

2 Material und Methoden

2.1 Immunhisto- und Immuncytochemie

2.1.1 Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Für die Versuche zum immunhistochemischen Nachweis von Vitellogenin in der Leber wurden Regenbogenforellen eingesetzt, die aus einer kommerziellen Fischzucht (Wellheim) stammten. Die ca. 200 – 400 g schweren Fische wurden bei 13 - 16 °C in einem kontinuierlichen Durchflusssystem (Austauschrate ca. 50 L/h) in 600 L-Becken bei 12 h Licht/12 h Dunkel-Zyklus gehältert. Zur täglichen Fütterung diente kommerzielles Forellenfutter (45 % Rohprotein, 3 % Lysin, 20 % Rohfett, 0,9 % Rohfaser, 7,5 % Rohasche; Ringfutter, Raiffeisen).

2.1.2 Stimulation der Vitellogenese

Die Fische erhielten eine einfache intraperitoneale Injektion mit 17 β -Estradiol gelöst in 100 % Ethanol (1 mg/kg Körpergewicht). Fische, die in gleicher Weise nur mit 100 % Ethanol gespritzt wurden dienten als Negativkontrollen.

2.1.3 Probenaufarbeitung

Vier Tage nach der Injektion wurden die Versuchstiere in einer gesättigten Lösung von Ethyl-4-aminobenzoat (Benzocain; Sigma, Deisenhofen) betäubt und ventral eröffnet. Nach dem Freipräparieren von Leber und Herz, wurde das Atrium geöffnet und eine abgestumpfte Flügelkanüle (äußerer Durchmesser 0,8 mm, innerer Durchmesser 0,6 mm; Braun, Melsungen) in die Leberpfortader eingeführt. Über eine peristaltische Pumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz) wurde die Leber mit eiskaltem Immunfixans (4 % frisch bereitetem Formalin, 0,05 % Glutaraldehyd, 0,05 % CaCl₂ und 2 % Sucrose; pH 7,6) *in situ* perfundiert. Perfundiert wurde für ca. 3 – 5 min bei Raumtemperatur mit einer Pumprate von 3 ml/min. Anschließend wurden Leber, und zum Teil Gonaden und Nieren entnommen und in Stücke von ca. 1 mm Kantlänge geschnitten.

2.1.4 Immunhistochemische Lokalisation von Vitellogenin

Für die immunhistochemische Lokalisation von Vitellogenin wurden einige Organstücke sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt. $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte wurden auf einem Kryostat (Frigocut Mod. 2700 von Reichert-Jung) angefertigt und auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Direkt nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese weiterverarbeitet.

Die noch übrigen Leber-, Gonaden- und Nierenstücke wurden in 4 % Formalin, 0,05 % Glutaraldehyd, 0,05 % CaCl_2 und 2 % Sucrose (pH 7,6) oder in Bouinscher Lösung (Romeis, 1968), ohne Eisessig, für mindestens 24 h nachfixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe (75, 85, 95 und 100 % jeweils $3 \times$ für 10 min) entwässert und über Methylbenzoat als Intermedium in Paraffin eingebettet. $6\ \mu\text{m}$ dicke Paraffinschnitte wurden auf einem HN 40-Schlittenmikrotom (Jung) angefertigt.

Vor der Durchführung der immunhistochemischen Behandlung (siehe Abbildung 2.1) wurden die Schnitte für 15 min in Xylol entparaffiniert, für 2 min in Isopropanol gewaschen und über eine absteigende Alkoholreihe (96, 80 und 70 % jeweils für 2 min) in Wasser überführt.

Paraffin- und Kryoschnitte wurden dann in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) gewaschen und für 10 min in 0,4 M Glycin inkubiert. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen des ersten Antikörpers, wurden die Schnitte mit einer 10 %igen BSA-Blocklösung (50 mL 10 % Triton X-100 ad 900 mL PBS = Phosphate-buffered-saline: 0,15 M NaCl in 0,01 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,0) für 2×30 min behandelt. Es folgte die Inkubation

der Schnitte mit Kaninchen Antiserum gegen Regenbogenforellenvitellogenin (1 : 200 in Blockpuffer) für 60 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen und Blocken für 2×15 min, wie oben beschrieben, wurden die Schnitte mit einem FITC (oder TRITC)-

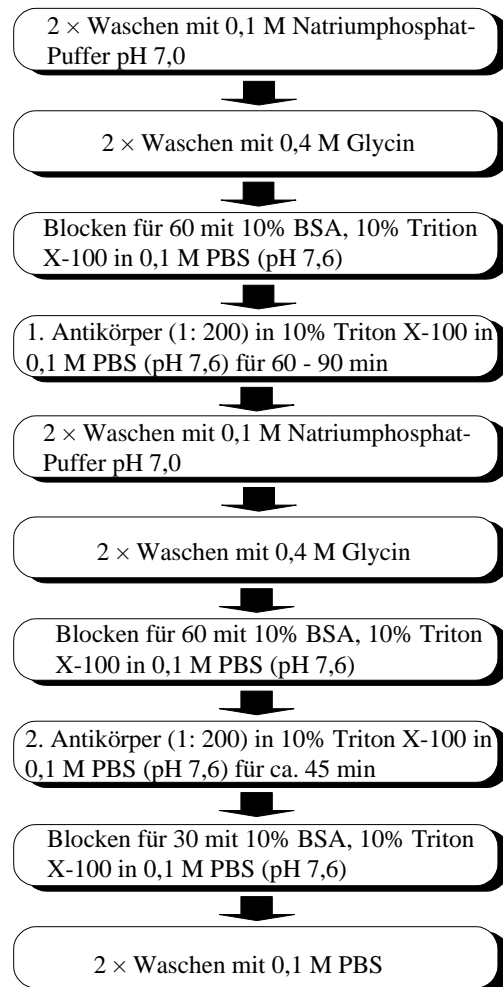


Abbildung 2.1: Schema der Immunhistochemischen Methode.

gekoppeltem Ziegen Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sigma, Deisenhofen) für 30 min behandelt (1 : 200 in Blockpuffer). Nach nochmaligem Blocken für 2×15 min und anschließendem Waschen in PBS wurde ein Teil der Schnitte für 30 s in 0,5 % Evans Blue gegengefärbt. Die Schnitte wurden in DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan; Sigma, Deisenhofen)-PBS eingedeckt. Die Auswertung fand an einem Leitz Aristoplan Mikroskop statt, das mit einem Filtersatz für grünes Licht der Wellenlänge 518 nm (FITC) und blaues Licht der Wellenlänge 580 nm (TRITC) ausgerüstet war.

2.1.5 Immuncytochemische Lokalisation von Vitellogenin

Glutaraldehyd-fixiertes Gewebe wurden mit Hilfe eines Oxford Vibratoms in 200 μ m große Stücke geschnitten, zweimal für 60 min in 70 % Ethanol entwässert und direkt in ein 2 : 1 Gemisch LR White (Sigma, Deisenhofen) und 70 % Ethanol überführt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach zweimaliger Behandlung mit reinem LR White bei 4 °C für 1 h und 12 h wurden die Proben in Gelatinekapseln eingebettet. Nach zwei Tagen bei 50 °C war das LR White in den Gelatinekapseln polymerisiert. Die Schnitte wurden an einem Reichert-Jung Ultramikrotom in einer Dicke von ca. 60 – 80 nm angefertigt und auf 200maschige Nickelgrids befilmt mit Formvar™ aufgezogen. Um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu vermindern wurden die Schnitte zunächst mit Blockpuffer (4 % BSA in 0,9 % NaCl gepuffert mit 20 mM Tris, pH 7.4) für 30 min inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Kaninchenantiserum gegen Forellenvitellogenin (1 : 70 in TBS) über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit TBS, wurden die Schnitte mit Protein A-Gold-markiertem Ziegen Anti-Kaninchen IgG (Sigma, Deisenhofen) für 60 min inkubiert. (1 : 100 in TBS). Die Schnitte wurden mit Bleicitrat für 30 s und Uranylacetat für 2 min kontrastiert und in einem Zeiss EM 10C ausgewertet.

2.1.6 Aufarbeitung der Proben für die konventionelle Elektronenmikroskopie

Für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden 4 Tiere in einer gesättigten Lösung von Ethyl-4-aminobenzoat (Benocain; Sigma, Deisenhofen) sofort nach Entnahme aus dem Becken betäubt und ventral eröffnet. Leber und Herz wurden freipräpariert und das Atrium geöffnet. In das die ebenfalls geöffnete Leberpfortader wurde eine abgestumpfte Flügelkanüle (äußerer Durchmesser 0,8 mm, innerer Durchmesser 0,6 mm; Braun, Melsungen) eingeführt und zur Entfernung des Blutes zunächst mit 0,9 % NaCl-Lösung (4 °C) über eine peristaltische Pumpe (Ismatec Reglo M8) perfundiert, die 2,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; Merck, Darmstadt) und 0,05 % Procainhydrochlorid (Serva, Heidelberg) als Entkrampfungsmittel enthielt. Anschließend folgte die *in situ* Perfusionsfixierung mit 1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % frisch hergestelltem Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6; 4 °C), in dem

2,5 % PVP enthalten war. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 12 – 15 ml/min. Unmittelbar nach der Perfusion wurde die Leber entnommen und in Blöcken bis zu 3 mm Kantenlänge im Perfusionsfixans für mindestens 1 h inkubiert.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Leberproben aus dem Perfusionsfixans in 0,15 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) überführt, mit Agar aufgeblockt und mit Hilfe eines Oxford Vibratoms 60 – 80 µm geschnitten. Es folgte ein zweiter Fixierungsschritt in 2,5 % Glutardialdehyd, 4 % PVP und 0,05 % CaCl₂ in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6; 4 °C). Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer wurden alle Proben für 1 bis 2 h in reduziertem Osmium (1 : 1-Gemisch aus 2 % OsO₄ und K₄[Fe(CN)₆] = Osmiumferrocyanit, Karnovsky 1971) bei 4 °C inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylat- und 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2; 4 °C) für mindestens 1 h bei 4 °C in 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer *en bloc* kontrastiert.

Nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Gewebeproben in Kunstharz nach Spurr (1969) eingebettet. Die Anfertigung der 200 nm dicke Ultradünnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Reichert OM-U 2 Ultramikrotoms. Die Schnitte wurden für 1 min mit Bleicitrat gegenkontrastiert und in einem Zeiss EM 10C ausgewertet.

2.2 Life-Cycle-Versuche

2.2.1 Der ZebraBärbling (*Danio rerio*)

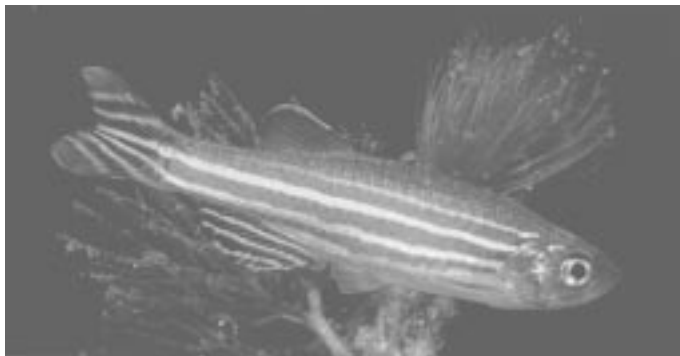


Abbildung 2.2: ZebraBärblingsmännchen, erkennbar an der deutlichen Färbung der Schwanz- und Bauchflosse

durch einen deutlich erkennbaren Geschlechterdimorphismus aus. Während das deutlich dickere und größere Weibchen nur blaß gefärbt ist, zeigt das schlanke Männchen eine intensive Körperzeichnung mit orange bis rötlich gefärbter Analflosse.

Der ZebraBärbling (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1922; Abb. 2.2) gehört als Vertreter der Karpfenfische (Cyprinidae) zur Unterfamilie der Bärblinge (Rasborinae). Seine Heimat sind fließende und stehende Gewässer (auch Reisfelder) im östlichen Vorderindien, Pakistan, Burma und Sumatra.

Der ca. 4,5 cm große Fisch zeichnet sich vor allem in der Laichreife

ZebraBärblinge gehören aufgrund der leichten Beschaffung und Hälterung zu den beliebtesten Aquarien- und Versuchsfischen. Sie zeigen eine hohe pH- und Temperaturtoleranz und lassen

sich als Schwarmfische gut und kostengünstig in großer Anzahl halten. Im Gegensatz zu den einheimischen Süßwasserfischen produziert der Zebrabärbling das ganze Jahr hindurch Eier in für biologische Tests genügend hoher Anzahl (200 – 400 pro Gelege). Einen großen Vorteil bietet der Zebrabärbling bei Entwicklungsstudien, denn seine Eier und Embryonen sind transparent, so dass Ereignisse der Embryonalentwicklung im Detail beobachtet werden können (Hisaoka und Battle, 1958; Warga und Kimmel, 1990; Ross et al., 1992; Stainier und Fishman, 1992; Westerfield, 1995). Aufgrund seiner für Wirbeltiere sehr kurzen Generationsdauer (wenige Monate) gilt der Zebrabärbling auch in der Genetik als bevorzugter Monitororganismus und eignet sich insbesondere auch für Life-Cycle-Versuche.

2.2.1.1 *Haltung der Zebrabärblinge der F₀-Generation (unbelastete Zuchttiere)*

Die Zuchttiere, adulte Zebrabärblinge eines Wildfangnachzuchtstammes der Firma Klöckner (Ludwigshafen), wurden in 160 L-Aquarien gehalten, die mit maximal 100 Tieren besetzt waren. Die Aquarien befanden sich in einem gegen natürliches Tageslicht abgedunkelten Raum, so dass ein künstlicher Tagesrhythmus mit 12stündiger Licht- und 12stündiger Dunkelphase eingehalten werden konnte. Das Aquarienwasser stammte aus einem Vorratsbehälter, in dem durch einer Mischeinrichtung das Verhältnis von Leitungs- und demineralisiertem Wasser, nach Messung der Leitfähigkeit, geregelt wurde. Die gemessenen Wasserwerte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Das Wasser wurde innerhalb des Vorratstanks geheizt (± 26 °C) und belüftet. In einem Rhythmus von ca. 14 Tagen wurden die Aquarien gründlich gereinigt und ca. 30 % des Wassers ausgetauscht. Innerhalb der Aquarien sorgten handelsübliche Regelheizstäbe und Innenfilter mit Belüftungseinrichtung für eine Aufrechterhaltung von Temperatur und Sauerstoffgehalt.

Tabelle 2.1: Wasserwerte der Aquarienanlage, nach Bestimmung mit einem Schnelltestset der Firma Merck (Darmstadt)

| Wasserparameter | Aquarien | Vorratsbehälter |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Temperatur | 25 °C \pm 1 °C | 25 °C \pm 1 °C |
| Sauerstoffgehalt | 7,5 mg/L \pm 0,5 mg/L | 8,0 mg/L \pm 0,5 mg/L |
| pH-Wert | 7,0 \pm 0,5 | 7,0 \pm 0,5 |
| Gesamthärte | 20 °dH | 20 °dH |
| Carbonhärte | 12 °dH | 12 °dH |
| NO ₃ ⁻ | \leq 48 mg/L | \leq 20 mg/L |
| NO ₂ ⁻ | \leq 0,01 mg/L | nicht nachweisbar |
| NH ₄ ⁺ | nicht nachweisbar | nicht nachweisbar |

2.2.1.2 Fütterung der Zuchttiere

Die Zuchttiere wurden morgens und abends mit Zierfischfutter (Tetra, Melle) gefüttert. Die Laichgruppen erhielten zusätzlich, vor allem vor der geplanten Eiablage, frisch geschlüpfte Artemien (*Artemia spec.*).

Die Artemieneier wurden in einer verdünnten Meersalzlösung in 5 L Erlenmeierkolben angesetzt und bei Raumtemperatur unter starker Belüftung gehalten. Die geschlüpften Nauplien konnten zwei Tage nach dem Ansetzen durch einen Scheidetrichter von den Eispelzen getrennt und nach dem Spülen in Süßwasser an die Fische verfüttert werden.

2.2.1.3 Eiproduktion zur Zucht der Versuchstiere

Zur Eiproduktion wurden adulte Zebrabärblinge eingesetzt, die in der oben beschriebenen Weise gehalten wurden. 5 - 10 Zebrabärblingsbrutgruppen, bestehend aus einem Weibchen und zwei Männchen, wurden in eine Zuchtanlage gesetzt (Abb. 2.3), die aus zwei zu einem

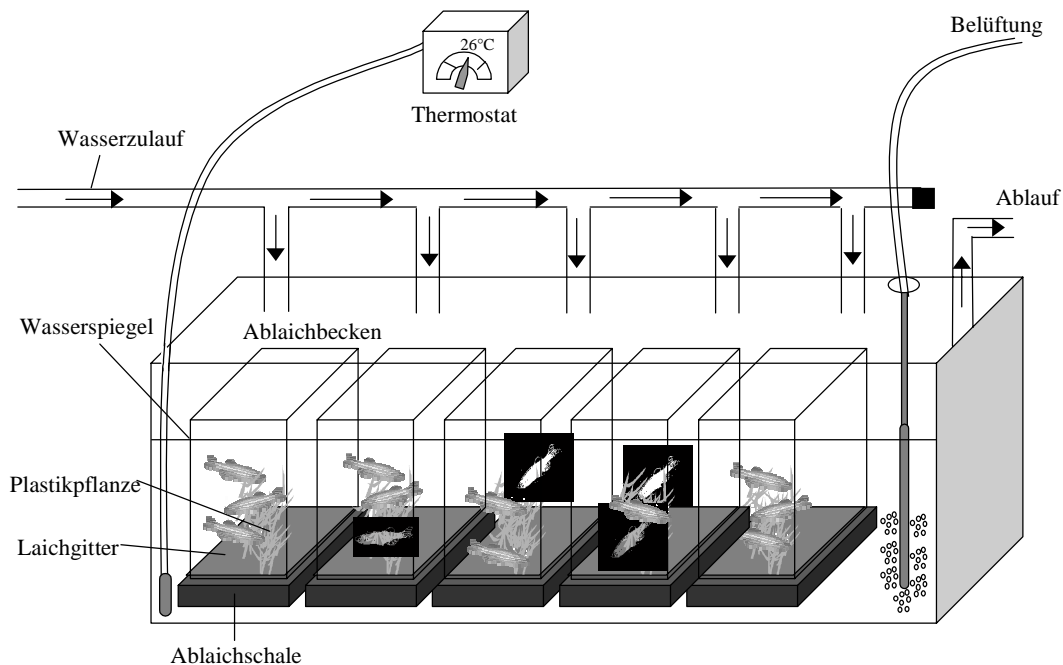


Abbildung 2.3: Zuchtanlage, bestehend aus zwei Aquarien im Durchfluss gekoppelt, in die Ablaihschalen mit Ablaihschalen eingestellt wurden. Durch das Laichgitter konnten die Eier in die Ablaihschale fallen und abgesammelt werden.

Durchflusssystem zusammengeschlössen Aquarien bestand. Das Wasser der Anlage wurde über einen Thermostat auf $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert und belüftet. Innerhalb jedes Aquariums befanden sich 5 Ablaihkästen ($26 \times 16 \times 16\text{ cm}$) mit einem Kunststoffgitter (Laichgitter) am Boden (Maschenweite 2 mm), in die jeweils eine Brutgruppe gesetzt wurde. Unter jedem Ablaihkasten war jeweils eine Ablaihschale angebracht, in die die Eier durch das Laichgitter hineinfallen konnten. Laichgitter waren notwendig, um das Auffressen des Geleges durch die Elterntiere zu verhindern. Zwischen die Ablaihschalen waren dunkle Platten eingestellt, um eine mögliche Störung der Brutpaare untereinander zu vermeiden. Zur Stimulation des Balzverhaltens wurden in den Schalen Plastikpflanzen angebracht. Das Zusammensetzen der Tiere in den Ablaihkästen erfolgte jeweils am Nachmittag vor der geplanten Eiablage. Das Ablaihen begann mit Einsetzen der Lichtphase am Morgen des nächsten Tages. Ungefähr zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase war die Eiablage beendet, und die Ablaihschalen konnten aus dem Aquarien entnommen werden. Die Eier wurden umgehend in Petrischalen ($\varnothing 17\text{ cm}$; Volumen: 200 mL) überführt (ca. 100 Eier pro Schale) und bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Innerhalb des Brutschrankes wurde der 12 h/12 h Rhythmus, durch eine Zeitschaltuhr geregelt, beibehalten. Spätestens 6 Stunden nach der Eiablage wurden die unbefruchteten Eier aus den Petrischalen entfernt.

2.2.2 Herstellung der Testlösungen

In abgedunkelten Vorratsflaschen wurde die mit demineralisiertem Wasser verdünnte Stammlösung der Schadstoffe (Gebrauchslösungen) aufbewahrt. Die nominalen und tatsächlichen Konzentrationen der Lösungen in den Aquarien sind zu Beginn der jeweiligen Ergebniskapitel angegeben. Die Wasseranalysen wurden mittels eines HPLC-Chromatographen von den Analyselabors GC-Analysen GmbH (Pöcking), der Firma Maier Umweltanalytik (Starnberg) und dem Hygieneinstitut der Universität Heidelberg (durch Herrn Rastall) durchgeführt.

4-Nonylphenol

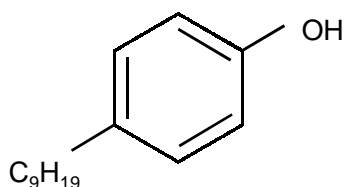


Abbildung 2.4: 4-Nonylphenol

(CAS Nr. 25154-52-3; MG: 220,36; Abb. 2.4) wurde als technischer Standard von Aldrich (Steinheim) bezogen. Unter dem Begriff Nonylphenol fasst man verschiedene Isomere und Homologe von Phenolen mit einer unverzweigten oder auch verzweigten Seitenkette (sog. Isononylphenol) zusammen. Die Unterschiede können sowohl in der Verknüpfung zum Ring wie auch in der Verzweigung des Nonylrestes liegen. In technischen Gemischen liegt ein Verhältnis von etwa 1 : 9 bezüglich

der 2- und 4-Stellung vor (Streit, 1994). Als Hauptverunreinigungen des technischen Gemisches kommen Decylphenol und Dinonylphenol vor (zusammen mit ca. 10 %; Ahel und Giger, 1993). Die Dichte von 4-Nonylphenol (*p*-Nonylphenol) beträgt 0,952. 303 mg der viskosen Flüssigkeit wurden in 60 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Rühren bei 20 °C gelöst. Das Ansetzen in DMSO war notwendig, da die maximale Wasserlöslichkeit von Nonylphenol bei 3400 mg/L liegt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 g/L. Für das Herstellen der Schadstoffgebrauchslösungen in den Petrischalen wurde täglich eine zweite Stammlösung angesetzt. Hierzu wurden 500 µL aus der ersten Stammlösung zu 125 mL demineralisiertem Wasser gegeben (Konzentration: 40 mg/L). Die Testkonzentrationen wurden täglich und unter Durchflussbedingungen jeden zweiten Tag hergestellt. Die Gebrauchslösungen des Durchflusssystems wurden in dunklen Glasflaschen (Volumen: 5 L) aufbewahrt und in im Folgenden beschriebener Weise in die Aquarien gegeben.

Während der Durchflussphase wurden 3 Analysen von der Firma Maier Umweltanalytik (Starnberg) mittels einer HPLC/DAD-Methode durchgeführt. Hierbei wurde 4-iso-Nonylphenol über die lineare Regression mittels eines externen Standard analysiert. Die Ergebnisse der Analysen sind in Kapitel 3.2 dargestellt.

4-*tert*-Octylphenol [4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol]

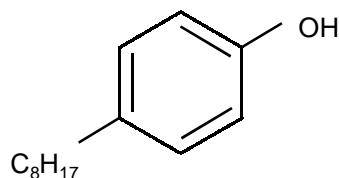


Abbildung 2.5: 4-*tert*-Octylphenol

(CAS Nr. 1806-26-4; MG: 206,33; Abb. 2.5) wurde in einer Reinheit von 99 % ebenfalls von Aldrich (Steinheim) bezogen. Octylphenol wurde in gleicher Konzentration wie Nonylphenol (10 g/L) in DMSO angesetzt. Auch hier war der Einsatz von DMSO unvermeidbar, da Octylphenol wasserunlöslich ist. In gleicher Weise wie Nonylphenol war das Ansetzen einer zweiten Stammlösung (40 mg/L) nötig, um die Gebrauchslösungen in den Petrischalen herstellen zu können.

Während der Durchflussphase wurde eine Analyse von der Firma GC-Analysen (Pöckingen) mittels einer HPLC/DAD-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Kapitel 3.3 aufgeführt.

17 β -Estradiol water soluble

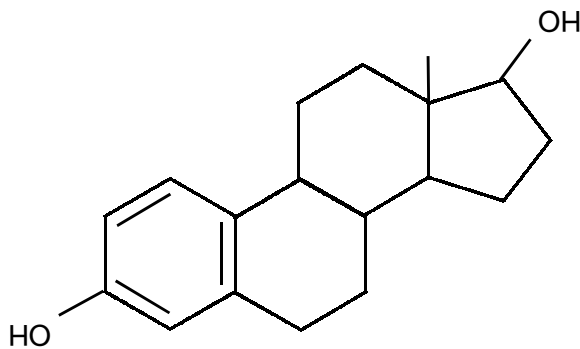


Abbildung 2.6: 17 β -Estradiol

100 mL Wasser gelöst (Konzentration: 10 mg/L). Aus dieser Lösung wurden alle Gebrauchslösungen für die statische und kontinuierliche Belastung im Durchfluss angesetzt.

17 β -Estradiol wurde in den beiden Life-Cycle-Versuchen mit Nonylphenol und Octylphenol als Positivkontrolle getestet.

DHEA (Dehydroisoandrosteron, Dehydroepiandrosteron)

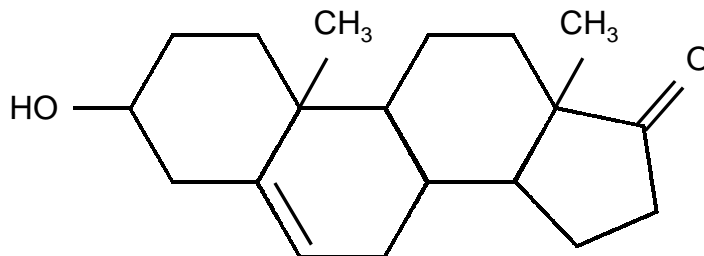


Abbildung 2.7: Dehydroepiandrosterone (DHEA)

Gebrauchslösungen für die Belastung in den Petrischalen wurden 100 μ L der Stammlösung in 100 mL demineralisiertes Wasser gegeben (= Konzentration: 10 mg/L). Diese zweite Stammlösung wurde täglich neu angesetzt.

Während der Durchflussphase wurden 2 Analysen von der Firma GC-Analysen (Pöcking) und von Herrn Rastall (Hygieneinstitut der Universität Heidelberg) mittels einer HPLC/DAD-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse beider Analysen sind in Kapitel 3.4 dargestellt.

Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus 17 β -Estradiol (1,3,5[10]-Estratrien-3-17 β -diol; CAS-Nr. 50-28-2; MG: 272,4; Abb. 2.6) und 2-Hydroxypropyl- β -cyclo-dextrin. Aufgrund dieses Komplexes, der 49 mg/g 17 β -Estradiol enthält, wird das Steroid wasserlöslich. Für die Stammlösung wurden 20 mg des wasserlöslichen β -Estradiols (entspricht einer Menge von 1 mg reinem 17 β -Estradiol) in

(CAS Nr. 53-43-0; MG: 288,4; Abb. 2.7). DHEA ist ein multifunktionales Steroid, von dem bekannt ist, dass es in viele funktionale Aktivitäten des Zentralnervensystems involviert ist. DHEA wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen und in einer Konzentration von 10 g/L angesetzt. Zum Ansetzen der

2.2.3 Bestimmung der akuten Toxizität

Zur Bestimmung des LC_{50} , d. h. der Konzentration bei der nach 96 h 50 % der Tiere gestorben sind, wurden je 12 Zebrabärblinge in 300 mL Glasaquarien mit reinem Wasser, 100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 300 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ und 500 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol-Lösungen gesetzt. Wasserwechsel und Fütterung der Tiere fanden täglich statt. Die Überlebensrate wurde nach 96 h bestimmt.

2.2.4 Exposition der Embryonen und Larven unter statischen Bedingungen

Tiere, die während ihres gesamten Lebens unter Schadstoffeinfluss gehalten werden sollten, wurden unmittelbar nach Eiablage belastet. Hierzu wurden zunächst 2×120 Eier sofort nach dem Einsammeln in den Petrischalen den unterschiedlichen Schadstoffkonzentrationen, 0,02 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und 17β -Estradiol (Positivkontrolle), mit Ausnahme des Life-Cycle-Versuchs mit DHEA, ausgesetzt. Ein Teil der Eier blieb zur Kontrolle unbelastet. Nachdem alle Eier aus den Ablaischalen entnommen waren, wurden die unbefruchteten Eier aus den Petrischalen aussortiert und verworfen, und die Anzahl befruchteter Eier auf ca. 2×75 reduziert.

Eier und Larven wurden die gesamte erste Lebenswoche bei täglichem Wasserwechsel in den Petrischalen gehalten. Während dieser Zeit konnten Schlupfrate, Letalität und Schädigung der Embryonen und Larven dokumentiert werden. Die Larven wurden während dieser Phase nicht gefüttert. Eine Woche nach Eiablage konnten die ungeschädigten freischwimmenden Tiere in 2 L Aquarien umgesetzt werden. Da zu diesem Zeitpunkt die Reserven des Dottersackes aufgebraucht waren, wurden die Tiere von nun an zweimal täglich mit Tetra AZ 300 (Tetra Werke, Melle) gefüttert. Ab dem 10. – 11. Lebenstage wurden den Larven zusätzlich frisch geschlüpfte Nauplien von *Artemia* angeboten und spätestens ab dem 14. Lebenstag vollständig auf diese Nahrung umgestellt. Ab einem Alter von 14 bis 18 Tagen konnten die Tiere, die nun eine Länge von ca. 0,3 – 0,5 cm hatten, in die Durchflussanlage umgesetzt werden.

2.2.5 Exposition der juvenilen bis adulten Tiere im Durchflusssystem

Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. In die Durchflussanlage waren sechs 70 L Glasaquarien integriert. Das Wasser wurde entsprechend der Beschreibung unter Kapitel 2.2.1.1 in einem Vorratsbehälter belüftet und erwärmt und nach Passage eines Hochbehälters mittels Durchflussregler (Rotameter, Rota Yokogawa, Wehr) in einer Menge von 2 L pro Stunde in die Aquarien gegeben. Die Schadstoff- und Kontrollösungen, die in

dunklen 5 L-Vorratsflaschen ständig rührten, wurden über Perfusionspumpen (Gilson, M312; Abimed, Steinheim) in der gewünschten Konzentration in die Becken getropft. Durch ein Becken wurde reines Wasser geleitet. Schadstoff- und Wasserzulauf mündeten über einen in die Abdeckung der Becken eingelassenen Mischzylinder in die Aquarien. Überflüssiges Aquarienwasser konnte über einen Überlauf in einer Rinne unterhalb der Aquarien abfließen und wurde über einen Aktivkohlefilter gereinigt. Die Wassertemperatur von 26 - 27 °C konnte über Heizkissen, die sich unter den Aquarien befanden, eingestellt und über Thermostate reguliert werden. Mittels eines zusätzlichen Belüftungssystems wurde über Glasstäbe Sauerstoff in jedes Becken eingeleitet. Die Eichung der Rotameter erfolgte täglich, die der Schadstoffpumpen 3 × wöchentlich. Mindestens einmal pro Woche mussten die Aquarien von Algenbewuchs befreit werden.

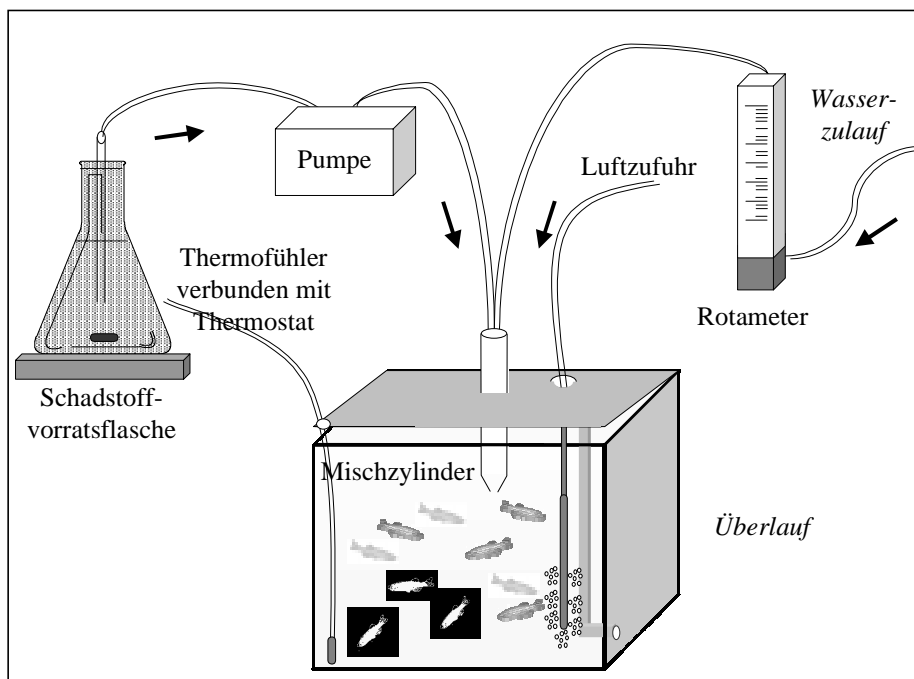


Abbildung 2.8: Versuchsaufbau am Beispiel eines Aquariums. Entsprechend waren 5 Aquarien aufgebaut, in denen die Fische mit Schadstoff- und Kontrollösungen belastet wurden.

Exposition

Jeweils ca. 120 (im Falle von Nonylphenol), später ca. 70 (bei der Untersuchung von Octylphenol und DHEA) augenscheinlich ungeschädigte juvenile Fische wurden pro Ansatz in die Aquarien des Durchflusssystems überführt. Innerhalb der Aquarien waren die Überlaufrohre zunächst mit feinen Gaze-Netzen abgedeckt, so dass die Tiere nicht aus den Becken gelangen konnten. Die feinen Netze wurden später durch grobe Schwammstücke ersetzt. Die Zebraabär-

blinge wurden $2 \times$ täglich mit Artemien und Tetramin (Tetra, Melle) gefüttert. In Abhängigkeit von der Individuendichte erreichten die Fische nach 4 bis 7 Monaten die Geschlechtsreife.

2.2.5.1 Reproduktionsversuche

Zur Ermittlung der Reproduktionsfähigkeit wurden mit den adulten, geschlechtsreifen Versuchstieren der Life-Cycle-Versuche auf zwei verschiedene Weisen Reproduktionstests durchgeführt:

1. Ablaischalen bedeckt mit Ablaischgittern wurden direkt in die Aquarien der Durchflusssanlage eingestellt. Die Schalen wurden bereits eine Woche vor dem Beginn der Reproduktionsversuche in die Aquarien gebracht, so dass sich die Fische an die veränderte Umgebung gewöhnen konnten. Während der Reproduktionsversuche wurden die Schalen täglich entnommen und die darin enthaltenen Eier in Petrischalen überführt. Entnahme und Aussortieren der Eier erfolgt in der unter Kapitel 2.2.1.3 beschriebenen Weise.
2. Die zu testenden Brutgruppen bestehend aus 2 Männchen und 1 Weibchen, später 1 Männchen und 1 Weibchen, wurden aus jedem Durchflusssaquarium entnommen und in die Ablaischkästen gesetzt (wie unter 2.2.1.3 beschrieben). Meist wurden Brutgruppen aus allen Versuchsansätzen parallel getestet. In der Zuchtanlage konnten jeweils 10 Brutpaare untergebracht werden. Somit konnten jeweils 2 Brutpaare aus jedem Schadstoffansatz, dem 17β -Estradiol-Ansatz und den Negativkontrollansätzen getestet werden. Am Morgen des Ablaischens erfolgte das Absammeln und Aussortieren der Eier in oben beschriebener Weise. Als unbefruchtet galten Eier, bei denen bei der Betrachtung unter dem Bionokular keine Zellteilungsstadien bzw. Morula erkennbar waren bzw. solche, die am Tag nach der Eiablage koaguliert waren. Koagulierte Eier sind an der milchig weißen Färbung der Chorions erkennbar.

Ein Teil der bei den Reproduktionstests erhalten Eier wurde zu Early-Life-Stage-Untersuchungen herangezogen. Der Rest der Eier wurde nach dem Bestimmen von Eizahl und Befruchtungsrate für weitere 4 – 5 Tage aufbewahrt und danach verworfen.

2.2.5.2 Early-Life-Stage-Untersuchungen

Jeweils 60 befruchtete Eier jedes Brutpaares der Reproduktionsversuche wurden in reinem Wasser in Petrischalen bei 25°C aufbewahrt. Das Wasser wurde täglich gewechselt. Die Bestimmung von Entwicklungsgeschwindigkeit, Teratogenität, Mortalität, zum Teil Herzfrequenz und Schlupfrate erfolgte täglich mit Hilfe von Binokular und Mikroskop. Zur Bewer-

tung der Entwicklungsanomalien wurden die in Abbildung 2.9 aufgeführten Parameter herangezogen. Die Embryonen und Larven wurden über einen Zeitraum von 7 – 9 Tagen beobachtet.

Im Rahmen der Life-Cycle-Versuche mit Octylphenol wurden zusätzlich Early-Life-Stage-Untersuchungen durchgeführt, in denen die Embryonen und Larven mit den gleichen Schadstoffkonzentrationen wie zuvor die Elterntiere weiter belastet wurden.

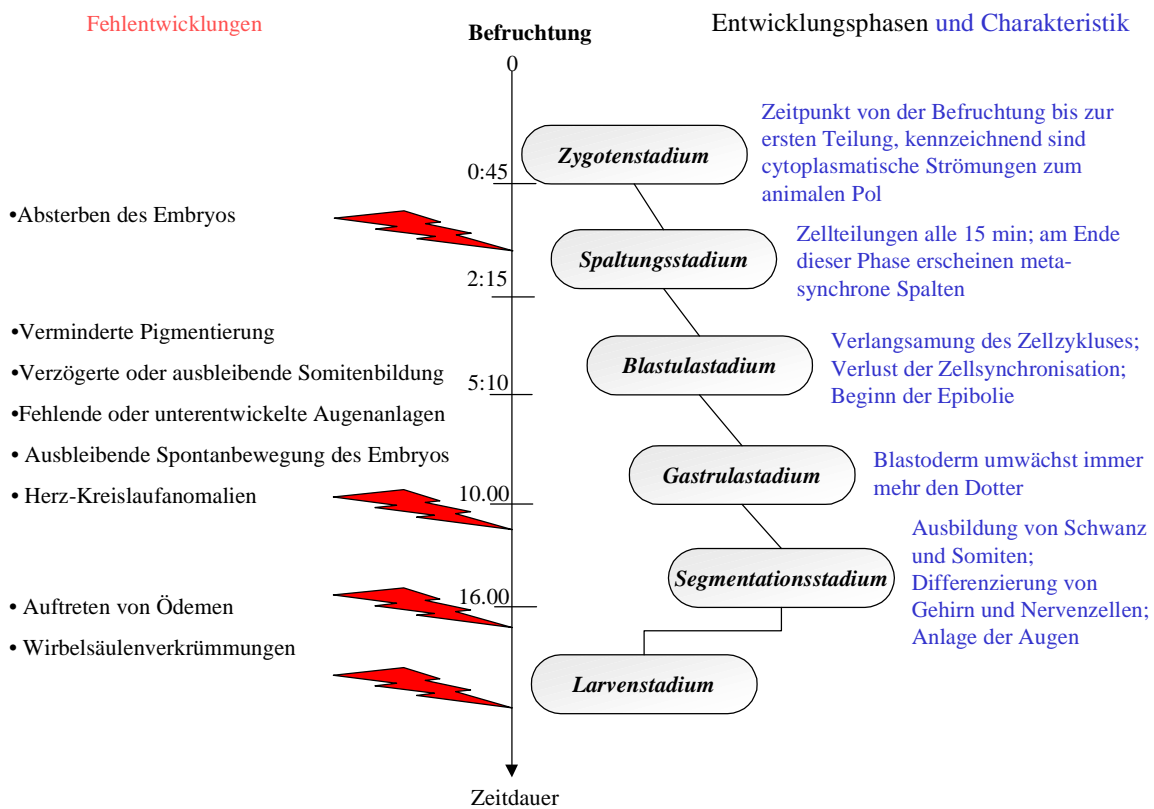


Abbildung 2.9: Stadien der Embryonalentwicklung des Zebrafisches (*Danio rerio*). Jede Phase ist durch die wichtigsten Entwicklungsschritte charakterisiert. Als mögliche Störungen während den Entwicklungsstadien können die unter „Fehlentwicklungen“ aufgezeigten Merkmale gewertet werden.

2.2.5.3 Histologische Aufarbeitung der adulten Fische der F_1 -Generation

Jeweils 10 Versuchstiere aus jeder Testkonzentration der Life-Cycle-Versuche wurden aus den Aquarien entnommen und bis zur umgehenden Weiterverarbeitung in einem belüfteten 2 L Aquarium belassen. Die Fische wurden nacheinander entnommen, mittels einer gesättig-

ten Ethyl-4-aminobenzoat Lösung (Benzocain; Sigma, Deisenhofen) betäubt, vermessen (Gewicht und Länge), ventral eröffnet und nach Bestimmung des Geschlechtes mit Hilfe des Bionokulares *in toto* in Bouin-Lösung (15 Teile Pikrinsäure, 5 Teile Formaldehyd (37 %) und 1 Teil Eisessig) fixiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe (75, 85, 95 und 100 % jeweils 3 × für 10 min) entwässert und über Methylbenzoat als Intermedium in Paraffin eingebettet. Für die Einbettung wurden Kopf und Schwanzflosse der Tiere entfernt. Für lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen wurden 6 µm dicke Schnitte auf einem HN 40-Schlittenmikrotom (Jung) angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen, die mit Eiweißglycerin beschichtet waren. Vor dem Färben wurden die Schnitte für 15 min in Xylol entparaffiniert, für 2 min in Isopropanol gewaschen und über eine absteigende Alkoholreihe (96, 80 und 70 % jeweils für 2 min) in Wasser überführt. Die Schnitte wurden mit der Massonschen Trichromfärbung (modifiziert nach Goldner, 1938) gefärbt.

Folgende Farbstoffe wurden bei dieser Mehrkomponenten-Übersichtsfärbung verwendet:

- Weigerts Eisenhämatoxylin (2 min)
- Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (5 min)
- Phosphormolybdänsäure-Orange G (5 min)
- Lichtgrün (5 min)

Nach allen Färbeschritten wurde gewaschen, nach Eisenhämatoxylin in fließendem Wasser und nach allen übrigen Farbstoffen in 1 %iger Essigsäure.

Nach den Färbungen erfolgte die Rückführung über Isopropanol in Xylol. Die Schnitte wurden mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckt und am nächsten Tag in einem Leitz Aristoplan Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.5.4 Cytologische Untersuchung der adulten Fische der F_1 -Generation

Jeweils 10 Versuchstiere aus jeder Testkonzentration der Life-Cycle-Versuche wurden aus den Aquarien entnommen und bis zur umgehenden Weiterverarbeitung in einem belüfteten 2 L Aquarium belassen. Die Fische wurden nacheinander entnommen, mittels einer gesättigten Ethyl-4-aminobenzoat Lösung (Benzocain; Sigma, Deisenhofen) betäubt und vermessen (Gewicht und Länge). Nach Eröffnung der Körperhöhle vor dem Diaphragma wurde das Atrium geöffnet und eine fein ausgezogene Glas-Mikroinjektionsnadel (Spitzenöffnung: 80 – 100 µm) in den Ventrikel eingeführt. Die *in situ* Perfusion mit 1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % frisch hergestelltem Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6; 4 °C), in dem 2,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; Merk, Darmstadt) enthalten war, erfolgte mit Hilfe einer Ismatec MS-4-Reglo-Schlauchpumpe (Ismatec; Zürich, Schweiz), bei einer Flussrate von ca. 1,5 mL/min. Die Leber wurde komplett aus den Tieren entnommen und bis zur weiteren

Verarbeitung für mindestens 1 h im Perfusionsfixans aufbewahrt. Das Geschlecht der Fische wurde nach Entnahme der Leber mit Hilfe des Binokulares bestimmt.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Leberproben in 0,15 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) und in einem zweiten Fixierungsschritt in 2,5 % Glutardialdehyd, 4 % PVP und 0,05 % CaCl_2 in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6; 4 °C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer wurden alle Proben für 1 bis 2 h in reduziertem Osmium (1 : 1-Gemisch aus 2 % OsO_4 und $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ = Osmiumferrocyanit, Karnovsky 1971) bei 4 °C inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylat- und 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2; 4 °C) für mindestens 1 h bei 4 °C in 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer *en bloc* kontrastiert.

Nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Gewebeproben in Kunstharz nach Spurr (1969) eingebettet. Die Anfertigung der 200 nm dicken Ultradünnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Reichert OM-U 2 Ultramikrotoms. Die Schnitte wurden für 1 min mit Bleicitrat gegenkontrastiert und in einem Zeiss EM 10 C ausgewertet.

2.2.5.5 Probenaufarbeitung für die Knochenfärbung

Nach Perfusion und Entnahme der Leber wurde ein Teil der Versuchsfische für die Untersuchung der Skelettknochen zunächst mit einer feinen Pinzette, von der eröffneten Bauchdecke ausgehend, gehäutet. Dies war notwendig, um das Eindringen der nachfolgenden Reagenzien zu erleichtern. Die Fische wurden dann in 2 %iger KOH-Lösung für 4 – 6 Wochen, bei zweitägiger Erneuerung der Lösung, inkubiert. Diese Mazerierung war abgeschlossen, als die Tiere milchig weiß und durchscheinend erschienen und auch die Augen entfärbt waren. Das Knochenskelett konnte dann für 1 – 2 Tage mit Alizarin-Rot-KOH (100 mL 5 %iger KOH + 10 mL 0,1 %ige Alizarin Rot S Lösung; Serva, Heidelberg) angefärbt werden. Zur Entfärbung der Muskulatur wurden die Proben zuletzt mit 30, 60 und 85 %igem Glycerin behandelt. Pro Stufe wurde das Glycerin im 2-Tages-Rhythmus fünfmal gewechselt. Die Fische wurden anschließend fotografiert.

2.2.5.6 Regenerationsversuche

Bei dem mit DHEA durchgeführten Life-Cycle-Versuch wurde ein Teil der Tiere im Anschluss an die Belastungsphase im Durchflusssystem in reinem Wasser gehalten. Nach einer 14tägigen Regenerationszeit wurde die Reproduktionsfähigkeit der Tiere erneut getestet.

2.2.6 Pulsversuche

Zur Untersuchung der Auswirkung kurzzeitiger Nonylphenol-Belastung (100 µg/L) auf die Entwicklung des Zebraäbrblings wurden 3 Testgruppen, bestehend aus jeweils 60 Tieren, über drei verschiedene Zeitfenster belastet. Der erste Belastungszeitraum (Gruppe 1) erstreckte sich ausschließlich über die Embryonalphase und endete mit dem Schlupf der Larven. Die zweite während der Embryonalphase unbelastete Testgruppe wurde ab dem Schlupf so lange belastet, bis der Dottersack aufgebraucht war. Ab dem Ende der zweiten Lebenswoche, dem Zeitpunkt, an dem die Larven mit Fressen begannen wurde die dritte, bis dahin unbelastete Fischgruppe, für eine Woche mit 100 µg/L Nonylphenol belastet. Nach Beendigung aller Belastungsphasen erfolgte die Hälterung der Gruppen in drei getrennten 40 L-Aquarien bis zur Geschlechtsreife.

2.2.7 Statistik

Die statistische Bewertung der Reproduktionsversuche, der Gewichts- und Längenverteilungen sowie der Quotienten daraus wurde mit Hilfe von SigmatStat (Firma Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden der Student's t-Test herangezogen. Als Bezugspunkt für die signifikanten Veränderungen, die nach Belastung beobachtet werden konnten, diente eine der Negativkontrollen. Wicht die Wasser- von der DMSO-Kontrolle signifikant ab, fand die statistische Bewertung mit beiden Negativkontrollen statt. Die Ergebnisse sind dann gesondert aufgeführt, wenn sich hieraus Unterschiede in den Signifikanzen ergaben.

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2 | Material und Methoden | 11 |
| 2.1 | Immunhisto- und Immuncytochemie..... | 11 |
| 2.1.1 | Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 11 |
| 2.1.2 | Stimulation der Vitellogenese | 11 |
| 2.1.3 | Probenaufarbeitung..... | 11 |
| 2.1.4 | Immunhistochemische Lokalisation von Vitellogenin | 12 |
| 2.1.5 | Immuncytochemische Lokalisation von Vitellogenin | 13 |
| 2.1.6 | Aufarbeitung der Proben für die konventionelle Elektronenmikroskopie..... | 13 |
| 2.2 | Life-Cycle-Versuche..... | 14 |
| 2.2.1 | Der Zebraärbling (<i>Danio rerio</i>) | 14 |
| 2.2.2 | Herstellung der Testlösungen | 17 |
| 2.2.3 | Bestimmung der akuten Toxizität..... | 20 |
| 2.2.4 | Exposition der Embryonen und Larven unter statischen Bedingungen..... | 20 |
| 2.2.5 | Exposition der juvenilen bis adulten Tiere im Durchflusssystem | 20 |
| 2.2.6 | Pulsversuche | 26 |
| 2.2.7 | Statistik | 26 |