6000 Zellen ausgewertet.**

	Micronucleus formation		Mitosis	
	Kontrolle	1mT	Kontrolle	1mT
12 h	19.3 ± 10.3	22.2 ± 7.5	7.3 ± 2.7	6.2 ± 4.2
24 h	34.5 ± 7.6	33.8 ± 13.5	11.8 ± 3.3	10.3 ± 3.7
48 h	51 ± 15.4	64.3 ± 12.9	13.5 ± 3.7	11.7 ± 3.1



**Abb. 51** Gesamt-ROS-Produktion (DHR-Assay) in Promonozyten nach Behandlung mit 1mT EMF, 1 $\mu$ M TPA und EMF/TPA für 45min. Dargestellt sind die Verhältnisse (E/C) zu den entsprechenden Kontrollen. Im durchflusszytometrischen Histogramm (oben) ist die Verschiebung der Fluoreszenzmaxima des durch ROS oxidierten DHR zu Rhodamin dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens 5 unabhängigen Experimenten und die Fehlerindikatoren die Konfidenzintervalle. \*: p < 0,01



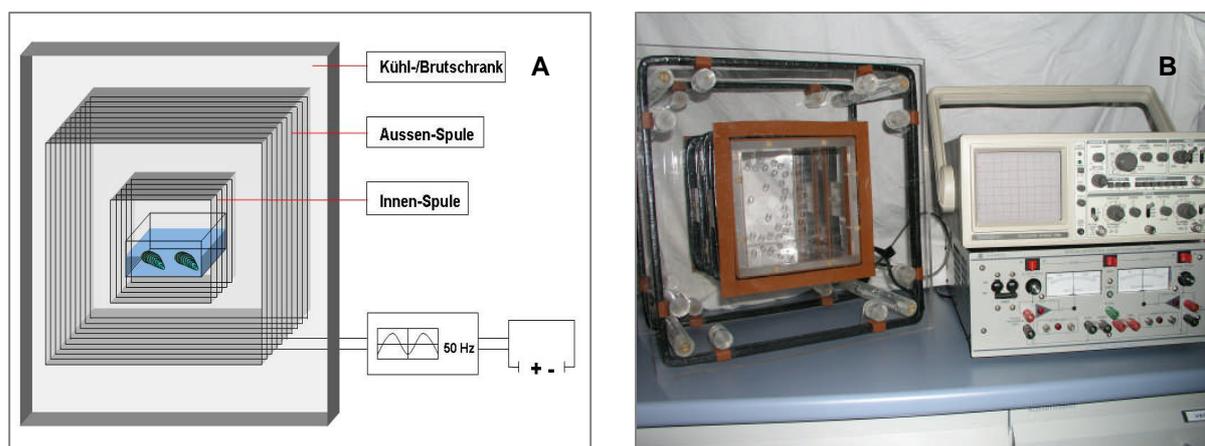
**Abb. 52:** Gesamt-ROS-Produktion (DHR-Assay) in Promonozyten nach Behandlung mit 50, 100, 500 und 1000 $\mu$ T EMF, 1 $\mu$ M TPA und EMF/TPA für 45min. Dargestellt sind die Verhältnisse (E/C) zu den entsprechenden Kontrollen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten und die Fehlerindikatoren die Konfidenzintervalle. \*: p < 0,01

## 6.3 50Hz-EMF-Exposition von Miesmuscheln

### 6.3.1 Versuchsanlage und Expositionsbedingungen

Für die Exposition von Miesmuscheln in einem Magnetfeld wurde eine Merritt-Spule verwendet, deren Spulensystem ein besonders homogenes Magnetfeld erzeugt (Merritt et al., 1983). Die vier inneren Spulen umschlossen eine rechteckige Expositions-kammer mit einem Volumen von 15x15x25cm. Zwei Spulen bildeten das äußere Spulensystem (Abb. 52).

Zur Erzeugung sinusförmiger magnetischer Wechselfelder [MF] wurde eine regelbare Stromquelle (KEPCO Inc., NY, USA) in Verbindung mit einem Oszillographen (LG Precision Co., Korea) verwendet. Die Frequenz betrug konstant 50Hz., während die magnetische Feldstärke durch Regeln der Amplitudestärke verändert wurde. Mit Hilfe eines Tesla-Meters (Bell, Modell 4048, USA) ließ sich die gewünschte magnetische Feldstärke im Innern der Expositions-kammer einstellen.



**Abb. 53:** Anlage zur Exposition von Miesmuscheln in einem 50Hz-Magnetfeld.  
A: Schematischer Aufbau der Merritt-Spule mit dem inneren und äußeren Spulensystem.  
B: Merritt-Spule mit Expositions-kammer sowie Stromquelle und Oszillograph.

### 6.3.2 Durchführung der Befeldung und methodisches Vorgehen

Die MF-Exposition von *Mytilus edulis* erfolgte immer an einzelnen Individuen (Ganzkörperbefeldung). Versuche an isolierten Zellen wurden nicht durchgeführt. Während der Dauer der Exposition befanden sich die Muscheln in einer mit Seewasser gefüllten Kunststoffschale. Das Wasser stammte aus dem Becken, in dem die Tiere zuvor gehältert worden waren. Die Schale wurde so in der Expositions-kammer positioniert, dass die Muscheln ungefähr auf mittlerer Höhe der Kammer lagen. Es wurden Kurzzeit- und Langzeitexpositionen vorgenommen.

Bei den Kurzzeitexpositionen wurden die Muscheln 1h mit höheren Magnetfeldstärken von 400 bis 1000 $\mu$ T befeldet. In der Schale befanden sich zwischen 5 und 11 Tiere in ca. 500ml Wasser, das aufgrund der kurzen Expositionsdauer nicht belüftet wurde. Nach der Exposition wurden die Tiere bis zum darauf folgenden Tag weiter gehältert, da sich ein potenzieller MF-Effekt in der Regel nicht sofort nach Beendigung der Exposition manifestiert hat. Die Kontrolltiere wurden bei abgeschalteter MF-Quelle ebenfalls für 1h in der Expositions-kammer der Spule gehältert. Die Kurzzeitexpositionen wurden zur Ermittlung von Schwellenwerten für Biomarkerreaktionen durchgeführt.

Bei den Langzeitexpositionen wurden Miesmuscheln 16h mit schwächeren Magnetfeldstärken von 100 bis 300 $\mu$ T befeldet. Die maximal 8 Tiere befanden sich in 1,5l Wasser, dem mit Hilfe einer Aquarienpumpe Luft zugeführt wurde. Nach Ende der Exposition erfolgte sofort die Hämolymphentnahme bzw. Sektion der Tiere für die Biomarker-Untersuchungen. Zeitlich parallel zur MF-Exposition wurde die Kontrollgruppe ebenfalls im selben Volumen belüftetem Seewasser für 16h gehältert.

Bei allen Versuchsansätzen wurde darauf geachtet, dass die MF-exponierten Tiere und die Kontrolle der gleichen Wassertemperatur ausgesetzt waren und sich die Temperatur im Verlauf der Exposition nicht veränderte. Die Wassertemperatur während der Befeldung entsprach der Temperatur des Hälterungsbeckens, aus dem die Tiere für den Versuch entnommen wurden.

### **6.3.3 Zur Konzeption und Methodik der EMF-Versuche**

Die für die EMF-Befeldung verwendeten Miesmuscheln waren nach der Probenahme für maximal vier Tage in künstlichem Seewasser gehältert worden, bevor sie für die EMF-Exposition verwendet wurden. Die Muscheln wurden in einer mit Wasser aus dem Hälterungsbecken gefüllten Kunststoffschale (Polypropylen) in der Expositions-kammer der Merrit-Spule befeldet. Die Exposition erfolgte in Wasser, um einerseits möglichen Stress durch das Trockenliegen der Muscheln zu vermeiden und andererseits den Bedingungen im Meer zu entsprechen.

Die Befeldungen wurden mit magnetischen Flussdichten im Bereich von 100 bis 1000 $\mu$ T durchgeführt. Zur Ermittlung von Schwellenwerten erfolgten kurzzeitige Expositionen von 1h bei unterschiedlichen Magnetfeldern. Bei diesen Versuchen wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Muscheln immer die gleiche Dauer der Zwischenhälterung erfahren hatten, da die Hälterungsdauer auch einen Effekt auf die zu untersuchenden Biomarker (z.B. Expression von Stressprotein) ausüben kann. Diese Voraussetzung schränkte aber andererseits die Anzahl der in einem Versuchsansatz möglichen Befeldungen auf, da alle Expositionen innerhalb eines Tages hintereinander folgend durchgeführt werden mussten. Nach der Befeldung wurden die einzelnen Stichproben bis zum folgenden Tag wieder in das Hälterungsbecken gegeben. Diese Zeitspanne wurde benötigt, damit Biomarker (z.B. Induktion von Hsp70) gegebenenfalls eine Reaktion auf die MF-Exposition entwickeln konnten.

Außer kurzzeitigen MF-Expositionen wurden auch längerfristige Befeldungen von 16h bei einem relativ schwachen Magnetfeld von  $100\mu\text{T}$  durchgeführt. Bei diesen Expositionen wurde das Wasser, in dem sich die Muscheln befanden, mittels einer Aquariumpumpe belüftet. Am Ende einer derartigen Langzeitbefeldung wurden die Tiere sofort untersucht.

Wie Temperaturmessungen am Beginn und Ende der MF-Expositionen gezeigt hatten, trat weder bei 1h- und 16h-Befeldungen eine Erwärmung des Hälterungswassers auf. Dies war eine notwendige Voraussetzung, damit nicht bereits geringe Temperaturveränderungen einen Effekt auf die Expression des Stressproteins Hsp70 ausüben konnten.

Als Indikatorzellen für EMF-Effekte wurden die Hämocyten gewählt. Sie lassen sich leicht durch Entnahme von Hämolymphe gewinnen und stehen als Einzelzellen zur Untersuchung verschiedener biologischer Endpunkte zur Verfügung

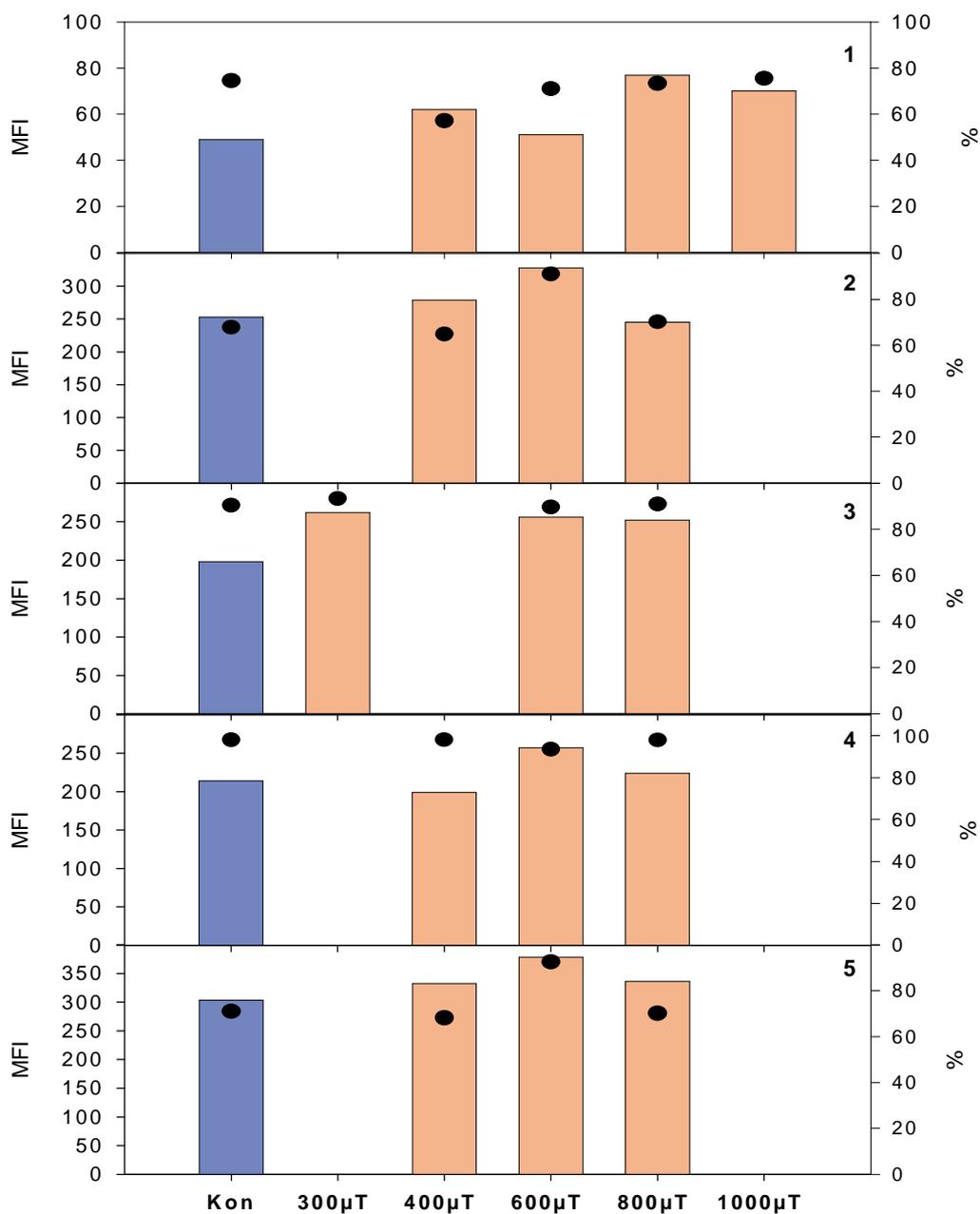
### **6.3.4 Ergebnisse und Diskussion**

#### *6.3.4.1 Expression von Hsp70 nach kurzzeitiger Magnetfeld-Exposition*

Mit der Durchführung von kurzzeitigen MF-Expositionen (1h) wurde untersucht, bei welcher MF-Stärke eine veränderte Hsp70-Expression von Hämocyten im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. Die verwendeten magnetischen Flussdichten lagen im Bereich von  $300\mu\text{T}$  bis  $1000\mu\text{T}$ .

Das Resultat von fünf Versuchen ist in Abbildung 54 dargestellt. In allen Versuchen wurde eine Zunahme der Hsp70-Expression im Vergleich zur Kontrolle am Tag nach der Exposition ermittelt. Bei einem Versuch (3) trat die erhöhte Hsp70-Expression bereits bei einer Befeldung mit  $300\mu\text{T}$  ein und blieb dann bei höheren MF-Stärken auf diesem Niveau. Die anderen Versuche zeigten erst bei  $600\mu\text{T}$  oder  $800\mu\text{T}$  einen deutlicheren Unterschied zur Kontrolle. Bei vier Versuchsansätze wurde bei der stärksten Befeldung ( $800\mu\text{T}$ ,  $1000\mu\text{T}$ ) eine leichte Abnahme der Hsp70-Expression im Vergleich zur nächst geringeren MF-Stärke beobachtet.

Der Anteil Hsp70-positiver Zellen war bei den Kontrollen und exponierten Muscheln allgemein hoch. Bei zwei Versuchen (2, 5) trat bei der stärksten Stressreaktion ( $600\mu\text{T}$ ) gleichzeitig der höchste Prozentsatz Hsp70-positiver Hämocyten auf.



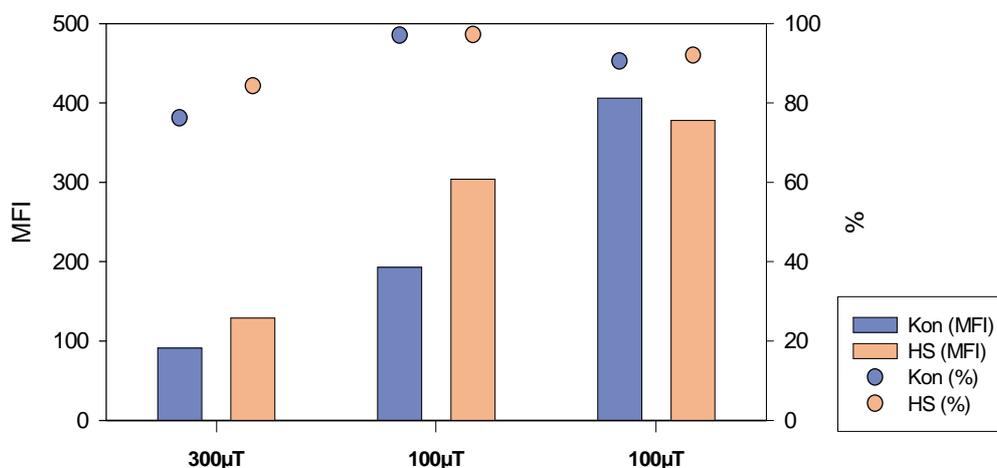
**Abb. 54:** Expression des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten nach kurzzeitiger (1h) Befeldung von Miesmuscheln mit Magnetfeldern verschiedener Flussdichten (300µT–1000µT). Die Grafik zeigt die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren die Intensität der Hsp70-Expression (MFI), die schwarzen Punkte repräsentieren den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen.

#### 6.3.4.2 Expression von Hsp70 nach längerer Magnetfeld-Exposition

Nachdem nachgewiesen worden war, dass eine kurzzeitige Befeldung mit einem starken MF einen Effekt auf die Hsp70-Expression von Hämocyten ausübt, wurde geprüft, ob geringere Feldstärken, bei längerer Expositionsdauer, ebenfalls eine Änderung der Hsp70-Expression bewirken.

Wie bereits erwähnt, wurde die Expositionsdauer auf 16h begrenzt, um einer möglichen Induktion von Stressprotein durch die beengten Hälterungsbedingungen in der Expositions-kammer der Spule vorzubeugen. Außerdem sollte eine Erwärmung des Hälterungswassers durch eine zu lange Expositionsdauer vermieden werden.

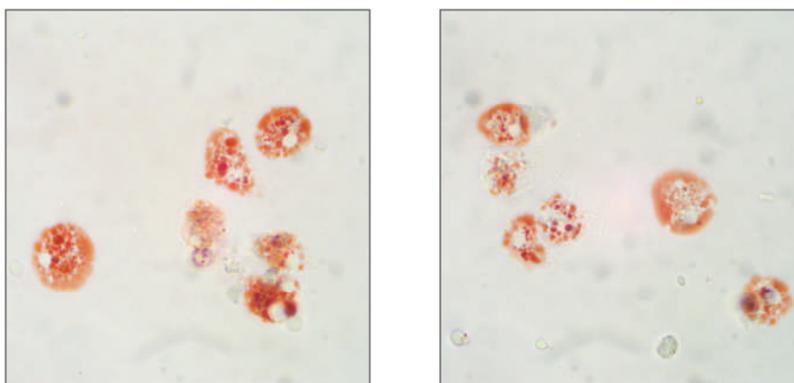
In Abbildung 55 ist das Ergebnis einer Befeldung mit 300 $\mu$ T und zweier Expositionen bei 100 $\mu$ T dargestellt. Bei der 300 $\mu$ T- und einer der beiden 100 $\mu$ T-Befeldungen wurde eine erhöhte Hsp70-Expression der Hämocyten am Ende der 16h-Exposition gemessen. Bei den einzelnen Versuchen wiesen Kontrollen und exponierte Tiere einen ähnlichen Anteil an Hsp70-positiven Zellen auf. Er lag immer im Bereich von 80% bis fast 100%.



**Abb. 55:** Expression des Stressproteins Hsp70 in Hämocyten nach längerer (16h) Befeldung von Miesmuscheln mit Magnetfeldern geringerer Flussdichten (300 $\mu$ T, 100 $\mu$ T). Die Grafik zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Die Balken repräsentieren die Intensität der Hsp70-Expression (MFI), die Punkte repräsentieren den Prozentsatz Hsp70-positiver Zellen.

### 6.3.5 Stabilität der lysosomalen Membran

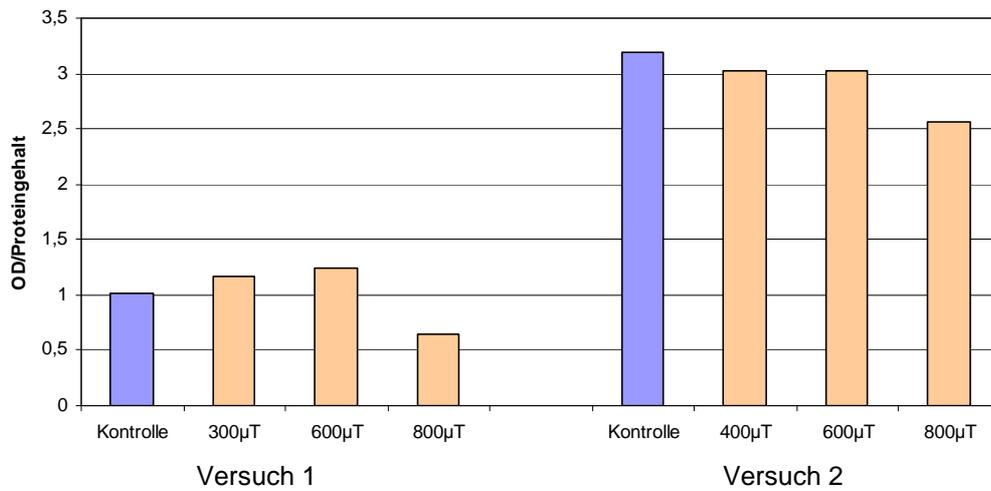
Neben der Expression von Hsp70 wurde als weiterer Biomarker die Membranintegrität von Lysosomen mit Hilfe des Neutralrot-Retentions-Assays (NRR-Assay) untersucht. Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der in den Lysosomen lebender Zellen akkumuliert (Abb. 56). Zellen mit einer Schädigung der Lysosomenmembran können den Farbstoff während einer Rücklösung weniger effektiv zurückhalten als ungeschädigte Zellen. Das am Versuchsende in den Zellen vorhandene Neutralrot lässt sich, nachdem die Zellen lysiert wurden, mit einem Fotometer quantifizieren.



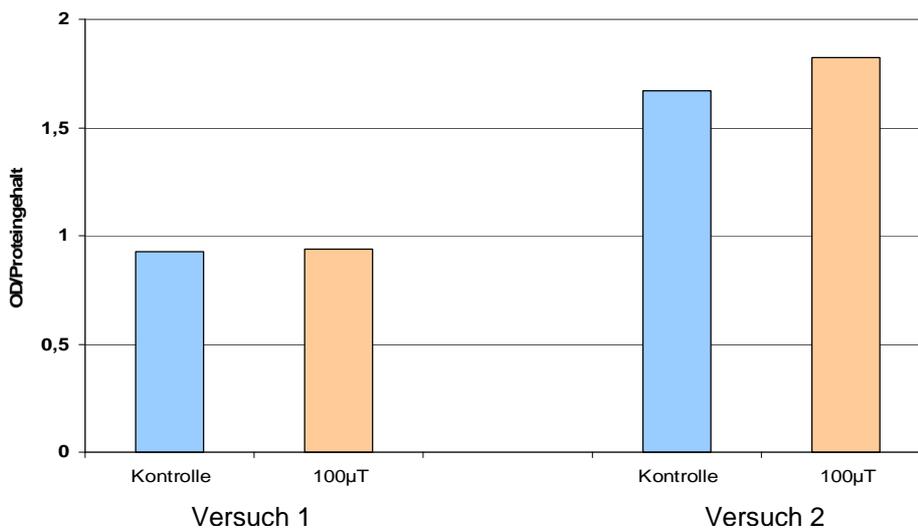
**Abb. 56:** Adhärente Hämocyten nach Inkubation mit dem Farbstoff Neutralrot. Neutralrot reichert sich in den Lysosomen der Hämocyten an.

Nach einer Kurzzeitbefeldung (1h) von Miesmuscheln wurde der NRR-Assay am darauf folgenden Tag an Sammelproben von Hämocyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass magnetische Flussdichten bis zu  $600\mu\text{T}$  zu keiner Beeinträchtigung der Neutralrot-Retention führten. Erst bei  $800\mu\text{T}$  trat eine Abnahme der NRR im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 57).

Wurde die magnetische Flussdichte auf  $100\mu\text{T}$  herabgesetzt und die Dauer der Exposition auf 16h erhöht, wurde keine wesentliche Abnahme der NRR beobachtet (Abb. 58).



**Abb. 57:** Neutralrotretention von Hämocyten nach Exposition mit unterschiedlich starken Magnetfeldern.

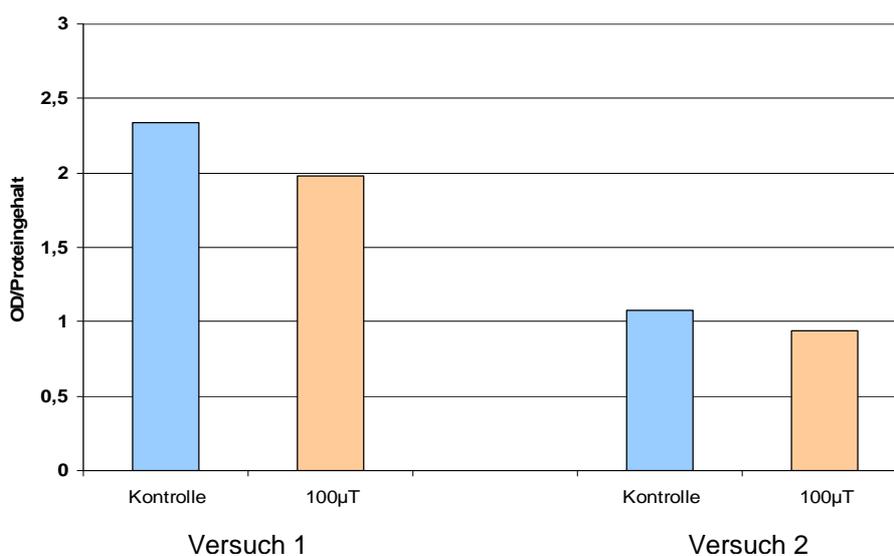


**Abb. 58:** Neutralrotretention von Hämocyten nach 16h-Befeldung mit einem Magnetfeld von 100 μT.

### 6.3.6 Phagozytose-Aktivität von Hämocyten

Die Fähigkeit von Hämocyten zur Phagozytose von mikrobiellen Krankheitserregern und Fremdpartikeln zählt zu den Haupteffektorfunktionen des Abwehrsystems wirbelloser Organismen. Funktionstests zur Ermittlung der Phagozytoseaktivität werden deshalb häufig zur Erfassung von Stresseffekten eingesetzt. In der vorliegenden Studie wurden Hämocyten mit Neutralrot-gefärbten Hefezellen inkubiert. Je nach Aktivität hatten die Hämocyten mehr oder weniger NR-Hefe phagozytiert. Nach Abschluss der Phagozytose wurde das mit der Hefe in die Zellen aufgenommene Neutralrot gelöst und die Extinktion mit einem Fotometer gemessen.

Die Phagozytoseversuche erfolgten nach einer 16h-Langzeitbefeldung von Miesmuscheln bei einer magnetischen Flussdichte von  $100\mu\text{T}$ . In Abbildung 59 ist das Ergebnis zweier unabhängiger Versuche grafisch dargestellt. Bei Versuch 1 war die Aktivität der Phagozytose nach der Befeldung im Vergleich zur Kontrolle verringert. Beim zweiten Versuch wurde nur eine geringe Abnahme der Phagozytoseaktivität beobachtet.



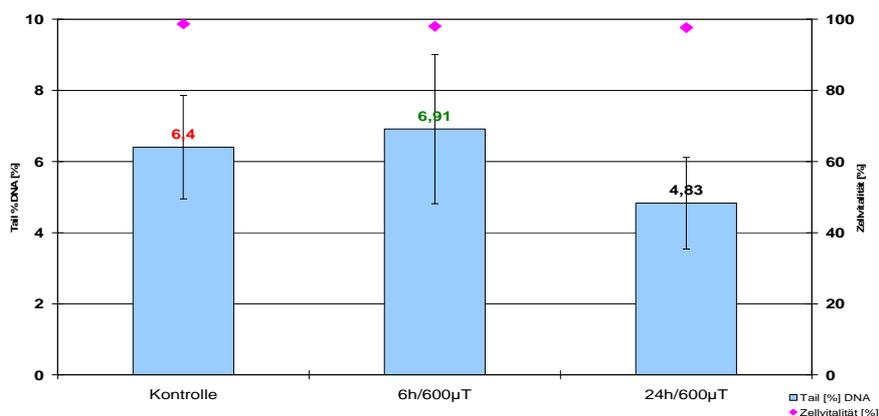
**Abb. 59:** Phagozytose-Aktivität von Hämocyten nach 16h-Befeldung mit einem Magnetfeld von  $100\mu\text{T}$ . Bei Versuch 1 war Aktivität nach Befeldung erniedrigt.

### 6.3.7 Comet-Assay

Verschiedene Befunde von *in vitro*-Versuchen lassen vermuten, dass 50Hz-EMF indirekt zur Entstehung von gentoxischen Schäden wie DNA-Strangbrüchen oder chromosomalen Anomalien führen können. Dabei stehen insbesondere die durch eine EMF verursachte Bildung freier Radikale im Verdacht, eine Schädigung der DNA zu verursachen (Simkó & Mattsson, 2004).

Als Beispiel einer starken MF-Exposition wurden Miesmuscheln für 6h und 24h einer Befeldung mit  $600\mu\text{T}$  ausgesetzt. Jeweils am Ende der Exposition wurde die Hämolymphe abgenommen und der Comet-Assay durchgeführt. Nach der 6h-Befeldung wiesen Hämocyten exponierter Miesmuscheln eine geringfügige, nicht signifikante, Zunahme von DNA-Strangbrüchen (Tail%DNA) auf. Eine längere Befeldung von 24h führte zu einer Abnahme der DNA-Schädigung im Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 60).

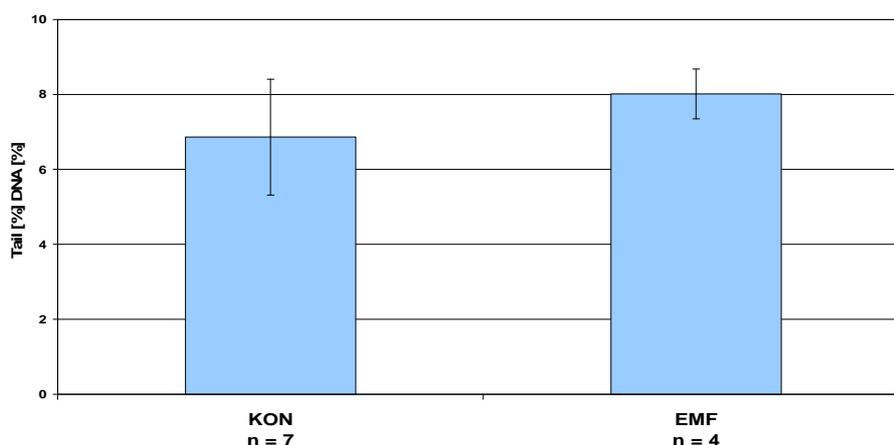
Das geringere Ausmaß an DNA-Läsionen nach einer längeren Exposition erscheint zunächst überraschend. Es ist aber bekannt, dass die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Stressfaktoren auch Mechanismen des DNA-Reparatursystems aktiviert werden. Die schnelle Reparatur der Läsionen kann dazu führen, dass mit dem Comet-Assay, trotz starker Exposition, eine relativ geringe DNA-Schädigung nachgewiesen wird.



**Abb. 60:** DNA-Schädigung (Tail%DNA) von Hämocyten nach 6h und 24h Befeldung mit einem MF von  $600\mu\text{T}$

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Miesmuscheln drei Mal für jeweils 1,5h mit einem Magnetfeld schwacher Flussdichte ( $100\mu\text{T}$ ) befeldet. Zwischen den einzelnen Expositionen befanden sich die Tiere für jeweils 1,5h im Hälterungsbecken. Am folgenden Tag wurde der Comet-Assay durchgeführt.

Die Auswertung des Tests ergab eine geringe Zunahme der DNA-Schädigung bei den Hämocyten der exponierten Tiere. Ein signifikanter Unterschied lag aber nicht vor (Abb. 61).



**Abb.61:** DNA-Schädigung von Hämocyten nach mehrmaliger, kurzzeitiger Befeldung (3 x 1,5h) mit einem MF von 100 $\mu$ T

Insgesamt betrachtet haben die EMF-Expositionsversuche mit Miesmuschel gezeigt, dass kurzzeitige Befeldungen (1h) bei gleichzeitig höheren magnetischen Flussdichten eine gegenüber Kontrolltieren veränderte Expression des Stressproteins Hsp70 in den Immunzellen auslöste. Eine erhöhte Stressreaktion trat vorwiegend bei einem MF von 600/800 $\mu$ T auf. Bei einer stärkeren Befeldung deutete sich eine Abnahme der Hsp70-Expression an. Eine Veränderung der Lysosomenmembran (NRR-Test) wurde ebenfalls erst bei einem stärkeren MF von 800 $\mu$ T beobachtet.

Die Ergebnisse der 16h-Befeldungen deuten darauf hin, dass auch schwächere MF bei längerer Exposition eine Stressreaktion der Hämocyten hervorrufen könnte.

Wie einleitend zum Teilprojekt erwähnt, haben Malagoni et al. (2004) ebenfalls eine Induktion von Stressproteinen (Hsp70, Hsp90) in Hämocyten der Muschel *Mytilus galloprovincialis* nach Exposition in einem 50Hz-EMF gefunden. Interessanterweise trat eine deutliche Stressreaktion, wie bei den vorliegenden Versuchen, erst bei einer stärkeren magnetischen Flussdichte von 600 $\mu$ T auf. Dieser Effekt wurde bereits bei einer 30-minütigen Befeldung ermittelt. Ein anderer biologischer Endpunkt, die Fähigkeit der Hämocyten auf einen chemotaktischen Reiz mit einer Formveränderung zu reagieren, wurde ebenfalls erst bei stärkeren MF von 400/600 $\mu$ T beeinflusst (Malagoni et al., 2003).

Wie im Falle eines starken und/oder lang anhaltenden Hitzestress kann die zelluläre Schutzkapazität der Stressreaktion auf durch anhaltenden EMF-Stress überfordert werden. Di Carlo et al. (2002) ermittelten nach einer mehrtägigen Befeldung von Hühnerembryonen mit einem 60Hz-EMF(8 $\mu$ T) eine Abnahme der Hsp70-Expression. Möglicherweise ist die sich abzeichnende Verringerung der Hsp70-Expression von Hämocyten bei starker MF-Befeldung ein Anzeichen für einen erhöhten Verbrauch von Hsp70 als Folge einer zellulären Schädigung.

## 7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit der Errichtung von Offshore-Windparks in Nord- und Ostsee wird eine umfangreiche Verlegung von Hochspannungsseekabeln zum parkinternen Stromtransport sowie zur Anbindung an das Festlandnetz notwendig. Angesichts der großen Anzahl an projektierten Windkraftanlagen ist ein beträchtlicher Anteil des Meeresbodens von diesem Eingriff betroffen. Derzeit ist so gut wie unbekannt, ob der Betrieb der im Sediment verlegten Stromkabel nachteilige Wirkungen auf die im und auf dem Meeresbodens lebende benthische Fauna ausübt.

Um erste Erkenntnisse über potenzielle biologische Wirkungen von stromführenden Seekabeln auf das marine Zoobenthos zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Studie Laborversuche mit ausgewählten marinen wirbellosen Organismen durchgeführt. Die Tiere wurden einem thermischen Stress oder einem niederfrequenten 50Hz-EMF ausgesetzt und dann anhand von Biomarkern untersucht, ob Effekte auf der zellulären Ebene eintreten. Bei Biomarkern handelt es sich um biologische Endpunkte, die im Rahmen des Umweltmonitorings und der Risikoanalyse als diagnostische Indikatoren für Umweltstress eingesetzt werden.

Außer den Laborversuchen wurden begleitend Feldmessungen zur Meeresbodenerwärmung in einem Windpark durchgeführt.

Das gesamte Projekt lässt sich in folgende Teilprojekte gliedern:

- In einem Offshore-Windpark (Nysted, Dänemark) wurden erfolgreich Feldmessungen im Bereich der dort verlegten Seekabel durchgeführt, um erstmalig konkrete Daten zur Seebodenerwärmung unter realistischen Betriebsbedingungen zu erhalten.
- Im Labor wurde unter speziellen Expositionsbedingungen die Wirkung von thermischem Stress auf benthische Invertebraten untersucht. Am Beispiel der epibenthischen Miesmuschel (*Mytilus edulis*) wurden die Reaktionen mehrerer biologischer Endpunkte (Biomarker) nach Exposition auf einem erwärmten Sedimentboden ermittelt. Außerdem erfolgte an zwei Organismen der benthischen Infauna, dem Schlickkrebis *Corophium volutator* und Borstenwurm *Marenzelleria neglecta* eine Untersuchung des Migrationsverhaltens unter dem Einfluss eines Temperaturgradienten.
- In weiteren Laborversuchen wurden Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) 50Hz-Magnetfeldern unterschiedlicher Feldstärke und Dauer ausgesetzt und anhand verschiedener Biomarker die Wirkung auf die Immunzellen (Hämocyten) der Muschel untersucht. In Kooperation mit der Universität Rostock (Fachbereich Biologie) wurden begleitende Untersuchungen zur Wirkung von 50Hz-Magnetfeldern auf Immunfunktionen von Makrophagen der Maus durchgeführt.

Die Ergebnisse der einzelnen Teilprojekte lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

*Feldmessungen der Meeresbodentemperatur im Bereich von Seekabeln in einem Offshore-Windpark*

Im Offshore-Windpark Nysted Havmøllepark vor der Küste Lollands (Dänemark) wurden im Bereich der dort verlegten Seekabel erfolgreich Messungen der Sedimenttemperatur vorgenommen. Die Temperaturen wurden mit zwei Messsystemen, jeweils ausgestattet mit 64 Temperatursensoren, direkt senkrecht über den elektrischen Kabeln und 30cm seitlich davon versetzt ermittelt. Die Messungen wurden an beiden Kabeltypen in der Nähe zur Plattform und außerdem an einer Referenzstation abseits der Kabel durchgeführt. Für die Dauer von einem Jahr wurden die Temperaturen im Minutentakt für jeden Sensor aufgezeichnet. Die wichtigsten Ergebnisse der Messungen waren folgende:

- Nachgewiesen wurde ein statistisch enger Zusammenhang zwischen Sediment- und Wassertemperatur.
- Die Sedimenttemperatur war, wenn auch in geringerem Maße, auch vom Lastzustand (also Wärmeproduktion am Kabel) beeinflusst. Der Zusammenhang war abhängig von der Jahreszeit.
- Direkt über dem Kabel wurden höhere Temperaturen gemessen als seitlich versetzt in einem Abstand von 30cm. Die Unterschiede waren jedoch gering. Am 132-kV-Kabel betrug die Differenz der Mediane 0,3K und am 33-kV-Kabel lediglich 0,037K.
- Eine positive partielle Korrelation zwischen Stromstärke und Sedimenttemperatur zeigte sich nur bis zu einer Entfernung von 20cm vom Kabel, d.h. bis zu einer Sedimenttiefe von maximal 30cm unterhalb der Sedimentoberfläche.
- In nur einem Prozent des Beobachtungszeitraumes lag die Temperatur in den oberen Sedimentschichten oberhalb der 2K-Vorgabe des Bundesamtes für Naturschutz.
- Die mittels Modellierung vorausgesagten Sedimenttemperaturen für verschiedene Windparkprojekte in Nord- und Ostsee wurden im Windpark Nysted im Untersuchungszeitraum nicht im vergleichbaren Rahmen erreicht.
- Die Bedingungen unter denen die Feldmessungen realisiert wurden, sind unbedingt bei einer Verallgemeinerung der Messergebnisse im Hinblick auf andere Windparks zu berücksichtigen (z.B. Sedimentverhältnisse, Einbautiefe, Leistung des Windparks).

### *Wirkungen von thermischem Stress auf marine benthische Invertebraten*

Für diese Laborversuche wurden spezielle Hälterungsbecken konstruiert, die es mit Hilfe regulierbarer Heizkabel ermöglichten, das Bodensediment auf einer Hälfte des Beckens zu erwärmen. Um die Erwärmung des gesamten Beckens zu verhindern, wurde das Hälterungswasser mittels einer an ein Kühlaggregat angeschlossenen Kühlschlange gekühlt. Für die notwendige Wasserzirkulation sorgte ein Filter. Mit dieser Konstruktion sollten Expositionsbedingungen, wie sie möglicherweise im Freiland auftreten, im Labormaßstab simuliert werden. Ein besonderer Vorteil dieser Versuchsanlage war die gemeinsame Hälterung von exponierten Muscheln auf dem erwärmten Sedimentboden und der Kontrollgruppe im nicht erwärmten Teil des Beckens. Auf diese Weise wurde ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Wasserqualitäten auf die Reaktion der untersuchten Biomarker ausgeschlossen.

### *Biomarker-Untersuchungen zu Wirkungen von thermischem Stress auf die Miesmuschel*

Nach anfänglichen Versuchen mit starkem Temperaturstress ( $\Delta T \approx 10\text{K}$ ) wurden hauptsächlich Expositionen auf einem gering erwärmten Sedimentboden ( $\Delta T = 2\text{-}3\text{K}$ ) durchgeführt, da die dabei erzielten Befunde von größerer Relevanz in Bezug auf die Freilandsituation sind. Dass dort allenfalls eine geringe Temperaturerhöhung des Sediments an der Oberfläche zu erwarten ist, hatten die im vorliegenden Projekt unternommenen Messungen in einem Windpark gezeigt (1. Teilprojekt).

Nach der Exposition von Miesmuscheln auf schwach erwärmtem Bodensediment wurde die Aktivierung der zellulären Stressreaktion, am Beispiel der Expression des Stressproteins Hsp70, in den Hämocyten (Immunzellen) mit Hilfe der Durchflusszytometrie und im Kiemen- gewebe mittels Immunoblot untersucht.

Im Verlauf einer maximal 10-tägigen Expositionszeit wurden zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten mehr oder weniger auffällige Unterschiede der Expression des Stressproteins in Hämocyten und Kieme im Vergleich zu Kontrollproben gefunden. Für die Variabilität der Befunde sind wahrscheinlich saisonale Einflussfaktoren verantwortlich, welche die zelluläre Stressreaktion der Miesmuschel beeinflussten. Im Verlauf einer thermischen Belastung kam es nicht zu einem stetigen Anstieg der Hsp70-Expression, vielmehr folgte auf einen Anstieg gelegentlich auch wieder eine Abnahme. Vermutlich ist diese Kinetik auf einen Verbrauch von Hsp70 infolge des nach einem Temperaturstress einsetzenden zellulären Reparaturmechanismus, an denen Hsp70 maßgeblich beteiligt ist, zurückzuführen.

Als weitere Biomarker für den Nachweis von oxidativem Stress wurden die Lipidperoxidation und der Metallothionein-Gehalt in der Mitteldarmdrüse der Miesmuschel bestimmt. Hinsichtlich der Lipidperoxidation wiesen die Proben eine starke Variabilität auf. Signifikante Unterschiede zwischen thermisch belasteten Tieren und Kontrolle wurden nicht ermittelt. Der Metallothionein-Gehalt wies bei exponierten Tieren lediglich eine nicht-signifikante tendenzielle Zunahme auf.

Die mögliche Induktion einer DNA-Schädigung (DNA-Strangbrüche) nach thermischer Belastung wurde mit Hilfe des Comet-Assays geprüft. Unter den verwendeten Expositionsbedingungen ließ sich kein Unterschied zwischen exponierten Miesmuscheln und Kontrolltieren feststellen.

Um das Auftreten von Veränderungen auf der Ebene von Organen zu prüfen, erfolgte eine histologische Befundung von Mitteldarmdrüse und Gonade am Ende einer 10-tägigen Exposition der Muscheln auf schwach erwärmtem Sediment. Dabei wurden keine auffälligen Unterschiede zwischen exponierten und nicht-exponierten Miesmuscheln beobachtet.

#### *Wirkungen von thermischem Stress auf das Migrationsverhalten benthischer Organismen*

Unter Laborbedingungen wurden mögliche Effekte eines Temperaturgradienten auf das Migrationsverhalten von zwei Vertretern der benthischen Infauna, dem Schlickkrebs *Corophium volutator* und den Borstenwurm *Marenzelleria neglecta* untersucht. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass *Marenzelleria neglecta*, ein röhrenbauender Polychaet, erwärmte Bereiche mied und aus ihnen abwanderte, während für den Schlickkrebs *Corophium volutator*, der hauptsächlich im Gezeitenbereich flache Röhren unter der Sedimentoberfläche baut und auch häufig außerhalb dieser anzutreffen ist, keine signifikanten Veränderungen der Besiedlung dokumentiert werden konnten. Durch die extremen und permanenten Temperaturen im Sediment wurden Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften des Substrates hervorgerufen.

#### *Untersuchungen zu Wirkungen von 50-Hz EMF*

In diesem Teilprojekt wurde die Wirkung eines 50Hz-EMF auf Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) untersucht. Die Befeldung der Tiere erfolgte in einer Merrit-Spule bei unterschiedlich starken magnetischen Flussdichten (100-1000 $\mu$ T) und verschiedenen Expositionszeiten (1h, 16h). Anhand verschiedener Biomarker wurde die Wirkung des EMF auf die Hämocyten (Immunzellen) der Muschel untersucht.

Wie bei den thermisch exponierten Muscheln wurde auch bei den EMF-Versuchen schwerpunktmäßig die Reaktion des Stressproteins Hsp70 betrachtet. Dabei erfolgte die Analyse der Hsp70-Expression wieder mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Wie die Versuche ergaben, führten Kurzzeitbefeldungen von 1h bei stärkeren magnetischen Flussdichten (ab ca. 400 $\mu$ T) zu einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Expression des Stressproteins Hsp70 am Tag nach der Befeldung. Bei zunehmend stärkeren MF (800-1000 $\mu$ T) wurde am Tag nach der Befeldung tendenziell eine Abnahme der Hsp70-Expression der Hämocyten beobachtet. Die Wirkung einer längeren Befeldung von 16h wurde bei MF-Expositionen im Bereich von 100-300 $\mu$ T geprüft. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei einem 100 $\mu$ T-Versuch eine stärkere Hsp70-Expression bei den Hämocyten befeldeter Tiere gemessen, im anderen Fall wurde kein Unterschied beobachtet.

Des Weiteren trat bei kurzzeitiger Befeldung (1h) mit 600-800 $\mu$ T auch ein Effekt bei den Lysosomen der Hämocyten auf. Mit dem verwendeten Neutralrot-Test wurde eine

verminderte Neutralrot-Retention ermittelt. Dieser Befund deutet auf eine Schwächung der lysosomalen Membran durch die MF-Exposition hin. Außerdem ergaben Phagozytose-Versuche einen Hinweis auf eine Suppression der Phagocytose-Aktivität nach kurzzeitiger Befeldung mit einem starken MF.

Begleitend zu den am IfAO durchgeführten EMF-Versuchen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Umweltphysiologie am Fachbereich Biologie der Universität Rostock Versuche zu Wirkungen von 50Hz-Magnetfeldern auf zelluläre Funktionen von Knochenmarksmakrophagen der Maus. Wie diese Versuche ergaben, führte ein 1000 $\mu$ T EMF zu einer Aktivierung der Superoxid-Produktion exponierter Makrophagen (NBT-Assay). Nach LPS- bzw. Hitzebehandlung erreichte die Superoxid-Produktion ähnliche Werte wie nach EMF. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde bereits bei einer Befeldung mit 50 $\mu$ T induziert.

Zusammenfassend betrachtet ist hervorzuheben, dass im Rahmen des vorliegenden Projektes erstmals Feldmessungen der Meeresbodentemperatur an den in einem Offshore-windpark verlegten Elektrokabeln durchgeführt wurden. Die dabei eingesetzte Technik der Temperaturmessung und Datenübertragung hatte sich bewährt und steht somit auch für Feldmessungen in anderen Windparks zur Verfügung. Aufgrund der baulichen und leistungsmäßigen Vielfalt der verwendeten Seekabel sollten weitere Feldmessungen erfolgen, damit zukünftig fundiertere und allgemeiner gültige Daten zur Meeresboden-erwärmung durch Elektrokabel zur Verfügung stehen.

Mit der Durchführung von Laborversuchen an marinen wirbellosen Organismen wurde ebenfalls Neuland betreten. Bei den Stressindikatoren handelte es sich zwar um etablierte Biomarker, die häufig im Rahmen eines biologischen Schadstoffeffektmonitorings zum Einsatz kommen, aber im Kontext einer Risikobewertung zu potenziellen Wirkungen von Elektrokabeln auf marine wirbellose Organismen wurde eine solche Biomarker-Auswahl bislang noch nicht eingesetzt. Insofern stellen die hier vorgelegten Ergebnisse erste Befunde dar, die dokumentieren, dass die gewählten Testorganismen auf zellulärer und Verhaltensebene auf einige der gewählten Stressbedingungen reagierten.

Der Stressproteingehalt von Zellen und Geweben gilt als guter Indikator des zellulären Belastungsstatus. Bezüglich der Induktion von Stressproteinen bei marinen Invertebraten gibt es einige Publikationen, die belegen, dass bei Muscheln bereits bei geringen Temperaturveränderungen die Expression des Stressproteins Hsp70 moduliert wird (Halpin et al., 2004; Helmuth & Hofmann, 2001; Hofmann & Somero, 1995). Diese Beobachtungen wurden aber alle an Muscheln gemacht, deren gesamter Körper wechselnden Wassertemperaturen ausgesetzt war. Die in der vorliegenden Studie durchgeführten Hälterungsversuche unter „simulierten Feldbedingungen“ zeigen erstmalig, dass auch eine Exposition auf schwach erwärmtem Sediment, bei gleichzeitig kühlem Umgebungswasser, einen Effekt auf die Expression von Hsp70 ausübt.

Für die Befeldungen von Miesmuscheln mit einem 50Hz-EMF wurden Magnetfeldstärken verwendet, die häufig im Rahmen von Laborversuchen mit Miesmuscheln (Gobba et al., 2003; Malagoni et al. 2003; 2004; 2006) oder Säugerzellen (Frahm, 2006; Lupke, 2006) eingesetzt wurden. Da unter Laborbedingungen nur relativ kurze Expositionszeiten möglich sind, mussten auch „unnatürlich“ hohe magnetische Flussdichten eingesetzt werden, um gegebenenfalls überhaupt eine Reaktion der Biomarker zu beobachten. Es ist aber zu vermuten, dass unter einer andauernden 50Hz-EMF-Exposition im Freiland bereits geringere MF-Stärken biologische Effekte hervorrufen können. Um sich einer realistischeren Situation anzunähern, müssten langfristige Befeldungen an Tieren in einem größeren Hälterungsbecken erfolgen. Derartige Versuche ließen sich dann auch mit einer thermischen Belastung koppeln, um somit auch mögliche kumulative Effekte (Alfieri et al., 2006; Junkersdorf et al., 2000) zu untersuchen.

Als Fazit der biologischen Untersuchungen kann festgestellt werden, dass die im Laborversuch durchgeführten Expositionen (geringe Sedimenterwärmung; starkes MF) bei der Miesmuschel auf zellulärer Ebene eine Stressreaktion ausgelöst haben. Unter den durchgeführten Expositionsbedingungen wurden aber kein genotoxischer Effekt (Comet-Assay) und keine histologische Veränderung an Mitteldarmdrüse und Gonade gefunden.

Auf Basis dieser ersten Biomarker-Befunde kann keine Aussage zur Relevanz der zellulären Stressreaktion für den Organismus getroffen werden. Um diesen Aspekt näher zu betrachten müssten kombinierte molekular- und zellbiologische sowie physiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei sollte der Einfluss störender Begleitvariablen (heterogenes Probenmaterial, saisonaler Einfluss) möglichst ausgeschlossen werden.

Insgesamt betrachtet stellen die hier durchgeführten Biomarker-Untersuchungen eine Grundlage für weitere Arbeiten unter Labor- und Feldbedingungen dar. Im Rahmen eines ersten Feldversuches könnte eine langfristige aktive Exposition von Miesmuscheln an einem Referenzort und oberhalb eines Elektrokabels erfolgen. Die wichtigen Begleitdaten zur konkreten Sedimenterwärmung und Wassertemperatur ließen sich dann mit dem in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzten Messsystem gewinnen.

Abschließend sei betont, dass eine Untersuchung von Stresseffekten auf der Ebene von Zellen, Organen und Individuen immer häufiger im Rahmen des Umweltmonitorings bzw. der Umweltrisikoaanalyse durchgeführt wird (Gercken & Sordyl, 2007; Handy et al., 2003; Hagger et al., 2006). Dies steht im Einklang mit Bestrebungen der EU, bei der Umweltbewertung bzw. dem Umweltmanagement einen holistischen, ökosystembasierten Ansatz zu verfolgen. Dabei spielt der Aspekt der „Ökosystemgesundheit“ (Ecosystem Health) eine zentrale Rolle für regulatorische und Managemententscheidungen (Apitz et al., 2006). In diesem Konzept stellen ökotoxikologische Parameter (Biomarker/Bioassays) ein wichtiges Bindeglied zwischen chemisch/physikalischen Daten und höheren Ebenen des Ökosystems dar. Internationale Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt (OSPAR, HELCOM) sehen bei der derzeitigen Novellierung ihrer Monitoringprogramme einen verstärkten Einsatz von Biomarkern zum Nachweis von anthropogenen Stresseffekten in Biota vor.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adams, S.M. [Hrsg.] (2002). Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 644 S.
- Adema, C.M., Van der Knaap, W.P.W. & Sminia, T. (1991) Molluscan Hemocyte-Mediated Cytotoxicity - the Role of Reactive Oxygen Intermediates. *Rev. Aquatic Sciences* 4: 201-223
- Ahmad, S. (1995) Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: Ahmad, S. (Hrsg.): *Oxidative stress and antioxidant defences in biology*. Chapman & Hall, S. 238–272
- Alfieri, R.R., Bonelli, M.A., Pedrazzi, G., Desenziani, S., Ghillani, M., Fumarola, C., Ghibelli, L., Borghetti, A.F. & Petronini, P.G. (2006) Increased levels of inducible hsp70 in cells exposed to electromagnetic fields. *Radiat. Res.* 165: 95-104
- Apitz, S.E., Elliot, M., Foutain, M. & Galloway, T.S. (2006) European environmental management: moving to an ecosystem approach. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2 (1): 80-85
- Baykan, U., Atli, G. & Canli, M. (2007) The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 33-38
- Bayne, B.L., Livingstone, D.R., Moore, M.N. & Widdows, J. (1976) A cytochemical and a biochemical index of stress in *Mytilus edulis* L. *Mar. Poll. Bull.* 7: 221-224
- Bayne, B.L., Holland, D.L., Moore, M.N., Lowe, D.M. & Widdows, J. (1978) Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 58, 825-841
- Bayne, B.L., Widdows, J., Moore, M.N., Salkeld, P., Worrall, C.M. & Donkin, P. (1982) Some ecological consequences of the physiological and biochemical effects of petroleum compounds on marine molluscs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, S. 219-239
- BfS (2005). Grundsätze zu den Umweltauswirkungen im Zusammenhang mit elektromagnetischen Feldern und thermischen Auswirkungen der Kabelanbindung von Offshore-Windenergieparks an das Verbundstromnetz. <http://www.bfs.de/elektro/papiere/Grundsatzpapier.pdf>
- Bias, W.-R. (1981). Kinetik der Cadmium-Akkumulation in euryhalinen Amphipoden des Elbe-Aestuars. Dissertation
- Bierkens, J.G.E.A. (2000) Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicol.* 153: 61-72
- BIO/CONSULT AS (2004). Monitoring programme – status Report 2003. Fish at the cable trace. Nysted offshore wind farm at Rødsand. 127 pp.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C. & Hansen, P.D. (2002) Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environ. Toxicol.* 17: 160-169
- BMU (2007) Entwicklung der Offshore-Windenergienutzung in Deutschland. Bundesministerium für Umwelt, Natur und Reaktorsicherheit, Stiftung der deutschen Wirtschaft zur Nutzung und Erforschung der Windenergie auf See. 30 S.  
[http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/offshore\\_wind\\_deployment\\_de\\_en.pdf](http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/offshore_wind_deployment_de_en.pdf)
- Bocquene, G. & Galgani, F. (1998) Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Mar. Environ. Sciences* Nr. 22
- Borenfreund, E. & Puerner, J.A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). *J. Tiss. Cult. Meth.* 9: 7-9

- Borrmann, C. B. (2006) Wärmeemission von Stromkabeln in Windparks – Laboruntersuchungen zum Einfluss auf die benthische Fauna. Diplomarbeit, eingereicht an der Universität Rostock, 82 S.
- Brakelmann, H. (2006) Meeresbodenerwärmung durch Hoch- und Höchstspannungskabel zur Netzanbindung von Offshore-Windparks. Vortrag beim Fachgespräch der dena "Verlegung von Seekabeln zum Netzanschluss von Offshore Windparks in Schutzgebieten im Meer", 20. - 21. 06. 2006 in Bremen; [http://www.offshore-wind.de/show\\_article.cfm?cid=1623](http://www.offshore-wind.de/show_article.cfm?cid=1623)
- Bochert, R. & Zettler, M.L. (2004) Long-term exposure of several marine benthic animals to static magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 25: 498-502
- Buckley, B.A., Owen, M.E. & Hofmann, G.E. (2001) Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J. Exp. Biol.*, 207: 3649-3656
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310
- Burkhardt-Holm, P. (2001) Der Fisch - wie lässt er sich als Indikator für die Qualität seiner Umwelt einsetzen? *GAIA*: 10: 6-15
- Carballal, M.J., Lopez, M.C., Azevedo, C. & Villalba, A. (1997) Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 29: 127-135
- Chapple, J.P., Smerdon, G.R., Berry, R.J. & Hawkins, A.J.S. (1998) Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L.. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 229: 53-68
- CMACS (2003) A baseline assessment of electromagnetic fields generated by offshore windfarm cables. COWRIE Report EMF – 01-20002 66.
- Coles, J.A., Farley, S.R. & Pipe, R.K. (1995) Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organisms* 22: 59-65
- Cossarizza, A., Pinti, M., Troiano, L. & Cooper, E.L. (2005) Flow cytometry as a tool for analysing invertebrate cells. *Invertebrate Survival Journal* 2: 32-40
- Dahlhoff, E.P. (2004) Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications of marine ecological studies. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 183-207
- Depledge, M.H., Aagaard, A. & Györkös, P. (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar. Poll. Bull.* 31: 19-27
- Deventer, K. (1999): Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Wirkungen von Stoffen mittels Comet Assay und Mikrokerntest an der Regenbogenforelle und der Dreikantmuschel. Dissertation an der Universität Karlsruhe, 112. S.
- Di Carlo, A., White, N., Guo, F., Garrett, P. & Litovitz, T. (2002) Chronic electromagnetic fields exposure decreases hsp70 levels and lowers cytoprotection. *J. Cell. Biochem.* 84: 447-454
- Domouhtsidou, G.P., Dailianis, S., Kaloyianni, M. & Dimitriadis, V.K. (2004) Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers - Combination with trace metal concentrations. *Mar. Poll. Bull.* 48: 572-586
- Downs, C.A., Mueller, E., Phillips, S., Fauth, J.E. & Woodley, C.M. (2000) A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastraea faveolata*) during heat stress. *Mar. Biotechnol.* 2: 533-544
- Downs, C.A., Dillon Jr., R.T., Fauth, J.E. & Woodley, C.M. (2001) A molecular biomarker system for assessing of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259: 189-214

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, M. (1961) A new and rapid colorometric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95
- Encomio, V.G. & Chu, F.L.E. (2005) Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *perkinsus marinus* (dermo). *J. Shellfish Res.* 24: 167-175
- Engell-Sorensen, K: (2002) Possible effects of the offshore wind farm at vindeby on the outcome of fishing: the possible effects of electromagnetic fields and noise. Bio/Consult, Report im Auftrag von SEAS, Doc. 1920-003-001-rev.2, 23.S.
- EOS Offshore AG (2003) Parkinterne Verkabelung - Berechnung der Temperaturverteilung im Meeresboden. Studie EOS Offshore AG, Varel, 10 S.
- Fent, K. (1998): Ökotoxikologie. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 288 S.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y. & Cyr, D. (2002) Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicol.* 59: 83-92
- Frahm, J. (2006) Analysis of physiological and molecular modifications in immune relevant cells following exposure to 50 Hz magnetic fields. Universität Rostock, Dissertation.
- Galgani, F. & Bocquene, G. (1991) Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* 25: 147-150
- Gercken, J. & Sordyl, H. (1999) Untersuchungen zur Saisonalität von Schadstoffkonzentrationen und -effekten in Miesmuscheln. Im Auftrag der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Außenstelle Berlin. 84 S.
- Gercken, J. & Sordyl, H. (2003) Untersuchungen zur Saisonalität von Schadstoffkonzentrationen und -effekten in Miesmuscheln. -Biologische Untersuchungen- Im Auftrag der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz. 67 S.
- Gercken, J. & Sordyl, H. (2007) Biologisches Effektmonitoring in Küstengewässern von Mecklenburg-Vorpommern. Pilotstudien 1998 – 2003. Im Auftrag des Landesamtes für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern, 135 S.
- Gill, A.B., Gloyne-Phillips, I., Neal, K.J. & Kimber, J.A. (2005) Electromagnetic fields. Review. COWRIE 1.5
- Gobba, F., Malagoli, D. & Ottaviani, E. (2003) Effects of 50 hz magnetic fields on fMLP- induced shape changes in invertebrate immunocytes: the role of calcium ion channels. *Bioelectromagnetics* 24: 277-282
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howella, S.M. & Ratcliffe, N.A. (1996) Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34: 273-290
- Hagger, J.A., Depledge, M.H. & Galloway, T. S. (2005) Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.* 51: 811-816
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R. & Galloway, T.S. (2006) Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environ. Assess. Manag.* 2: 312-329
- Handy, R.D., Galloway, T.S. & Depledge, M.H. (2003) A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12, 331-343

- Halpin, P.M., Menge, B.A. & Hofmann, G.E. (2004) Experimental demonstration of plasticity in the heat shock response of the intertidal mussel *Mytilus californianus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol.276:137-145
- Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55: 913-951
- Hamer, B., Hamer, D.P., Müller, W.E.G. & Batel, R. (2004) Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. Environ.Int. 30: 873-882
- Harrison, F.L. & Berger, R. (1982) Effects of copper on the latency of lysosomal hexosaminidase in the digestive cells of *Mytilus-edulis*. Mar. Biol. 68: 109-116
- Helmuth, B.S.T. & Hofmann, G.E. (2001) Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. Biol. Bull. 201: 374-384
- Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A. & Okihira, M. S. (1992) Histopathological biomarkers. In: Huggett, R. A., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., Bergman, H. L. (Hrsg.), Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress, SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, S. 155 – 209.
- Hofmann, G.E. & Somero, G.N. (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: Seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. J. Exp. Biol. 198: 1509-1518
- Hofmann, G.E. (2005) Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. Integr. Comp. Biol. 45:247-255
- ICES (2004) Recommended techniques for biological monitoring programmes at the national or international level - methods for fish. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants. WGBEC meeting 22 - 26 March 2004 Ostend, Belgien
- ICES (2006) Report of the Second ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open-sea Areas (WKIMON II), 17-19 January 2006, ICES Headquarters. ICES CM 2006/ACME:02., 157 S.
- Josephy, P.D., Mannervik, B. & de Montellano, P.O. (1997) Molecular Toxicology, Oxford University Press, 365 S.
- Junkersdorf, B., Bauer, H. & Gutzeit, H.O. (2000) Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Bioelectromagnetics 21: 100-106
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. & Levin, E.D. (1998) Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Environ. Health Perspectives. 106: 375-384
- Kube, J.; Zettler, M.L., Gosselck, F., Ossig S. & Powilleit, M. (1996). Distribution of *Marenzelleria viridis* (Polychaeta: Spionidae) in the southwestern Baltic Sea in 1993/94 – ten years after introduction. Sarsia 81, 131-142
- Kültz, D. (2003) Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. Review. J. Exp. Biol. 206: 3119-3124
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. 10: 203-209

- Lacorn, M. (1999) Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren auf die Induktion von Metallothionein-Isoformen der Kliesche (*Limanda limanda* L.), Dissertation, Universität Hamburg, 83 S.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lannig, G., Flores, J.F. & Sokolova, I.M. (2006) Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance on oysters. *Aquat. Toxicol.* 79: 278-287
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billinghamurst, Z. & Depledge, M.H. (1999) Stress proteins (hsp`s): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicol.* 8: 351-368
- Lupke, M. (2006) Analysis of the activation mechanisms of immune relevant cells following exposure to 50 Hz magnetic fields. Universität Rostock, Dissertation.
- Malagoli, D., Gobba, F. & Ottaviani, E. (2003) Effects of 50-Hz magnetic fields on the signalling pathways of fMLP-induced shape changes in invertebrate immunocytes: the activation of an alternative "stress pathway". *Biochim. Biophys. Acta* 1620: 185-190
- Malagoli, D., Lusvardi, M., Gobba, F. & Ottaviani, E. (2004) 50 Hz magnetic fields activate mussel immunocyte p38 MAP kinase and induce hsp70 and 90. *Comp. Biochem. Physiol. C* 137: 75-79
- Malagoli, D., Gobba, F. & Ottaviani, E. (2006) 50 Hz magnetic fields of constant or fluctuating intensity: effects on immunocyte hsp70 in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bioelectromagnetics* 27: 427-429
- Mayer, M.P. & Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular function and molecular mechanism. *Review. Cell. Mol. Life Sci.* 62: 670-684
- Meißner, K. (2000). Ökoparasitologische Untersuchungen am Schlickkrebs *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda) – Der Einfluss digener Trematoden auf Populationen eines Zwischenwirtes. Dissertation, Universität Rostock
- Meißner, K., Schabelon, H., Bellebaum, J. & Sordyl, H. (2006) Impacts of submarine cables on the marine environment. Studie des Instituts für Angewandte Ökologie GmbH. Im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz. 71 S.
- Merck, T. & Nordheim, H.von (2000) Technische Eingriffe in marine Lebensräume. Bundesamt für Naturschutz, BfN – Skripten 29  
[http://www.bfn.de/0502\\_meeres\\_kuestennaturschutz.html?&no\\_cache=1](http://www.bfn.de/0502_meeres_kuestennaturschutz.html?&no_cache=1)
- Merritt R, Purcell C, Stroink G (1983) Uniform magnetic field exposure by three, four, and five square coils. *Rev. Sci. Instrum.* 54:879-882
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N. & Porte C. (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50: 167-176
- Mitchelmore C.L., C. Birmelin, D.R. Livingstone & J.K. Chipman (1998): Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the „comet“ assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 41: 51-58
- Moore, M.N. (1976): Cytochemical Demonstration of Latency of Lysosomal Hydrolases in Digestive Cells of Common Mussel, *Mytilus edulis*, and Changes Induced by Thermal-Stress. - *Cell and Tissue Research* 175: 279-287
- Moore, M.N. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH- ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 81-89

- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Leonard D.R.P. (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research* 552: 247-268
- Nasci, C., Da Ros, L., Nesto, N., Sperti, L., Passarini, F. & Pavoni, B. (2000) Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 50: 425-430
- NRC (National Research Council) (1999) *Hormonally active agents in the environment*. Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academic Press. Washington, D.C.
- Offshore Wind Technologie GmbH (2004) Wärmeausbreitung im Meeresboden infolge Verlustwärme der Netzanbindung des Windparks "Borkum West" (Windnet I). Studie im Auftrag der PROKON Nord Energiesysteme GmbH.
- Ottaviani, E., Malagoli, D., Ferrari, A., Tagliazucchi, D., Conte, A. & Gobba, F. (2002) 50 Hz magnetic fields of varying flux intensity affect cell shape changes in invertebrate immunocytes: the role of potassium ion channels. *Bioelectromagnetics* 23: 292-297
- Parry, H.E. & Pipe, R.K. (2004) Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicol.* 69: 311-325
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F. & Fabbri, E. (2002) Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress & Chaperones* 7: 250-257
- Piano, A., Valbonesi, P. & Fabbri, E. (2004) Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress & Chaperones* 9: 134-142
- Pöhler, S. (2006) Übertragungstechnik für Offshore Windparks - Stand der Technik und Ausblick auf zukünftige Entwicklungen. Vortrag beim Fachgespräch der dena "Verlegung von Seekabeln zum Netzanschluss von Offshore Windparks in Schutzgebieten im Meer", 20. - 21. 06. 2006 in Bremen; [http://www.offshore-wind.de/show\\_article.cfm?cid=1623](http://www.offshore-wind.de/show_article.cfm?cid=1623)
- Porte, P.F.La (2005) *Mytilus trossulus* hsp70 as a biomarker for arsenic exposure in the marine environment: Laboratory and real-world results. *Biomarkers* 10(6): 417-428
- Prokop, O. (2006) Untersuchung der Auswirkungen von Kabelwärme (Offshorewindkraftanlagen) in Küstengewässern – Einfluss eines inversen Temperaturgradienten auf die biogeochemischen Prozesse in Sedimenten. Universität Rostock, Diplomarbeit
- Pschorr-Schoberer, E., Schindler, J., Stiller, C. & Weindorf, W. (2006) Offshore-Windenergie in der deutschen Energieversorgung – Eine Kurzexpertise über Potentiale, Chancen und Risiken. Studie im Auftrag der Windenergie-Agentur Bremerhaven-Bremen e.V.. Ludwig-Bölkow-Systemtechnik GmbH, 61 S. [http://www.lbst.de/publications/studies\\_d/2006/WAB\\_Offshore\\_Studie\\_2006-06.pdf](http://www.lbst.de/publications/studies_d/2006/WAB_Offshore_Studie_2006-06.pdf)
- Rajagopal, S., Velde, G.van der, Gaag, M.van der & Jenner, H.A. (2005) Factors influencing the upper temperature tolerances of three mussel species in a brackish water canal: Size, season and laboratory protocols. *Biofouling* 21: 87-97
- Regoli, F. (1992) Lysosomal Responses As A Sensitive Stress Index In Biomonitoring Heavy-Metal Pollution. - *Marine Ecology-Progress Series* 84, S. 63-69
- Renwrantz, L. (1990) Internal defence system of *Mytilus edulis*. In: Stefano, G.B. (Hrsg.) *Neurobiology of Mytilus edulis*. Manchester University Press, Manchester, S. 256-275

- Roberts, D.A., Hofmann, G.E. & Somero, G.N. (1997) Heat-Shock Protein Expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (Seasonal and Tidal-Height Comparisons) and Acclimation Effects. *Biol. Bull.* 192: 309-320
- Romeis, B. (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, hrsg. von P. Böck, Urban u. Schwarzenberg, München
- Sanders, B.M. (1993) Stress Proteins in Aquatic Organisms: An Environmental Perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23(1): 49-75
- Segerstråle, S.G. (1940) Studien über die Bodentierwelt in südfinnländischen Küstengewässern. VI. Zur Biologie des Amphipoden *Corophium volutator*, nebst Angaben über die Entwicklung und Rückbildung der Oostegitenborsten bei dieser Art. *Societas Scientiarum Fennica, Commentationes Biologicae*. VII. 16, 1-40
- Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J. & Langston W.J. (2002) Effects of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* 54: 361-365
- Sikorski, A.V. & Bick, A. (2004) Revision of *Marenzelleria* Mesnil, 1986 (Spionidae, Polychaeta). *Sarsia* 89: 253-275
- Simkó, M. & Mattsson, M.O. (2004) Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J. Cell. Biochem.* 93: 83-92
- Simkó, M., Droste, S., Kriehuber, R. & Weiss, D.G. (2001) Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50Hz electromagnetic fields. *Eur. J. Cell Biol.* 80: 562-566
- Singh, N.P., McCoy, R.R., Tice, E.L. & Schneider (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: pp. 185-191
- Snyder, M.J., Girvetz, E. & Mulder, E.P. (2001) Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 22-29
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. & Loeschcke, V. (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Rev. Ecol. Lett.* 6: 1025-1037
- Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M. & Lafaurie, M. (1998) Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ. Poll.* 99: 339-345
- Thamdrup, H.M. (1935) *Beiträge zur Ökologie der Wattenfauna*. Dissertation
- Tedengren, M., Olsson, B., Reimer, O., Brown, D.C. & Bradley, B.P. (1999) Heat pretreatment increases cadmium resistance and hsp70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquat. Toxicol.* 48: 1-12
- Tokalov, S.V. & Gutzeit, H.O. (2004) Weak electromagnetic field (50 Hz) elicit a stress response in human cells. *Environ. Res.* 94: 145-151
- Trotter, J. (2000) Software WinMDI 2.9, Scripps Research Institute, La Jolla CA, USA  
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/labinfo/>
- UNEP/RAMOG (1999) Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP, Athens, 1999
- Viarengo, A. (1989) Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences* 1(2): 295-317

- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. & Blasco, J. (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comp. Physiol.* 277: R1612-R1619
- Viarengo, A. & Canesi, L. (1991) Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94: 225-243
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G. & Orunesu, M. (1989) Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, Vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Mar. Environ. Res.* 28: 291-295
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R. & Orunesu, M. (1991) Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems. *Experientia* 47: 454-457
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K. & Farrar, S.V. (1987) Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels - the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.* 94: 251-257
- Viarengo, A. & Nott, J.A. (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C: 355-372
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44: 69-84
- Werner, I. & Hinton, D.E. (1999) Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*) : is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers* Vol.4, No. 6, 473-484
- Worzyk, T. & Böngeler, R. (2003) Abschätzung der Sedimenterwärmung durch das parkinterne Kabelnetz im Offshore Windpark GlobalTech1. Studie der ABB Power Technology Products AB, Karlskrona (Schweden) und Enveco GmbH, Münster im Auftrag der Nordsee Windpower GmbH & Co. KG, Sulingen, 28 S
- WWF (2006) Wie umweltverträglich ist die Netzanbindung von Offshore-Windparks? Gutachten des WWF-Deutschland, 54 S.  
[http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/pdf\\_misc-alt/klima/17.pdf](http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/pdf_misc-alt/klima/17.pdf)
- Zettler, M.L., Borchert, R. & Bick A. (1994) Röhrenbau und Vertikalverteilung von *Marenzelleria viridis* (Polychaeta: Spionidae) in einem inneren Küstengewässer der südlichen Ostsee. *Rostock. Meeresbiolog. Beitr.* 2: 215-225
- Zorn, M. (2000) Gentoxizität und lysosomale Schädigung bei *Dreissena polymorpha* Pallas und *Mytilus edulis* L. Diplomarbeit, Universität Rostock, 82 S.

## 9 Anlage

### Zitate der Literaturstudie „Impacts of Submarine Cables on the Marine Environment“

(Meißner, K., Schabelon, H., Bellebaum, J. & Sordyl, H.; Bericht des IfAO im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz, 2006)

ABB (2006a). Website of ABB (Asea Brown Boveri Ltd), [www.abb.com](http://www.abb.com)

ABB (2006b). Submarine Power Cables - State-of-the-art production facility, more than 100 years of experience and reference installations around the world. [http://library.abb.com/GLOBAL/SCOT/SCOT245.NSF/VerityDisplay/5CC588CA3902AFA6C1257156002C5417/\\$File/Submarine%20Power%20Cables.pdf](http://library.abb.com/GLOBAL/SCOT/SCOT245.NSF/VerityDisplay/5CC588CA3902AFA6C1257156002C5417/$File/Submarine%20Power%20Cables.pdf)

ACRES, H. (2006). Literature Review: Potential electromagnetic field (EMF) effects on aquatic fauna associated with submerged electrical cables. supplement to the Environmental Assessment Certificate (EAC) Application for the Vancouver Island Transmission Reinforcement (VITR) Project. Prepared for BC Hydro Environment & Sustainability Engineering, 34 pp. <http://www.eao.gov.bc.ca>

AMBROSE, R. F. (1994). Mitigating the effects of a coastal power-plant on a kelp forest community - rationale and requirements for an artificial reef. *Bulletin of Marine Science* 55: 694-708.

ANDRULEWICZ, E., NAPIERSKA, D. & OTREMBA, Z. (2003). The environmental effects of the installation and functioning of the submarine SwePol Link HVDC transmission line: a case study of the Polish Marine Area of the Baltic Sea. *Journal of Sea Research* 49: 337-345.

ARENDSE, M. C. (1978). Magnetic field detection is distinct from light detection in the invertebrates *Tenebrio* and *Talitrus*. *Nature* 274: 358-362.

Arendse, M. C. & BARENDREGT, A. (1981). Magnetic orientation in the semi-terrestrial amphipod *Orchestria cavimana*, and its interrelationship with photo-orientation and water loss. *Physiol. Entomol.* 6: 333-342.

BAKER, T. (2003). Offshore wind energy generation: phase 1 proposals and environmental report – for consideration by the Department of Trade and Industry. Report by BMT Cordah Limited, [www.og.dti.gov.uk/offshore-wind-sea/process/envreport.htm](http://www.og.dti.gov.uk/offshore-wind-sea/process/envreport.htm)

BASSLINK PTY LTD (2002). Final panel report on the Basslink proposal. <http://www.rpdc.tas.gov.au>

BCTC - BRITISH COLUMBIA TRANSMISSION CORPORATION (2006). Application for an Environmental Assessment Certificate for the Vancouver Island Transmission Reinforcement Project. Mai 2006. [http://www.eao.gov.bc.ca/epic/output/html/deploy/epic\\_document\\_250\\_21816.html](http://www.eao.gov.bc.ca/epic/output/html/deploy/epic_document_250_21816.html)

BERGEMANN, M. (2004).: Die Trübungszone in der Tideelbe - Beschreibung der räumlichen und zeitlichen Entwicklung, <http://www.arge-elbe.de>

BfN (2006). Ecological Research on Offshore Wind Farms: International Exchange of Experiences - PART B: Literature Review of the Ecological Impacts of Offshore Wind Farms. BfN-Skripten 186, 284 pp.

BfS (2005). Grundsätze zu den Umweltauswirkungen im Zusammenhang mit elektromagnetischen Feldern und thermischen Auswirkungen der Kabelanbindung von Offshore-Windenergieparks an das Verbundstromnetz. <http://www.bfs.de/elektro/papiere/Grundsatzpapier.pdf>

BIO/CONSULT AS (2004). Monitoring programme – status Report 2003. Fish at the cable trace. Nysted offshore wind farm at Rødsand. 127 pp.

BIOWIND (2005). Wind power plants in the sea – A method to locally increase the biodiversity in the Baltic Sea. Report to the National Energy Agency, Wind research program, 12 pp.

BIRKLUND, J. (2003). Marine Biological Surveys Along the Cable Trench in the Lagoon of Rødsand in September 2002 and March 2003. Report by the DHI Water & Environment commissioned by SEAS Distribution A.m.b.A., Hørsholm (Dänemark), 37 pp.

- BIRKLUND, J. & PETERSEN, A. H. (2004). Development of the fouling community on turbine foundations and scour protections in Nysted Offshore wind farm, 2003. Report by Energi E2 A/S, 42 pp.
- BOCHERT, R. & ZETTLER, M. L. (2004). Long-term exposure of several marine benthic animals to static magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 25: 498 – 502.
- BORRMANN, C. B. (2006). Wärmeemission von Stromkabeln in Windparks – Laboruntersuchungen zum Einfluss auf die benthische Fauna. Thesis for a diploma, Rostock University and Institute of Applied Ecology Ltd., 82 pp.
- BRAKELMANN, H. (2005a). Kabelverbindung der Offshore-Windfarmen Kriegers Flak und Baltic I zum Netzanschlusspunkt. Expert's opinion report commissioned by Offshore Ostsee Wind AG, 70 pp.
- BRAKELMANN, H. (2006a). Heating of grouped cables for the transmission of wind energy. *ew* 10: 44-50.
- BRAKELMANN, H. & Stammen, J. (2006b). Heating Simulations for Submarine Cables: LSM, FEM or others? IEEE-conference PECon, KualaLumpur, 17 pp.
- BUCKLEY, R. M. & HUECKEL, G. J. (1985). Biological processes and ecological development on an artificial reef in Puget-Sound, Washington. *Bulletin of Marine Science* 37: 50-69.
- CAPE WIND ASSOCIATES, LLC (2004). Cape Wind Energy Project Draft Environmental Impact Statement. Section 9.0 MEPA DRAFT SECTION 61 FINDINGS (M.G.L.C. 3 0 § 61). <http://www.nae.usace.army.mil/projects/ma/ccwf/deis.htm>
- CHRISTIANSEN, CH., BARTHOLDY, J. & SØRENSEN, C. (2006). Composition and size distributions of local and advected sediment trapped over a tidal flat during moderate and storm conditions. *Geografisk Tidsskrift, Danish Journal of Geography* 106 (1). 1-11.
- CMACS (2003). A baseline assessment of electromagnetic fields generated by offshore wind farm cables. COWRIE Report EMF - 01-2002 66. Available [http://www.thecrownestate.co.uk/print/1351\\_emf\\_research\\_report\\_04\\_05\\_06.pdf](http://www.thecrownestate.co.uk/print/1351_emf_research_report_04_05_06.pdf)
- CRANFORD, P.J., GORDON, D.C., LEE, K., ARMSWORTHY, S.L. & TREMBLAY, G.H. (1999). CHRONIC TOXICITY and physical disturbance effects of water- and oil-based drilling fluids and some major constituents on adult sea scallops (*Placopecten magellanicus*). *Marine Environmental Research* 48, 225-256.
- DAAN, R., MULDER, M. & VANLEEUVEN, A. (1994). Differential sensitivity of macrozoobenthic species to discharges of oil-contaminated drill cuttings in the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* 33: 113-127
- DAAN, R. & MULDER, M. (1996). On the short-term and long-term impact of drilling activities in the Dutch sector of the North Sea. *Ices Journal of Marine Science* 53: 1036-1044.
- DEUTSCHE WINDGUARD GMBH (2005). Offshore Wind – implementing a new powerhouse for Europe. Grid connection, environmental impact assessment & political framework. Study commissioned by Greenpeace International, 172 pp., <http://www.greenpeace.org/raw/content/international/press/reports/offshore-wind-implementing-a.pdf>
- DREW, S. C. & HOPPER, A. G. (1996). Fishing and submarine cables working together. Report commissioned by the International Cable Protection Committee (ICPC). [http://www.iscpc.org/publications/18.3Fishing\\_Booklet.pdf](http://www.iscpc.org/publications/18.3Fishing_Booklet.pdf)
- EBA ENGINEERING CONSULTANTS LTD (2004). Final environmental monitoring summary BC Hydro; cable 5 submarine cable replacement project: 13-41.
- ELEVELD, M.A, R. PASTERKAMP & V. D. WOERD, H. J. (2004). A survey of total suspended matter in the southern North Sea based on the 2001 SEAWIFS Data. *EARSeL eProceedings* 3, 2/2004: 166-178, [http://las.physik.uni-oldenburg.de/eProceedings/vol03\\_2/03\\_2\\_eleveld1.pdf](http://las.physik.uni-oldenburg.de/eProceedings/vol03_2/03_2_eleveld1.pdf)
- EMU LTD. (2004). Subsea Cable Decommissioning – A Limited Environmental Appraisal. Report commissioned by British Telecommunications plc, Cable & Wireless and AT&T, Report no. 04/J/01/06/0648/0415, available from UKCPC
- FOSTER, K. R. & REPACHOLI, M. H. (2005). Environmental Impacts of Electromagnetic Fields From Major Electrical Technologies. EMF Project report. Available <http://www.who.int/peh-emf/publications/reports/en>

- FRICKE, R. (2000). Auswirkungen elektrischer und magnetischer Felder auf Meeresfische in der Nord und Ostsee. . – In: MERCK, T. & NORDHEIM, H.v. (eds.): Technische Eingriffe in marine Lebensräume. Workshop des Bundesamtes für Naturschutz- INA Vilm 27.-29. Oktober 1999. – BfN Skripten 29: 41-61.
- GALAGAN, CH., T. ISAJI & SWANSON, C. (2003). Results of model simulations of sediment deposition from cable burial operations in Lewis Bay, MA. Narragansett, [www.nae.usace.army.mil/projects/ma/ccwf/deis.htm](http://www.nae.usace.army.mil/projects/ma/ccwf/deis.htm)
- GILL, A.B. & H. TAYLOR (2001). The potential effects of electromagnetic fields generated by cabling between offshore wind turbines upon Elasmobranch Fishes. CCW Science Report 488, [http://www.ccw.gov.uk/Images\\_Client/Reports/Reportfinal.pdf](http://www.ccw.gov.uk/Images_Client/Reports/Reportfinal.pdf)
- GILL, A. B., GLOYNE-PHILLIPS, I., NEAL, K.J. & KIMBER, J.A. (2005). COWRIE 1.5 Electromagnetic fields review - The potential effects of electromagnetic fields generated by sub-sea power cables associated with offshore wind farm developments on electrically and magnetically sensitive marine organisms – a review. [http://www.offshorewindfarms.co.uk/Downloads/COWRIE\\_Final\\_compiled.pdf](http://www.offshorewindfarms.co.uk/Downloads/COWRIE_Final_compiled.pdf)
- GIOVANNI M. FERRARIA, G.M., F.G. BOA & BABIN, M. (2003). Geo-chemical and optical characterizations of suspended matter in European coastal waters. Estuarine, Coastal and Shelf Science 57: 17–24.
- GÓMEZ GESTEIRA, J. L. & DAUVIN, J. C. (2000). Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities. Marine Pollution Bulletin 40: 1017-1027.
- GRANT, A. & BRIGGS, A. D. (2002). Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts? Marine Environmental Research 53: 95-116.
- Gray, J. S, CLARKE, K. R, WARWICK R. M. &, HOBBS, G. (1990). Detection of initial effects of pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldfisk oilfields, North Sea. Marine Ecology Progress Series 66: 285-299.
- GRUET, Y. (1971). Morphologie, croissance et faune associée des récifs de *Sabellaria alveolata* (Linné). Thèse doctorat, Université de Nantes, 238 pp.
- GRZAN, J., HAHN, E.I., CASALAINA, R. V. & KANSOG, J. O. C. (1993). The 345 kV underground / underwater Long Island Sound cable project. IEEE transactions on power delivery, Vol. 8, No.3, pp. 750-760.
- GSX PL (2001). Georgia Strait Crossing Pipeline Ltd. / Canada Pipeline Project – Regulatory Affairs. Supplemental Information 7. Assessment of environmental and socio-economic effects.
- HATA, R. (2006). Solid DC submarine cable insulated with polypropylene laminated paper (PPLP). SEI Technical Review 62, [http://www.sei.co.jp/tr\\_e/t\\_technical\\_e\\_pdf/62-01.pdf](http://www.sei.co.jp/tr_e/t_technical_e_pdf/62-01.pdf)
- HAUGE, O., JOHNSEN, J. N., HOLTE, T. A. & Bjørløw-Larsen, K. (1988). Performance of the  $\pm 250$  kV HVDC Skagerrak submarine cables. Further development of the HVDC paper-insulated, mass-impregnated (solid type) submarine cable. IEEE Transactions on Power Delivery, Vol. 3, No. 1, pp. 1-15.
- HISCOCK, K., TYLER-WALTERS, H. & JONES, H. (2002). High level environmental screening study for offshore wind farm developments – marine habitats and species project. Report from the Marine Biological Association to DTI New & Renewable Energy Programme. AEA Technology, Environment contract: W/35/00632/00/00.
- HITCHCOCK, D.R., NEWELL, R.C. & SEIDERER, L.J. (1999). Investigation of Benthic and Surface Plumes associated with Marine Aggregate Mining in the United Kingdom – Final Report”. Contract Report for the U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service. Contract Number 14-35-0001-30763. Coastline Surveys Ltd Ref. 98-555-03 (Final).
- HK OFFSHORE WIND LIMITED (2006). Hong Kong Offshore Wind Farm in Southeastern Waters - Project Profile. <http://www.epd.gov.hk/eia/register/profile/latest/esb146.pdf>
- HUTCHISON GLOBAL CROSSING LTD. (2000). Environmental impact assessment ordinance (chapter 499), section 5(1)(b). Project profile for submarine cable landing installation at Tuen Mun for HGC optical fibre submarine cable system between Tuen Mun and Chek Lap Kok. [http://www.epd.gov.hk/eia/register/profile/latest/e\\_dir43.pdf](http://www.epd.gov.hk/eia/register/profile/latest/e_dir43.pdf)

- HVIDT, C.B. (2004). Electromagnetic fields and the effect on fish. Results from the investigations at Nysted Offshore Wind Farm. Presentation held at the conference Offshore Wind Farms and the Environment, Billund (DK) September 22nd 2004
- JACQUES WHITFORD LTD (2006a). Application for environmental assessment certificate (BCEAA) and environmental screening (CEAA) - Vancouver Island Transmission Reinforcement Project. <http://www.eao.gov.bc.ca>
- Jacques WHITFORD LTD (2006b). Vancouver Island Transmission Reinforcement Project Technical Data Report: Potential Effects of Alkylbenzene Release to the Marine Environment. prepared for British Columbia Transmission Corporation. Project No. BCV50466.27, <http://www.eao.gov.bc.ca>
- JASCO RESEARCH LTD (2006). Vancouver Island Transmission Reinforcement Project: Atmospheric and Underwater Acoustics Assessment. Report prepared for British Columbia Transmission Corporation 49 pp., <http://www.eao.gov.bc.ca>
- JOSCHKO, T., OREJAS, C., SCHRÖDER, A. & KNUST, R. (2004). Dokumentation der Ansiedelungsprozesse an künstlichen Hartsubstraten in der Nordsee. DEWI Magazin 25: 43-44.
- KERITE COMPANY (2001). Installing submarine cable in environmentally-sensitive Southwest Florida. <http://www.kerite.com/webpages/news.asp>
- KINGSTON, P. F. (1992). Impact of offshore oil production installations on the benthos of the North Sea. *Ices Journal of Marine Science* 49: 45-53.
- Klarič, S., Pavičič-Hamer, D. & Lucu, Č. (2004). Seasonal variations of arsenic in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Helgoland Marine Research* 58 (3): 216-220.
- KÖNNECKER, G. (1977). Epibenthic assemblages as indicators of environmental conditions. In *Proceedings of the 11<sup>th</sup> Symposium on Marine Biology, Galway, October 1976. Biology of Benthic Organisms* (ed. B. F. Keegan, P. O. Ceidigh & P. J. S. Boaden), pp. 391-395. Oxford Pergamon Press
- KOOPS, F. B. J. (2000). Electric and magnetic fields in consequence of undersea power cables. In: *ICNIRP: Effects of Electromagnetic Fields on the Living Environment*, pp. 189 – 210
- KRAMER, K. (2000). Kabelbauarten sowie Verlegemethoden und ihre Auswirkungen auf magnetische und elektrische Felder im Meer. In: Merck T, von Nordheim H (Eds) *Technische Eingriffe in Marine Lebensräume*, BfN-Skripten 29: 77 – 87.
- LAWRENCE, M. (2002). Submarine cable industry, Alcatel survey standards and future trends. Oral presentation, MUC Kiel, [www.elac-nautik.de](http://www.elac-nautik.de)
- LEONHARD, S. B. & PEDERSEN, J. (2005). Hard bottom substrate monitoring Horns Rev Offshore Wind Farm - annual status report 2004. ELSAM Engineering, 79 pp.
- LOHMANN, K. J. & WILLOWS, A. O. D. (1987). Lunar-modulated geomagnetic orientation by a marine mollusk. *Science* 235, 331-334.
- LOHMANN, K. J., PENTCHEFF, N. D., NEVITT, G. A., STETTEN, G. D., ZIMMER-FAUST, R. K., JARRARD, H. E. & BOLES, L. C. (1995). Magnetic orientation of spiny lobsters in the ocean: experiments with undersea coil systems. *The Journal of Experimental Biology* 198: 2041–2048.
- MARRA, L.J. (1989). Sharkbite on the SL submarine lightwave cable system: history, causes and resolution, *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, 14 (3): 230-237.
- MATTHÄUS, W. (1995). Ecological effects and technical aspects of the sea cable Germany – Sweden. German Scientific Commission for Marine Research, working group: Sea Cable Germany – Sweden. 11 pp. Available <http://members.iinet.net.au/~emfacts/basslink/ecological.html>
- MAURER, D., KECK, R. T., TINSMAN, J. C., LEATHAM, W. A., WETHE, C., LORD, C. & CHURCH, T. M. (1986). Vertical migration and mortality of marine benthos in dredged material: a synthesis. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 71: 49-63.
- MAY, A. B. (2002). Submission on the: 'Response by Basslink Pty Ltd to the Draft Report of the Basslink Joint Advisory Panel' (Submission 2 of 3). Proposed Metallic Return 4 April 2002, submitted to the Joint Advisory Panel C/- Department of Infrastructure Traralgon, 23 April 2002. <http://www.tfic.com.au>

- MEIßNER, K. & SORDYL, H. (2006a). Literature Review of Offshore Wind Farms with Regard to Benthic Communities and Habitats. - In: Zucco, C., Wende, W., Merck, T., Köchling, I. & Köppel, J. (eds.): Ecological Research on Offshore Wind Farms: International Exchange of Experiences - PART A: Assessment of ecological impacts. BfN-Skripten 171: 45-47.
- MEIßNER, K. & SORDYL, H. (2006b). Literature Review of Offshore Wind Farms with Regard to Benthic Communities and Habitats. - In: Zucco, C., Wende, W., Merck, T., Köchling, I. & Köppel, J. (eds.): Ecological Research on Offshore Wind Farms: International Exchange of Experiences - PART B: Literature Review of the Ecological Impacts of Offshore Wind Farms. BfN-Skripten 186: 1-45.
- MEIßNER, K., BOCKHOLD, J. & SORDYL, H. (in press). Problem Kabelwärme? – Vorstellung der Ergebnisse von Feldmessungen der Meeresbodentemperatur im Bereich der elektrischen Kabel im dänischen Offshore-Windpark Nysted Havmøllepark (Dänemark). In: Meeresumwelt-Symposium 2006. Hrsg. Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie in Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt und dem Bundesamt für Naturschutz im Auftrag des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Hamburg und Rostock.
- MOLL, G. (2006). Verlegetechniken im Rohrleitungsbau: Kreuzungstechniken, offene und geschlossene Bauweise. Oral presentation at the meeting "Verlegung von Seekabeln zum Netzanschluss von Offshore Windparks in Bundeswasserstraßen", 21. 03. 2006 in Bremen; [http://www.offshore-wind.de/show\\_article.cfm?cid=1622](http://www.offshore-wind.de/show_article.cfm?cid=1622)
- NATIONAL GRID (2000). Marine Infrastructure: Offshore and Shore Crossings. Basslink Project: Backgrounder 6-1, [http://www.rpdc.tas.gov.au/projects\\_state\\_signif/Basslink/pages/contents2.htm](http://www.rpdc.tas.gov.au/projects_state_signif/Basslink/pages/contents2.htm)
- NEDWELL, J. R., TURNPENNY, A. W. H. & LAMBERT, D. (1998). Guiding fish with sound, the acoustics of fish behavioural barrier design. 128th Annual Meeting of the American Fisheries Society Conference, Baltimore, USA August 1998.
- NEDWELL, J. R., NEEDHAM, K., GORDON, J., ROGERS, C. & GORDON, T. (2001). The effects of underwater blast during wellhead severance in the North Sea. Report No. 469 R 0202 by Subacoustech Ltd, funded by CSOL on behalf of consortium. [http://www.subacoustech.com/downloads/469R0202\(current\)/report/dbha\\_theory.html](http://www.subacoustech.com/downloads/469R0202(current)/report/dbha_theory.html)
- NEDWELL, J., LANGWORTHY, J. & HOWELL, D. (2003). Assessment of sub-sea acoustic noise and vibration from offshore wind turbines and its impact on marine wildlife; initial measurements of underwater noise during construction of offshore wind farms, and comparison with background noise. Report No. 544 R 0424 submitted to The Crown Estate, commissioned by COWRIE, Available <http://www.thecrownestate.co.uk/>
- NEDWELL, J. & HOWELL, D. (2004). A review of offshore wind farm related underwater noise sources. Report No. 544 R 0308, submitted to The Crown Estate, commissioned by COWRIE, Available <http://www.thecrownestate.co.uk/>
- NEXANS NORWAY AS (2005). The art of technology - Submarine Cables, Umbilicals and Services. <http://www.nexans.no/internet/Content.nx?f=h&contentId=9048#Sjokabel>
- NEXANS NORWAY AS (2006). Technical description of submarine power export cables. Document available from Nexans Norway AS, 13 pp.
- NORTHEAST UTILITIES SERVICE COMPANY (2002). Northeast Utilities Service Company application for a Certificate of Environmental Compatibility and Public Need for the replacement of a submarine electric transmission cable system from Norwalk, Connecticut to Northport, New York. Docket No. 224, Findings of Fact, <http://www.ct.gov/csc/lib/csc/224fof.doc>
- OFFICE OF NAVAL RESEARCH (2000). Draft environmental impact statement for the North Pacific Acoustic Laboratory. [http://npal.ucsd.edu/permitting/Permit%20list/DEIS/PDF/executive\\_summary.pdf](http://npal.ucsd.edu/permitting/Permit%20list/DEIS/PDF/executive_summary.pdf)
- OFFSHORE WIND POWER LTD. (2002). Inner Dowsing Offshore Wind Farm. Volume 1 non-technical summary, 32 pp.
- OFFSHORE WIND TECHNOLOGIE GMBH (2004). Wärmeausbreitung im Meeresboden infolge Verlustwärme der Netzanbindung des Windparks „Borkum West“ (Windnet I). Gutachten im Auftrag der Prokon Nord Energiesysteme GmbH, 14 S.

- OLSGARD, F. & GRAY, J. S. (1995). A comprehensive analysis of the effects of offshore oil and gas exploration and production on the benthic communities of the Norwegian continental shelf. *Marine Ecology Progress Series* 122: 277-306
- PARDI, L., ERCOLINI, A., FERRARA, F. & SCAPINI, F. (1985). Orientamento zonale solare e magnetico in Crostacei Antipodi litorali di regioni equatoriali. *Att. Accad. Lincei Rend. Sci. Fis. Mat. Nat.* 76: 312-320.
- PÖHLER, S. (2006). Übertragungstechnik für Offshore Windparks - Stand der Technik und Ausblick auf zukünftige Entwicklungen. Oral presentation at the meeting "Verlegung von Seekabeln zum Netzanschluss von Offshore Windparks in Schutzgebieten im Meer", 20. - 21. 06. 2006 in Bremen; [http://www.offshore-wind.de/show\\_article.cfm?cid=1623](http://www.offshore-wind.de/show_article.cfm?cid=1623)
- POLÉO, A.B.S., JOHANNESSEN, H.F., HARBOE, M. JR. (2001). High voltage direct current (HVDC) sea cables and sea electrodes: Effects on marine life. – 1st revision of the literature study: 50 p.
- PROKOP, O. (2006). Untersuchung der Auswirkungen von Kabelwärme (Offshorewindkraftanlagen) in Küstengewässern - Einfluss eines inversen Temperaturgradienten auf die biogeochemischen Prozesse in Sedimenten. Thesis for a diploma, Rostock University, 98 pp.
- REIMERS, H. & BRANDEN, K. (1994). Algal colonization of a tire reef - influence of placement date. *Bulletin of Marine Science* 55: 460-469.
- SAKHALIN ENERGY INVESTMENT COMPANY (2005). Executive summary of the phase 2, Environmental and social impact assessment process. <http://www.sakhalinenergy.com>
- SCARPINI, F. & QUOCHI, G. (1992). Orientation in sandhoppers from Italian populations – have they magnetic orientation ability? *Bull. Zool.* 59: 437-442.
- SCHREIBER, M., GELLERMANN, M., GERDES, G. & REHFELDT, K. (2004). Maßnahmen zur Vermeidung und Verminderung negativer ökologischer Auswirkungen bei der Netzanbindung und –integration von Offshore-Windparks. Gutachten im Auftrag des BMU, FKZ 0327530. Final report, 217 pp.
- SIEMENS (2006). Preliminary Audible Noise Study. Trans Bay Cable Project (400 MW). technical study, appendix H. <http://www.ci.pittsburg.ca.us/pittsburg/pdf/tbc/TBC-AppH.pdf>
- SÖKER, H. REHFELDT, K., SANTJER, F., STRACK, M. & SCHREIBER, M. (2000). Offshore Wind Energy in the North Sea. Technical Possibilities and Ecological Considerations - A Study for Greenpeace. <http://archive.greenpeace.org/climate/climatecountdown/dewifinal10.pdf>
- SOTO, M., IRELAND, M. P. & MARIGÓMEZ, I. (2000). Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel-Watch' programmes. *The Science of the Total Environment* 247: 175-187.
- STEHMEIER, H. (2006). Verlegung von Unterwasserkabeln in Bundeswasserstrassen sowie küstennahen Bereichen am Beispiel des NorNed Kabels. Oral presentation at the meeting "Verlegung von Seekabeln zum Netzanschluss von Offshore Windparks in Bundeswasserstraßen", 21. 03. 2006 in Bremen; [http://www.offshore-wind.de/show\\_article.cfm?cid=1622](http://www.offshore-wind.de/show_article.cfm?cid=1622)
- TNU (2005). Umweltverträglichkeitsstudie im Rahmen des Antrages nach BImSchG für die Errichtung und den Betrieb des Offshore-Windparks Baltic I Pilotvorhaben Mecklenburg-Vorpommern. TÜV NORD Umweltschutz Rostock GmbH & Co. KG. Rostock. 2005.
- UGOLINI, A. & PEZZANI, A. (1992). Learned solar orientation in *Idotea baltica*. *Mesogee (Bull. Mus. Hist. Nat., Marseille)* 52: 77.
- URS CORPORATION (2006). Draft environmental impact report for the proposed TransBay Cable Project, vol. 1, section 1.0 – 11.0, Appendix A, <http://www.ci.pittsburg.ca.us>
- USSENKOW, S. M. (1997). Contamination of harbour sediments in the eastern Gulf of Finland (Neva Bay), Baltic Sea. *Environmental Geology* 32 (4): 274-280.
- VORBERG, R. (2000). Effects of shrimp fisheries on reefs of *Sabellaria spinulosa* (Polychaeta). *ICES Journal of Marine Science* 57: 1416-1420.
- WALKER, T. I. (2001). Basslink project review of impacts of high voltage direct current sea cables and electrodes on chondrichthyan fauna and other marine life. Report to NSR Environmental Consultants Pty Ltd. Marine and Freshwater Resources Institute No. 20.
- WANG, J. H., CAIN, S. D. & LOHMANN, K. J. (2003). Identification of magnetically responsive neurons in the marine mollusc *Tritonia diomedea* *The Journal of Experimental Biology* 206: 381-388.

- WARNEKE, R.M. (2001). Cetaceans in Victoria, Tasmania and Bass Strait, with reference to the Basslink project. Report to NSR Environmental Consultants Pty Ltd.
- WENNER, E. L., KNOTT, D. M., VAN DOLAH, R. F. & BURRELL, JR., V. G. (1983). Invertebrate communities associated with hard bottom habitats in the South Atlantic Bight. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 17: 143-158.
- WESTERBERG, H. (2000): Effect of HVDC cables on eel orientation. – In: MERCK, T. & NORDHEIM, H.V. (eds.): Technische Eingriffe in marine Lebensräume. Workshop des Bundesamtes für Naturschutz- INA Vilm 27.-29. Oktober 1999. – BfN Skripten 29: 70-76.
- WESTERBERG, H. & BEGOUT-ANRAS (2000). Orientation of silver eel (*Anguilla anguilla*) in a disturbed geomagnetic field. *Advances in Fish Telemetry*. - Proceedings of the Third Conference on Fish Telemetry in Europe, held in Norwich, England, 20-25 June 1999. Eds. Moore, A. & Russel, I. CEFAS, Lowestoft: 10 p.
- WHO (2005). Electromagnetic fields and public health - Effects of EMF on the Environment *International EMF Project Information Sheet*. Available [http://www.who.int/docstore/peh-emf/publications/facts\\_press/fact\\_english.htm](http://www.who.int/docstore/peh-emf/publications/facts_press/fact_english.htm)
- WILLIAMS, D. (2000). An oversimplified overview of undersea cable systems. <http://davidw.home.cern.ch/davidw/public/SubCables.html>
- WILLOWS, A. O. D. (1999). Shoreward orientation involving geomagnetic cues in the nudibranch mollusc *Tritonia diomedea*. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 32: 181-192.